

Sophie Caroline Henneken

Dr. med.

Multi-Omic Characterization of Inter- and Intratumoral Heterogeneity in Fusion-Driven Pediatric Soft Tissue Sarcomas and Supratentorial Brain Tumors

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Pfister

Hirntumore und Weichteilsarkome stellen die beiden größten Gruppen solider pädiatrischer Tumore dar und gehen aufgrund mangelnder effektiver Therapieoptionen häufig mit einer ungünstigen Prognose einher. Beide Gruppen sind durch eine umfassende klinische, histopathologische sowie molekulare Heterogenität gekennzeichnet. Ein genaueres Verständnis der intra- und intertumoralen Heterogenität dieser Tumore ist notwendig, um bestehende Risikostratifizierungen zu verbessern und um die Entwicklung von personalisierten und dadurch effektiveren Therapien zu ermöglichen.

Im **ersten Teil** dieser Arbeit wurden Aspekte der intertumoralen Heterogenität pädiatrischer Hirntumore betrachtet und dabei eine neue molekulare Gruppe supratentorieller Hirntumore identifiziert und beschrieben. DNA-Methylierungsanalysen ermöglichen die Charakterisierung eines zunehmend größer werdenden Spektrums molekular definierter Hirntumorentitäten und aktuelle Studien deuten auf die Notwendigkeit einer genaueren molekularen Subgruppierung von supratentoriellen Hirntumoren hin. Basierend auf genomweiten DNA-Methylierungsdaten einer großen Hirntumor-Kohorte wurde eine klar von anderen molekularen Typen abgrenzbare Gruppe identifiziert. Während histopathologische Analysen dieser Tumore ein relativ breites morphologisches Spektrum mit überwiegend Ependymom-typischen Charakteristika zeigten, führten RNA-Sequenzierungen zur Detektion wiederkehrender Genfusionen, die das *PLAGL1*-Gen involvieren (in der Mehrzahl der Fälle *EWSR1:PLAGL1* sowie seltener *PLAGL1:FOXO1* oder *PLAGL1:EP300*). Differenzielle Genexpressionsanalysen zwischen dieser neuen Gruppe und einer Referenzkohorte bestehend aus anderen glialen und glioneuronalen Subtypen, inklusive *ZFTA:RELA*-fusionspositiven Ependymomen, bestätigten die beobachtete Überexpression des *PLAGL1*-Gens sowie *PLAGL1*-regulierter Gene in der neuen Gruppe. Insgesamt verdeutlichen diese Ergebnisse die molekulargenetische Heterogenität neuroepithelialer Tumore, welche über die bisher bekannten Gruppen hinausgeht, und sie zeigen die Relevanz von molekularen Analysen für eine präzise Hirntumordiagnostik auf. Aufgrund fehlender eindeutiger Hinweise auf den entwicklungsbiologischen Ursprung dieser Tumore wurde die vorläufige Bezeichnung „supratentorielle neuroepitheliale Tumore mit *PLAGL1*-Fusion (NET_PLAGL1)“ gewählt. Entsprechend der Konventionen der aktuellen Auflage der WHO-Klassifizierung zentralnervöser Tumore wurden folgende essentielle diagnostischen Kriterien vorgeschlagen: (a) das Vorhandensein der spezifischen DNA-Methylierungssignatur oder (b) die Kombination von GFAP-Expression und *PLAGL1*-Fusion. Diese neue Gruppe hat das Potential, in die nächste Auflage der oben genannten WHO-Klassifizierung aufgenommen zu werden, wodurch die Diagnostik und Risikostratifizierung von betroffenen Patient*innen verbessert werden könnte. Weiterführende Studien werden benötigt, um die genauen onkogenen Mechanismen der jeweiligen Fusionsproteine zu

untersuchen und um therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Die bereits begonnene prospektive Sammlung und Analyse weiterer klinischer Daten im Rahmen von zentrumsübergreifenden Kooperationen wird potenziell zu einer präziseren Risikostratifizierung beitragen.

Im **zweiten Teil** dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, mittels Einzelzellkernsequenzierungen sowie *Liquid Biopsy*-Analysen Aspekte der intra- und intertumoralen Heterogenität verschiedener pädiatrischer Weichteilsarkom-Entitäten zu entschlüsseln. Hierzu wurde eine retrospektive Kohorte von in die INFORM-Studie eingeschlossenen Patient*innen zusammengestellt, von denen jeweils mindestens eine Tumorbiopsie und eine *Liquid Biopsy* zur Verfügung standen. Nach erfolgreicher Etablierung eines für frisch gefrorene Weichteilsarkome geeigneten Zellkernisolierungsprotokolls wurden Einzelzellkern-RNA- sowie kombinierte Einzelzellkern-Methylierungs- und Transkriptom-Analysen durchgeführt. Dies ermöglichte die Einordnung von Zellen als maligne oder nicht-maligne sowie die Identifizierung von potentiellen malignen Subklonen. Darüber hinaus wurden weiterführende Untersuchungen der intra- und intertumoralen Heterogenität basierend auf Kopienzahlvariationen sowie differentieller Genexpression durchgeführt. Dabei wurde eine substantielle Heterogenität in der Expression von Myogenese-Markergenen aufgezeigt, mit Hinweisen auf eine klonale Selektion von Mesoderm-artigen Zellen in embryonalen Rhabdomyosarkomen sowie eine starke proliferative Aktivität von Myozyten-artigen Zellen in alveolären Rhabdomyosarkomen. Zudem konnten anhand von weiteren differentiellen Genexpressionsanalysen die Vorteile von Einzelzellkernsequenzierungen in Hinsicht auf die Identifizierung von potenziell therapeutisch relevanten Subklonen verdeutlicht werden. In einem nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der Einzelzellkernstudien durch *Liquid-Biopsy*-Daten (Gesamtgenomsequenzierungen von zellfreier Tumor-DNA) komplementiert. Zudem konnte die Überlegenheit eines Enzym-basierten gegenüber eines Bisulfit-basierten Protokolls zur Methylierungsanalyse aufgezeigt werden. Integrative Analysen von mittels Tumor- und *Liquid Biopsy*-Analysen generierten Kopienzahlprofilen verdeutlichten zum einen, dass Einzelzellkernsequenzierungen einen genaueren Eindruck der vorhandenen Tumorerheterogenität vermitteln als Standard-Tumorsequenzierungen und zum anderen, dass *Liquid Biopsies* einen vielversprechenden Ansatz zur longitudinalen Therapieüberwachung von pädiatrischen Weichteilsarkompatient*innen darstellen. Weiterführende integrative Analysen werden im Rahmen des HEROES-AYA-Projektes (<https://www.heroes-aya.de/>) durchgeführt, für das in dieser Studie essenzielle Grundlagendaten generiert wurden. Da die Analyse von zirkulierenden Tumorzellen potenziell die Vorteile von Einzelzellkernsequenzierungen mit denen von *Liquid Biopsies* kombiniert, wurde in einem abschließenden Schritt ein Protokoll zur Isolierung von zirkulierenden Prostatakarzinom-Zellen systematisch für die Detektion von Rhabdomyosarkom-Zellen adaptiert. Basierend auf dem optimierten Vorgehen kann zukünftig eine Validierung dieses Protokolls anhand von *Liquid Biopsies* betroffener Patient*innen durchgeführt werden.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit eine neue molekulare Gruppe supratentorieller Hirntumore identifiziert und charakterisiert. Darüber hinaus trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der intra- und intertumoralen Heterogenität pädiatrischer Weichteilsarkome bei und sie liefert essentielle Grundlagendaten für weiterführende integrative Analysen.