

Fortschritt in der molekularen Tumordiagnostik

Die DNA-Methylomanalyse

Dr. med. Jürgen Hench^a, Prof. Dr. med. Markus Tolnay^a, Prof. Dr. med. Stephan Frank^a^a Abteilung Neuropathologie, Institut für Medizinische Genetik und Pathologie, Universitätsspital Basel

Das Editorial zu diesem Artikel finden Sie auf S. 134 in dieser Ausgabe.

Seit Kurzem erlaubt die genomweite DNA-Methylierungsanalyse Tumortypisierungen mit hoher diagnostischer Präzision. Die Technologie kann auch zur Bestimmung wichtiger prädiktiver und prognostischer Marker herangezogen werden und wird damit zunehmend zu einem unverzichtbaren Bestandteil der interdisziplinären Betreuung von Tumorpatienten.

Einführung

Während der Entwicklung undifferenzierter Stammzellen in differenzierte Zell- respektive Gewebetypen werden spezifische Genaktivitäten benötigt. Diese werden durch chemische Modifikationen von DNA-Bausteinen wie auch Histonproteinen reguliert. Der genetische Code wird hierdurch nicht beeinflusst; man spricht daher von epigenetischen Veränderungen (siehe Glossar in Tabelle 1).

Die aus den chemischen Modifikationen resultierenden epigenetischen Profile sind gewebespezifisch und werden zusätzlich durch tumorassoziierte Mutationen

beeinflusst. Epigenetische Profile sind damit oftmals tumorspezifische Signaturen – ein Umstand, dem in der personalisierten onkologischen Medizin aktuell ein hoher diagnostischer Stellenwert zukommt. Insbesondere die Erhebung genomweiter *DNA-Methylierungsprofile* (Tab. 1) erlaubt dabei nicht nur die präzise entitätsspezifische diagnostische Einordnung innerhalb eines weiten Tumorspektrums (Karzinome, Sarkome, Hirntumoren, Melanome, lymphoproliferative Neoplasien), sondern kann über die gleichzeitige Bestimmung wichtiger prädiktiver Marker vielfach auch massgeblich zur Therapieoptimierung beitragen. In der Folge erübrigen sich viele der bisher in diesem Zusam-

Tabelle 1: Glossar.

CUP-Syndrom: Das Auftreten von Metastasen ohne bekannten Primärtumor («cancer of unknown primary»). Manchmal lassen sich metastatische Absiedlungen nicht mit histologischen, sondern nur mit molekularen Methoden einem Ursprungsgewebe zuordnen.

DNA-Methylierung: Betrifft vor allem den in Promoter-Abschnitten häufigen DNA-Baustein Cytosin. Hypermethylierte Promotoren sind für Transkriptionsfaktoren schlecht zugänglich und daher mit einer reduzierten Aktivität nachgeschalteter Genabschnitte assoziiert.

DNA-Microarray: Miniaturisierte molekulare Untersuchungssysteme zur gleichzeitigen Quantifizierung Tausender vordefinierter Nukleinsäureabschnitte. Dadurch können ausser Kopienzahlveränderungen und gewissen Punktmutationen auch methylierte von nichtmethylierten DNA-Abschnitten unterschieden werden.

Epigenetische Veränderungen: Durch chemische Modifikation des DNA-Bausteins Cytosin (Methylierung) bzw. von Histonproteinen (Azetylierung, Methylierung) wird die Zugänglichkeit von DNA-Abschnitten für Transkriptionsfaktoren und damit die Aktivität dort kodierter Gene reguliert.

FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Die Methode kommt u.a. zur Erfassung von Genamplifikationen (z.B. des HER2-Gens) zum Einsatz.

«Machine learning»: Dient in Computersystemen zur Generierung von Wissen aus Erfahrung. Die zugrunde liegenden Algorithmen «lernen» aus Beispielen, verallgemeinern diese und können dadurch anschliessend neue, unbekannte Daten klassifizieren.

Nanopore-Technologie: Nukleinsäure-Sequenzierverfahren; misst die beim Durchtritt von Nukleotiden durch biosynthetische Nanoporen entstehenden elektrische Signale. Das Prinzip ähnelt dem in der Hämatologie gebräuchlichen Coulter-Counter (Blutzellen-Zähler).

Prädiktive Genamplifikation: Tumoren mit Amplifikationen von Wachstumsfaktor-Rezeptoren-Genen zeigen häufig eine Überaktivität nachgeschalteter Signaltransduktionswege, woraus sich therapeutische Angriffspunkte ergeben können (z.B. Herceptin-Therapie des HER2-amplifizierten Mammakarzinoms).

TCGA («The Cancer Genome Atlas»): US-amerikanisches Grossprojekt zur Erhebung und Katalogisierung genetischer Mutationen bei Krebserkrankungen. Die erhobenen Daten, darunter auch Tumor-DNA-Methylierungsprofile, stehen teilweise öffentlich zur Verfügung.

UMAP («uniform manifold approximation and projection»): Algorithmus zur Dimensionsreduktion multidimensionaler Datensätze, z.B. genomweiter DNA-Methylierungsmuster. Dient u.a. der unüberwachten Bestimmung der Ähnlichkeit von Datensätzen innerhalb eines Datenkollektivs. Weiterentwicklung von t-SNE («t-distributed stochastic neighbour embedding»).



Jürgen Hench

menhang erforderlichen, oftmals zeit- und kostenaufwendigen immunhistochemischen und molekularen Zusatzanalysen, sodass sich die DNA-Methylomanalyse auch unter ökonomischen Aspekten zunehmend als attraktive diagnostische Modalität anbietet. Bereits heute sind die der methylombasierten Tumorklassifikation zugrunde liegenden «*machine learning*»-Algorithmen (Tab. 1) in ihrer Trennschärfe der konventionellen histologisch-immunhistochemischen Diagnostik deutlich überlegen. Im Folgenden möchten wir neben dem zugrunde liegenden Prinzip vor allem auch das Potenzial dieser Methode diskutieren.

Methylomanalyse

Die Methylomanalyse basiert auf *DNA-Microarrays* («Infinium Methylation BeadChips», Illumina®) (Tab. 1), welche die DNA-Methylierung an aktuell zirka 850 000, vorzugsweise innerhalb von Promotor-Regionen lokalisierten Stellen im Genom erfassen. Die Array-Rohdaten können ausserdem zu einem genomischen Kopienzahlprofil verrechnet werden. Dieses Profil (Abb. 1) kann als Befund durch den Pathologen diagnostisch interpretiert werden und erlaubt damit beispielsweise

die Detektion *prädiktiver Genamplifikationen* (z.B. EGFR, CDK4/6 bei Gliomen; ERBB2/HER2 bei Mammakarzinomen) (Tab. 1).

Allerdings ist eine Interpretation der Methylierungswerte hinsichtlich Einzelgen-Aktivität nicht möglich. Zwar gilt generell, dass hypermethylierte Promotor-Abschnitte zu einer Herunterregulation des betreffenden Gens führen, jedoch kann aus dem DNA-Methylierungsmuster nicht direkt auf die Expression spezifischer Gene rückgeschlossen werden, da neben der DNA-Methylierung zahlreiche weitere epigenetische und funktionelle Mechanismen einschliesslich Mutationen die Proteinexpression beeinflussen.

Im Gegenzug eignet sich die Struktur der Datensätze hervorragend für vergleichende Analysen mit Referenz-Fallkollektiven durch «*machine learning*». Die zugrunde liegenden Algorithmen erweisen sich sowohl bei der Zusammenstellung geeigneter Referenz-Fallkollektive als auch im diagnostischen Kontext als essentiell (Abb. 2).

Im Falle einer aktuell unmöglichen Klassifikation durchlaufen die Datensätze fortlaufend eine Art Schleife, bis sie bei Detektion von Ähnlichkeit mit weiteren, oftmals dann sehr seltenen Fällen aufgrund

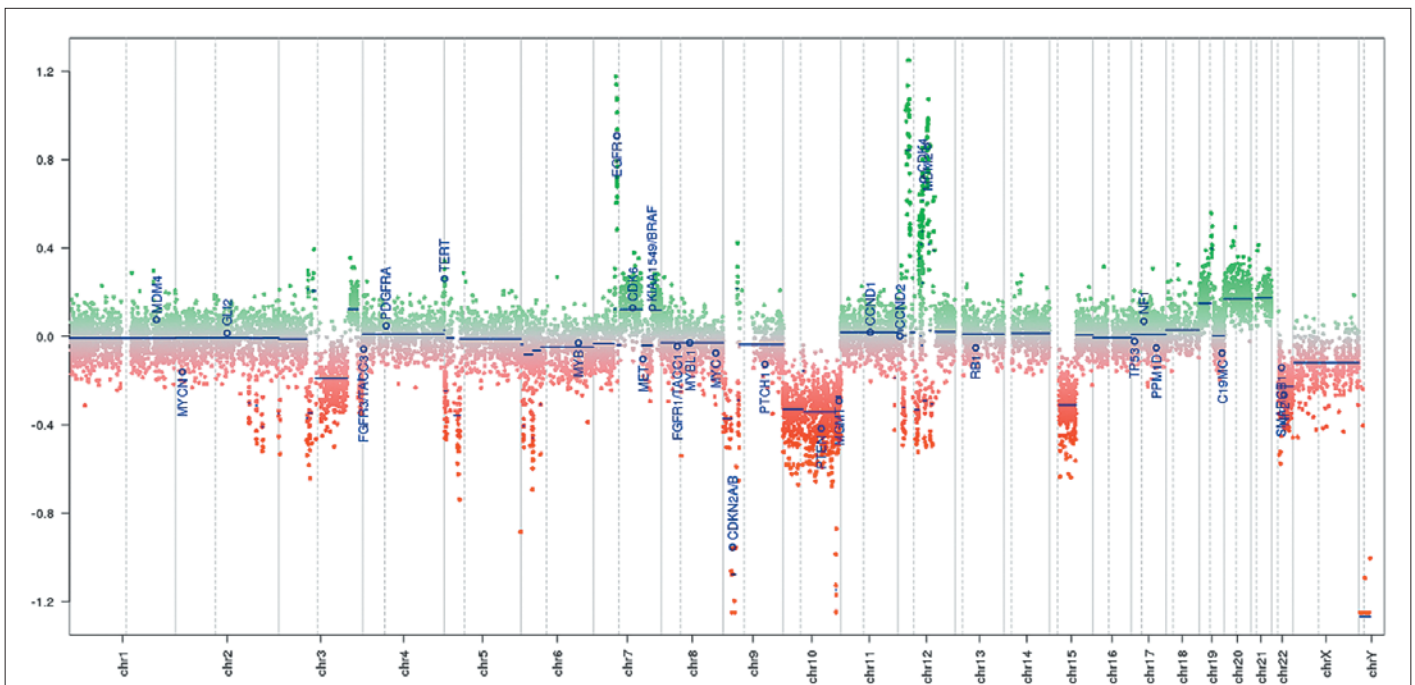


Abbildung 1: Genomisches Kopienzahlprofil.

X-Achse: Dargestellt sind die Chromosomen 1–22 sowie X und Y (von links nach rechts).

Y-Achse: Die Nulllinie entspricht einem diploiden Zustand (2n); der Wert –0,5 signalisiert dabei den Verlust einer Kopie (1n), während +0,5 den Zugewinn einer Kopie (3n) anzeigt. Diese Werte beziehen sich auf einen Tumorzellgehalt von 100% und werden daher in Biopsien aufgrund der Beimischung nicht-neoplastischer Zellen praktisch nicht erreicht.

Hier gezeigt ist das Kopienzahlprofil eines Glioblastoms, IDH-Wildtyp (WHO-Grad IV) des molekularen Subtyps RTKII («receptor tyrosine kinase II»).

Man erkennt Zugewinne im Bereich von Chromosom 7 sowie den Verlust einer Kopie des Chromosoms 10. Zusätzlich lassen sich eine prädiktive EGFR-Genamplifikation (auf Chromosom 7), ferner auch Amplifikationen von CDK4 und MDM2 (Chromosom 12) sowie ein Verlust von CDKN2a/b (Chromosom 9) ablesen. Berechnung und Erstellung des Plots mittels der freien Software conumee (<http://bioconductor.org/packages/conumee/>).

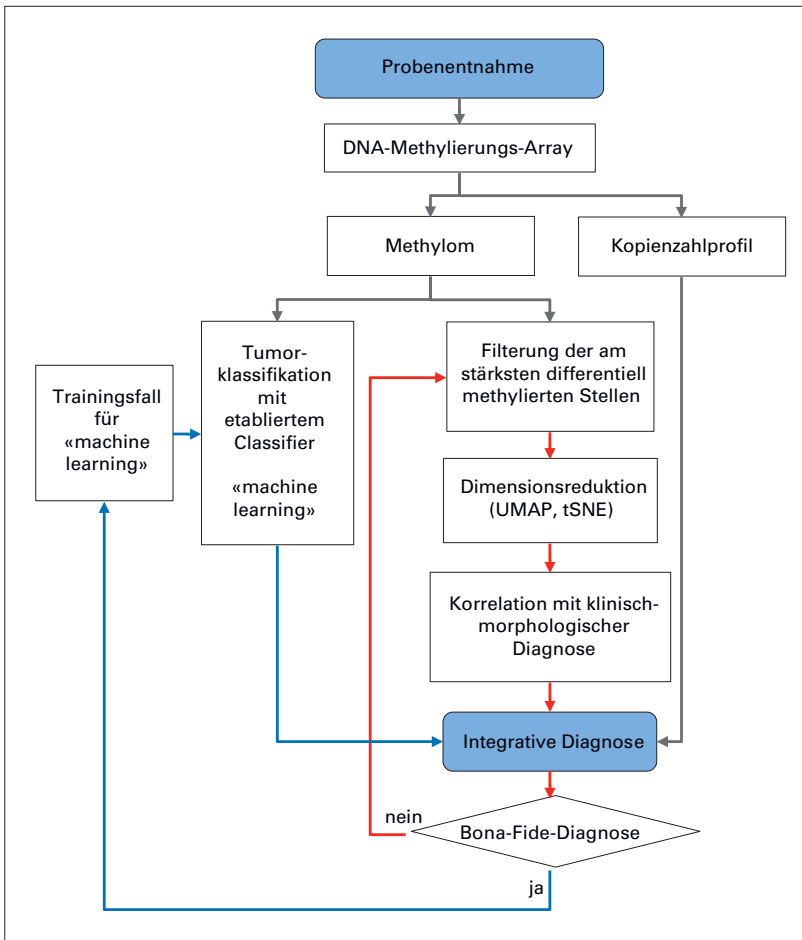


Abbildung 2: Ablauf der Methylomdiagnostik. Abweichend von der klassischen pathologischen Diagnostik endet diese nicht mit der Diagnosestellung, sondern alle Fälle verbleiben im lernenden System. Der rot markierte Kreislauf beinhaltet potentielle neue diagnostische Entitäten, während der blaue den Beitrag detailliert annotierter Proben symbolisiert. Die in klassischer Berichtsform übermittelte integrative Diagnose basiert auf der Synthese klinischer Angaben, der Resultate konventioneller histologisch-immunohistochemischer Untersuchungen, molekularer Zusatzuntersuchungen sowie der DNA-Methylomdiagnostik. UMAP: «uniform manifold approximation and projection»; tSNE: «t-distributed stochastic neighbour embedding».

ihres spezifischen Methylierungsprofils diagnostisch einer neuen Entität zugeordnet werden können. Für Patienten und behandelnde Kliniker bedeutet dies, dass ein seltener Tumor, der sich heute noch nicht abschliessend einer bekannten Art zuweisen lässt, in naher Zukunft durchaus einer molekular exakt definierten Entität zuordnen lassen wird. Dies eröffnet eine neue Dimension der personalisierten Medizin, da potentiell aus jedem erfassten Datensatz nützliche Informationen für die Weiterentwicklung der Klassifikationsalgorithmen mittels «machine learning» extrahiert werden können. In klassischer Nomenklatur ausgedrückt findet in den Computersystemen fortwährend eine Wiederbegutachtung statt, sodass alle Diagnosen im System stets auf aktuellstem Stand gehalten werden.

Im Unterschied zur klassischen morphologischen Diagnostik zeigen Methylierungsmuster objektiv an, wenn sich innerhalb einer histologischen Diagnosekategorie diverse, morphologisch nicht unterscheidbare molekulare Entitäten verbergen oder wenn Tumoren mit gleicher Liniendifferenzierung, aber variablem histologischem Erscheinungsbild in einen molekularen Typ zusammenfallen [1].

Als Vorreiter in der allgemeinpathologisch-diagnostischen Nutzung epigenetischer Veränderungen konnte ein auf Methylomdatensätzen des TCGA (Tab. 1) beruhender Algorithmus erarbeitet werden, der zwischen häufigen Karzinomen, Melanomen, Sarkomen, Meningeomen, Gliomen sowie einigen wenigen hämatolymphoiden Neoplasien unterscheiden konnte [2]. Damit diente dieser Algorithmus vor allem der Primarius-Zuordnung beim CUP-Syndrom (Tab. 1). Als Weiterentwicklung steht für die Zuordnung von Metastasen zu Primarien seit Kurzem die UMAP-Plot-Analyse (Tab. 1, Abb. 2) zur Verfügung, mittels derer bei jeder Diagnosestellung auf eine tagesaktuelle Methylomdatenbank zugegriffen wird. Der UMAP-Algorithmus (<http://arxiv.org/abs/1802.03426>) ermöglicht es uns, unklare Fälle gleichzeitig sowohl mit etablierten diagnostischen Referenz-Fallkollektiven als auch mit bislang nicht klassifizierbaren Fällen zu vergleichen. Gegenwärtig erfolgt bei uns ein Abgleich gegen mehr als 14500 Methylomdatensätze verschiedenster Tumorentitäten, wodurch bereits jetzt ein ausserordentlich breites diagnostisches Spektrum abgedeckt wird. Für UMAP inklusive der vorgeschalteten Datenaufbereitung wird ausschliesslich freie Software verwendet, und auf Anfrage stellen wir gerne unsere eigenen Ergänzungen (Quellcode) zur Verfügung. Die Erstellung einer öffentlich zugänglichen Quelle oder eines Servers ist in Planung.

Am weitesten fortgeschritten sind die methylombasierten Diagnoseverfahren auf dem Gebiet der Neuropathologie. So findet an unserem Institut bereits seit 2017 der öffentlich zugängliche «Brain Tumor Methylation Classifier» routinemässig Anwendung (<http://www.molecularneuropathology.org> [MNP]) [1]. Wir nutzen dieses Werkzeug in der Diagnostik sämtlicher Tumoren des Zentralnervensystems einschliesslich der Meningeomen, der Hypophyse sowie der peripheren Nervencheiden in Zusammenschau mit der Histomorphologie. Die ausserordentlich hohe diagnostische Trennschärfe dieses Hirntumor-Classifiers gewährleistet ein bislang unerreichtes Mass an diagnostischer Präzision. Daneben gelingt mit dem «Meningioma Methylation Classifier» [3] neben der exakten diagnostischen Zuordnung die Aufteilung in prognostisch und prädiktiv relevante Subtypen [4]; diese histologieunabhängige Prognoseeinschätzung hat sich im Vergleich

zur morphologisch basierten Gradierung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als aussagekräftiger erwiesen [3]. Seit 2018 steht auf MNP auch ein Weichteiltumor-Classifer zur Verfügung, mit dem sich neben Sarkomen auch Tumoren des peripheren Nervensystems (u.a. Schwannome, Neurofibrome, maligne periphere Nervenscheidentumoren) reproduzierbar einordnen lassen. Auch dezidierte Methylierungs-Classifier für histologisch kaum oder nicht beantwortbare Fragestellungen (Adenokarzinome der Lunge und des Darms; Plattenepithelkarzinome nach Ursprung) wurden bereits erstellt [5, 6].

Ausblick

Die Präzision der Methylomklassifizierung wird vorrangig durch die Qualität der Referenzdatensätze bestimmt, was die akribische, derzeit jedoch finanziell nicht vergütbare Kurierung der Annotation durch Experten beinhaltet. Hierdurch ergibt sich ein medizinisch-wirtschaftliches Spannungsfeld. Hinzu kommt, dass die Kosten für die Tumormethylomanalyse bereits heute signifikant tiefer sind als diejenigen für Kombinationen aus Immunhistochemie, *FISH* (Tab. 1) und diagnostischer Gensequenzierung.

Dies kann durchaus auch zu kommerziell motivierten Einschränkungen des öffentlichen Zugangs zu bereits etablierten Classifier-Systemen [2] führen. Auch die Monopolstellung des Array-Herstellers (Illumina®) ist nicht zu unterschätzen, wenngleich sie wohl auch der Schlüssel zur Etablierung der Methylomdiagnostik war. Als positiv ist in diesem Kontext die Entwicklung einer alternativen Methode mittels *Nanopore*-Geräten (Oxford Nanopore Technologies) zu werten (Tab. 1) [7]. Die Kosten für die Anschaffung und Verbrauchsmaterialien dieser ursprünglich auch für die Feldforschung konzipierten Technologie liegen deutlich unter dem finanziellen Aufwand für Immunhistochemie, *FISH* und konventionelle Parallelsequenzierung, was den Einsatz von Nanopore per Laptop auch in entwicklungsschwächeren Regionen als realistisches Szenario erscheinen lässt. Ein weiterer Vorteil der Nanopore-Technologie könnte in kurzen Probenbearbeitungszeiten liegen: Während die beschriebene DNA-Microarray-basierte Methylomanalyse je nach Probendurchsatz 1–3 Wochen in Anspruch nimmt, ist mit der Nanopore-Sequenzieretechnologie eine diagnostische Tumorklassifikation innert 6–10 Stunden nach Gewebeentnahme durchaus erreichbar. Erste inhäusige Tests mit aus Nativgewebe isolierter DNA verliefen erfolgreich; ein Protokoll zur Verwendung von paraffineingebettetem Gewebe, das auch die Analyse archivierter Tumorproben erlauben würde, wird derzeit von den Autoren getestet.

Grundsätzlich lässt sich die Methylomanalyse aufgrund der hohen Stabilität der DNA-Methylierung sowohl an Nativgewebe als auch an archiviertem Paraffingewebe durchführen. Im Gegensatz zu Mutationsanalysen liefern Methylomdatensätze integrative Informationen über veränderte Signalwege in neoplastischen sowie reaktiven Zellen und beleuchten damit ebenfalls das lange Zeit vernachlässigte Tumormikromilieu. Daraus ergeben sich potentiell klinisch höchst relevante Anwendungsgebiete jenseits der bereits diskutierten diagnostischen Tumorklassifikation, wie beispielsweise prädiktive Aussagen hinsichtlich des Tumorsprechens auf Immuntherapien. Darüber hinaus rücken derzeit neben Tumorerkrankungen zunehmend auch reaktive und degenerative Krankheitsbilder in den Fokus der Methylomanalysen. Erste potentiell diagnostisch verwertbare epigenetische Veränderungen wurden hier bereits nachgewiesen.

Das Berufsbild Tumorerkrankungen diagnostizierender Pathologen wird sich zunehmend vom Einzelfalldiagnostiker zum Globalkurator mit hochspezialisierter Fachexpertise wandeln.

Im Gegensatz zur klassischen pathomorphologischen Diagnostik lassen sich alle jemals erzeugten Methylomdatensätze stets gegeneinander abgleichen. Durch fortlaufende Datenkurierung durch Experten «erlernt» ein System die seltensten Diagnosen, um diese dann auch in ebensolchen Einzelfällen stellen zu können. Das Berufsbild Tumorerkrankungen diagnostizierender Pathologen wird sich dadurch zunehmend vom Einzelfalldiagnostiker zum Globalkurator mit hochspezialisierter Fachexpertise wandeln. So wurden vor Kurzem durch die WHO erstmals Tumor-entitäten auch aufgrund ihrer Methylierungsprofile mit bislang nicht dagewesener Objektivität definiert und in entsprechende Klassifikationen aufgenommen. Auch können Patienten, deren Tumormethylom zum Zeitpunkt der Erhebung noch keiner Entität zugewiesen werden konnte, im Falle einer später entdeckten Übereinstimmung informiert werden. Damit stellt die Methylomdiagnostik wohl die am weitesten fortgeschrittene Modalität der sogenannten «digitalen Pathologie» dar, die unter anderem den Anspruch erhebt, Krankheiten möglichst ganzheitlich, weltweit vergleichend und mit höchster Objektivität einzuordnen. In diesem Kontext betrachtet, stellt die Methylomdiagnostik schon heute nicht nur für uns Pathologen, sondern auch alle mit uns interagierenden Fachdisziplinen eine beträchtliche Herausforderung und zugleich grosse Chance dar.

Korrespondenz:
Prof. Dr. med. Stephan Frank
Institut für Medizinische
Genetik und Pathologie
Universitätsspital Basel
Schönbeinstr. 40
CH-4031 Basel
stephan.frank[at]usb.ch

Das Wichtigste für die Praxis

- Die DNA-Methylomanalyse erlaubt eine objektive, technisch robuste und dadurch sehr reproduzierbare Tumordiagnostik. Die zugrunde liegenden «machine learning»-Algorithmen ermöglichen eine kontinuierlich wachsende Präzision in der Diagnostik nahezu aller Tumoren des Zentralnervensystems, aber auch zahlreicher Karzinome, Nervenscheiden- und Weichteiltumoren (Sarkome), Melanome und hämatolymphoider Neoplasien.
- Beim CUP-Syndrom gelingt vielfach die Zuordnung zum Primarius.
- Die Methode eignet sich auch zur Bestimmung wichtiger prognostischer und prädiktiver Marker (HER2, EGFR, MLH1, MGMT, LOH 1p/19q, usw.).
- Die Technik funktioniert mit Proben in Paraffin; Nativgewebe ist jedoch, sofern vorhanden, zu bevorzugen.
- Die Kosten für eine Methylomdiagnostik sind vergleichsweise niedrig; sie entsprechen in etwa denen einer FISH-Untersuchung und sind damit niedriger als bei «next generation sequencing»-Analysen.

Disclosure statement

Die Autoren haben keine finanziellen oder persönlichen Verbindungen im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

Literatur

- 1 Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018;555(7697):469–74.
- 2 Moran S, Martínez-Cardús A, Sayols S, Musulén E, Balañá C, Estival-Gonzalez A, et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2016;17(10):1386–95.
- 3 Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, Jones DT, Hielscher T, Schefzyk S, et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2017;18(5):682–94.
- 4 Paramasivam N, Hübschmann D, Toprak UH, Ishaque N, Neidert M, Schrimpf D, et al. Mutational patterns and regulatory networks in epigenetic subgroups of meningioma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019;138(2):295–308.
- 5 Jurmeister P, Bockmayr M, Seegerer P, Bockmayr T, Treue D, Montavon G, et al. Machine learning analysis of DNA methylation profiles distinguishes primary lung squamous cell carcinomas from head and neck metastases. *Sci Transl Med*. 2019;11(509):eaaw8513.
- 6 Jurmeister P, Schöler A, Arnold A, Klauschen F, Lenze D, Hummel M, et al. DNA methylation profiling reliably distinguishes pulmonary enteric adenocarcinoma from metastatic colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2019; 32(6):855–65.
- 7 Euskirchen P, Bielle F, Labreche K, Kloosterman WP, Rosenberg S, Daniau M, et al. Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2017;134(5):691–703.