

Abstract:

Gliomas are primary tumors of the central nervous system. Diagnosis and therapy recommendations are difficult, because of the intertumoral heterogeneity of glial tumors. Current World Health Organization classification of gliomas is based on the pathomorphological and molecular characteristics of the tumor biopsy. Diagnosis is based on pathomorphological features (diffusiveness, proliferation index, a presence of necrosis) and upon specific genetic alterations detected in the tumor, which leads to specific recommendations for the therapy. Next generation sequencing (NGS) is a valuable tool to improve diagnostics of brain tumors.

Traditional tissue biopsy might not present complete mutational spectrum in case of such heterogenic tumors, so alternative methods are being tested to enable more holistic view of each disease. When traditional biopsy or tumor resection are not possible, a liquid biopsy would be of great assistance to clinical practice. Liquid biopsy is a use of bodily fluids to isolate circulating cell free nucleic acids or circulating tumor cells to detect cancer markers for diagnostics, disease monitoring or prognostic. In case of primary brain tumors, cerebrospinal fluid can contain more circulating cell free DNA (cfDNA) or RNA (cfRNA) originating from the tumor, but a lumbar puncture may have side effects, so it is rarely performed on heavily symptomatic primary brain tumor patients.

We sought to evaluate if improvements in cfDNA isolation, library preparation and targeted sequencing would provide reliable information regards genetic alterations in glioblastoma (GBM), most common and deadly primary brain tumor. After analysis of blood derived cfDNA potentially pathogenic variants were detected in 37/84, which based upon the current literature is an improvement from most of the studies.

We employed a target gene panel encompassing 668 cancer-related genes and NGS to a set of diagnostically difficult pediatric glioma tumors. The analysis of DNA isolated from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) sections originating from those tumors yielded the whole spectrum of potentially pathogenic mutations, some interesting variants were found, that could be further studied (*MTUS*, *FANCA*, *RET*).

Tumor-derived cell cultures are valuable *in vitro* system to study tumorigenesis and screen for therapeutics, however it is not fully known if tumor cells keep their

genetic alterations and cultured clones reflect molecular profile of an original tumor. Comparative analysis of somatic mutations present in tumor-derived cell lines and/or original tumors have shown some differences in variant profiles, cell cultures contained more detectable somatic mutations.

This can indicate that some somatic variants can be missed in the tissue biopsy, due to its complexity as tumor contains healthy cells, microglia and macrophages that can make background noise decreasing the tumor variants detectability.

On the other hand, tumor stem cells can possibly gain mutations during cell culture, as their DNA repair pathways are frequently malfunctioning, and mitosis is maximized by artificial growth factors.

The current classification of gliomas is based upon tumor genotyping. Current diagnostic tests employ molecular analysis of DNA isolated from FFPE or frozen tumor samples. There are many ongoing clinical and research studies improving current diagnostic methods with the aim to create personalized therapy recommendations with use of both blood derived cfDNA and tumor derived cell cultures. Present study demonstrates how tumor derived cell lines and blood derived cfDNA can offer an insight on tumor genetic heterogeneity.

Streszczenie:

Glejaki to pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. Prawidłowa diagnostyka i terapia tych guzów jest utrudniona ze względu na heterogenność guzów i obecność klonów komórek o różnym genotypie. Obecna klasyfikacja glejaków Światowej Organizacji Zdrowia opiera się na patomorfologicznych i molekularnych cechach materiału z biopsji guza. Rozpoznanie dokonuje się na podstawie cech patomorfologicznych (dyfuzyjność, wskaźnik proliferacji, obecność martwicy) oraz wykrytych w guzie specyficznych zmian genetycznych, co prowadzi do sformułowania konkretnych zaleceń terapeutycznych. Sekwencjonowanie nowej generacji jest cennym narzędziem usprawniającym diagnostykę guzów mózgu.

Tradycyjna biopsja może nie przedstawiać pełnego spektrum mutacji w przypadku heterogennych guzów, dlatego testowane są alternatywne metody, które umożliwią bardziej całościowe spojrzenie na chorobę. Gdy tradycyjna biopsja lub resekcja nie są możliwe, biopsja płynna byłaby bardzo pomocna w praktyce klinicznej. Biopsja płynna to wykorzystanie płynów ustrojowych do wyizolowania kwasów nukleinowych wolnych od krążących komórek lub krążących komórek nowotworowych w celu wykrycia markerów nowotworowych, które mogą być przydatne w diagnostyce, monitorowaniu choroby lub ustalaniu prognozy. W przypadku pierwotnych guzów mózgu płyn mózgowo-rdzeniowy może zawierać więcej wolnego krążącego DNA (cfDNA) lub RNA (cfRNA) pochodzącego z guza, ale nakłucie lędźwiowe może mieć skutki uboczne, dlatego rzadko wykonuje się je u pacjentów z wyraźnymi objawami pierwotnego guza mózgu.

W naszych badaniach staraliśmy się ocenić, czy ulepszenia w izolacji cfDNA, przygotowaniu biblioteki i ukierunkowanym sekwencjonowaniu dostarczyłyby wiarygodnych informacji dotyczących zmian genetycznych w glejaku wielopostaciowym (GBM), najczęstszym i śmiertelnym pierwotnym guzie mózgu.

Po analizie cfDNA pochodzącego z krwi wykryto potencjalnie patogenne warianty w 37/84, co w oparciu o aktualną literaturę stanowi poprawę w stosunku do większości badań.

Zastosowaliśmy panel genów obejmujący 668 genów związanych z rakiem i sekwencjonowanie nowej generacji do ustalenia spektrum mutacji w trudnych diagnostycznie glejakach dziecięcych. Analiza DNA wyizolowanego ze skrawków

utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) pochodzących z tych guzów ujawniła pełne spektrum potencjalnie patogennych mutacji. Znalezione kilka interesujących wariantów w genach *MTUS*, *FANCA*, *RET*, które powinny być dalej badane.

Hodowle komórkowe pochodzące z guza są cennym systemem *in vitro* do badania powstawania nowotworów i badań przesiewowych pod kątem substancji terapeutycznych. Jednak nie do końca wiadomo, czy komórki nowotworowe zachowują swoje zmiany genetyczne, a kłony komórek w hodowli reprezentują pierwotny nowotwór. Analiza porównawcza mutacji somatycznych obecnych w hodowlach wyprowadzonych od pacjentów GBM wykazała pewne różnice w profilach wariantów, a hodowle komórkowe zawierały więcej wykrywalnych mutacji somatycznych. Może to wskazywać, że niektóre warianty somatyczne mogą zostać pominięte w biopsji z guza ze względu na jej różnorodność, ponieważ guz zawiera zdrowe komórki, mikroglej i makrofagi, które mogą powodować szum tła zmniejszający wykrywalność wariantów guza. Z drugiej strony nowotworowe komórki macierzyste mogą prawdopodobnie uzyskać mutacje podczas hodowli komórkowej, ponieważ ich szlaki naprawy DNA często działają nieprawidłowo, a mitozą jest maksymalizowana przez egzogenne czynniki wzrostu.

Obecna klasyfikacja glejaków opiera się na genotypowaniu. Stosowane testy diagnostyczne wykorzystują analizę molekularną DNA wyizolowanego z FFPE lub zamrożonych próbek guza. Prowadzonych jest wiele badań klinicznych i podstawowych, których celem jest udoskonalenie obecnych metod diagnostycznych z wykorzystaniem zarówno cfDNA pochodzącego z krwi, jak i hodowli komórek nowotworowych w celu uzyskania zaleceń terapeutycznych w medycynie spersonalizowanej. Przedstawione w rozprawie wyniki badań pokazują, że zarówno linie komórkowe wyprowadzone z guza, jak i cfDNA pochodzące z krwi, dostarczają wiarygodnych informacji na temat heterogenności genetycznej guza, mogą ujawnić więcej potencjalnie patogennych wariantów, które należy wziąć pod uwagę, niż tradycyjna biopsja guza.