

Jia xiang Jin
Dr. med.

Investigation of the *SMARCB1* regulatory pathway regarding its role in maintaining stem cell and tumor characteristics, its potential as a biomarker, and its suitability as a target for personalized therapy in patients with Epithelioid Sarcoma (EpS)

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. Thomas Grünewald

Das Epitheloide Sarkom (EpS) ist ein seltenes Malignom, das überwiegend Jugendliche und junge Erwachsene betrifft und durch einen homozygoten Verlust von *SMARCB1* (einer Untereinheit des SWI/SNF-Chromatin-Remodeling-Komplexes) vor einem ansonsten vergleichsweise stillen genomischen Mutationshintergrund gekennzeichnet ist. Der klinische Verlauf von EpS ist durch seine Komplexität geprägt, da das Verständnis der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen, die präzise und zeitnahe Diagnosestellungen sowie das Finden von effektiven Behandlungsstrategien erhebliche Herausforderungen darstellen. Diese Arbeit befasst sich mit diesen Hindernissen im Zusammenhang mit EpS und, umfassender, mit der Vielzahl epigenetisch mitbeeinflusster Krebserkrankungen, insbesondere solchen, die durch den SWI/SNF-Komplex mitverursacht werden, welche mehr als 20% aller Krebserkrankungen ausmachen. Um neue Methodiken für eine spezifische Diagnosefindung zu untersuchen, wurde eine Kohorte von 101 archivierten FFPE-Proben von Patienten mit pathologisch bestätigten EpS-Diagnosen für histologische, transkriptomische und Methylierungs-Analysen hieraus extrahierter (Bulk) Nukleinsäuren etabliert. Die methylierungsbasierte Diagnosemethode (Sarcoma-Classifer) zeigte eine hohe Übereinstimmung (68 %) mit der pathologischen Diagnose, was diese Methode als sehr effektiv zur Unterstützung der Differenzialdiagnose in der klinischen Praxis hervorhebt. Die diskordanten Fälle könnten Fehldiagnosen umfassen, z. B. aufgrund histologischer und biologischer Ähnlichkeiten mit häufigeren Entitäten wie dem Malignen Rhabdoid Tumor.

Histologische Analysen einer Test-Untergruppe innerhalb dieser Kohorte (n=12) identifizierten eine "immune-hot" Untergruppe, die sowohl durch RNA-Seq- als auch durch EPIC-Methylierungs-Array-basierte Immun-Dekonvolution-Algorithmen bestätigt werden konnte. Diese Untergruppe bestand überwiegend aus jüngeren Patienten mit primärer Erkrankung vom distalen Subtyp, die sich als besonders geeignet für eine Behandlung mit Immuntherapien erweisen könnte.

Darüber hinaus stellten sich mehrere mit Immunfunktionen assoziierte Gen-Sets in der "immune-hot" Untergruppe als hypomethyliert, d.h. stärker exprimiert, dar, was die besondere biologische Bedeutung dieser Beobachtung unterstreicht.

Im Vergleich mit RNA-Seq-basierten Herangehensweisen zeigten methylierungsbasierte Analysemethoden der Immunpopulation die stärkste Gesamtkorrelation mit histologischen, IHC-basierten Quantifizierungen. Dies deutet darauf hin, dass sie ein effektives, ergänzendes Werkzeug zur Unterstützung der klinisch-therapeutischen Entscheidungsfindung sein könnten. Nicht zuletzt könnte sich dieses Datenset als wertvoll für weiterführende, explorative Untersuchungen der biologischen Heterogenität von EpS und den darauffolgenden klinischen Überlegungen erweisen, beispielsweise im Hinblick auf Immunoseneszenz, epigenetische Altersbeschleunigung sowie Hijacking hämatologischer Entwicklungswege.

Um die Auswirkungen des *SMARCB1*-Verlusts auf die epigenetische Landschaft und seine funktionale Rolle im Kontext von Tumorigenese und der Aufrechterhaltung von Tumoreigenschaften zu untersuchen, wurde ein Multiomics-Ansatz angewandt, um die SWI/SNF-Funktionalität mithilfe einer Reihe von isogenen EpS-Zelllinienmodellen mit konditionaler *SMARCB1*-Re-Expression zu charakterisieren. Der Verlust von *SMARCB1* beeinflusste die SWI/SNF-Zusammensetzung und -Funktionalität erheblich, obwohl der verbleibende SWI/SNF (rSWI/SNF) Komplex Chromatin-Remodellierung-Funktionalität für eine Untergruppe physiologischer SWI/SNF-Loci beibehält. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung der SWI/SNF-ATPase zu einer Verringerung der Chromatin-Zugänglichkeit an diesen SWI/SNF-spezifischen cis-regulatorischen Elementen (sCRE) führte. Für verwandte Entitäten wurde bereits gezeigt, dass epigenetische Regulation einen dynamischen Prozess darstellt, bei dem ein physiologisches Gleichgewicht zwischen epigenetischen Aktivatoren und Repressoren erforderlich ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass rSWI/SNF nur eine ausreichende Affinität zu seinen stärksten physiologischen

Bindungsstellen aufrechterhalten kann und daher auch nur hier physiologische Repressoren weiterhin zu antagonisieren vermag. Folglich bleiben diese hochaffinen Chromatin-Stellen, die besonders mit Apoptoseregulation und Zell-Signalwegen assoziiert sind, offen und erhalten den EpS-Tumorphänotyp mittels dereguliertem Zellzyklus und Zellaktivierung aufrecht, wie durch transkriptomische Daten belegt werden konnte.

Zusätzlich waren sCRE, die von rSWI/SNF aktiv gehalten wurden, angereichert an Motiven von Transkriptionsfaktoren (TF), die ebenfalls mit Proliferation und Apoptoseregulation assoziiert sind, während die verlorenen sCRE stattdessen vermehrt Motive von Entwicklungs- und Homeobox-TFs aufwiesen, was einen weiteren Mechanismus für die Aufrechterhaltung von Tumoreigenschaften durch rSWI/SNF darstellen könnte. Nach der Re-Expression von *SMARCB1* wurde eine funktionale und phänotypische Veränderung hin zu einem weniger proliferativen, vermehrt mesenchymalen Zellzustand beobachtet, die durch funktionale Tests (verminderte Klonogenität, verzögerte Zellzyklusprogression und erhöhte Migration) weiter bestätigt werden konnte.

Insgesamt schien die Re-expression von *SMARCB1* direkte Auswirkungen auf die SWI/SNF-Zusammensetzung zu haben, was mit einem Anstieg aktiver Enhancer-Histonmarkierungen an sCRE einherging. Es folgt eine Wiederherstellung der Chromatin-Zugänglichkeit und eine Hochregulation von biologischen Prozessen wie zellulärer Ausreifung statt Zellzyklusprogression und DNA-Reparatur. Analysen des SWI/SNF-Interaktoms zeigen weiterhin pleiotrope Veränderungen in den Interaktionen mit Proteinen, die mit dem Östrogensignalweg sowie den TFs der AP-1-Familie assoziiert waren, wobei letztere insbesondere an sCRE-Motiven angereichert sind, die parallel mit dem Verlust von *SMARCB1* verloren gingen. Dies könnte auf direkte Interaktionen oder räumliche Nähe aufgrund veränderter Rekrutierungsmuster zu geöffneten Chromatin-Stellen hinweisen, die unter anderem auch an der Telomer Erhaltung beteiligt sind.

Darüber hinaus zeigten explorative Analysen der transkriptomischen Zell-Signaturen, jeweils nach Wiederherstellung von physiologischem SWI/SNF und nach Hemmung von rSWI/SNF, eine Herunterregulierung unreifer Zelltypen zugunsten differenzierter Zelltypen wie Fibroblasten und Muskelzellen. So waren in ChIP-Seq- und ATAC-Seq-Daten Loci angereichert, die mit der Neuralleiste assoziiert sind, was möglicherweise auf eine verwandte Phylogenie für EpS hinweist.

Sowohl die Hemmung der rSWI/SNF-Funktion als auch *SMARCB1*-Re-Expression führten zu einer Herunterregulierung von Gen-Sets, die mit DNA-Regulation assoziiert waren. *In vitro* und *in vivo* Drug-Assays zeigten zusätzlich in beiden Konditionen antiproliferative Effekte. Auf dieser Basis wurden Untersuchungen zur Immunogenität durchgeführt, welche Hinweise auf eine erhöhte NK-assoziierte Zytotoxizität in beiden Bedingungen lieferten. Dies könnte einen Anlass für weitere Untersuchungen zur zielgerichteten Kombinationstherapie von (r)SWI/SNF-Hemmung mit Immuntherapien darstellen.

Zusammenfassend hat diese Arbeit eine praxisnahe, methylierungsbasierte Pipeline zur Erhöhung der Effizienz von Diagnosestellung und Immun-Stratifizierung von EpS-Patienten untersucht und validiert, die zur Unterstützung von klinischer Entscheidungsfindung herangezogen werden könnte. Es konnten Hinweise für den Mechanismus epigenetisch getriebener Tumorigenese geliefert werden, die die kanonische, binäre Unterscheidung in (Proto-)Onkogene und Tumorsuppressorgenen für epigenetische Modulatoren wie den SWI/SNF-Komplex in Frage stellt. Diese Daten schaffen eine Grundlage für zukünftige Studien zur komplexen Deregulierung von Genexpression und Zellidentität, die durch epigenetische Alterationen ausgelöst werden kann.