

Abschlussbericht an die Hamburger Krebsgesellschaft e. V.

Förderprojekt:

Verbesserte Diagnose der aggressiven Variante des Prostatakarzinoms durch Profiling epigenetischer Veränderungen in zirkulierender DNA

Antragsteller:

Prof. Dr. Gunhild von Amsberg, PD Dr. Stefan Werner

1. Zielsetzung des Projekts

Ziel des geförderten Forschungsprojekts war die Entwicklung eines standardisierten, blutbasierten Verfahrens zur verbesserten Diagnose aggressiver Varianten des Prostatakarzinoms (AVPC). Diese Tumorentitäten sind durch eine rasche Progression, ein atypisches Metastasierungsmuster sowie eine geringe Expression des prostataspezifischen Antigens (PSA) gekennzeichnet und werden daher im klinischen Alltag häufig verzögert erkannt.

Auf Basis aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse wurde die Hypothese verfolgt, dass epigenetische Veränderungen – insbesondere DNA-Methylierungsmuster – eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression von AVPC spielen und sich als Biomarker in der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) eignen. Ziel war es daher, Methylierungsmuster in zellfreier DNA (cfDNA) aus Blutplasma mit Nanopore-Sequenzierung zu analysieren und deren diagnostisches Potenzial für aggressive und neuroendokrine Prostatakarzinome (NEPC) zu evaluieren.

2. Durchführung des Projekts und Methodik

Die Studie wurde entsprechend dem beantragten Arbeitsprogramm durchgeführt. Grundlage bildeten bereits vorhandene, gut charakterisierte Patientenkohorten mit AVPC, NEPC, metastasiert kastrationsresistentem sowie hormon-sensitivem Prostatakarzinom sowie gesunde Kontrollen. Aus den verfügbaren Plasmaproben wurde cfDNA isoliert und für weiterführende Analysen aufbereitet.

Zur Analyse der DNA-Methylierung wurde ein zweistufiger Ansatz verfolgt:

1. Anreicherung methylierter DNA-Materials mittels immunbasierter Verfahren (MeDIP bzw. MBD2-basierte Capture-Systeme).
2. Sequenzierung mittels Oxford-Nanopore-Technologie zur direkten Detektion von Methylierungsereignissen auf cfDNA.

Begleitend wurden umfangreiche methodische Optimierungen durchgeführt, insbesondere im Rahmen einer Masterarbeit. Ergänzend kamen Zelllinienmodelle und Kontrollproben zum Einsatz.

3. Ergebnisse und Machbarkeitsanalyse

Im Rahmen des Projekts konnte gezeigt werden, dass die Isolierung von cfDNA aus Patientenplasma zuverlässig möglich ist und grundsätzlich eine geeignete Grundlage für molekulare Analysen darstellt. Analysen an Prostatakarzinom-Zelllinien, die unterschiedliche Krankheitsstadien repräsentieren, bestätigten zudem das Vorliegen krankheitsspezifischer DNA-Methylierungsmuster.

Die geplante Anreicherung methylierter DNA-Materials erwies sich jedoch als technisch limitiert. Insbesondere zeigte sich, dass die Effizienz der Sequenzierung nach Anreicherung der methylierten cfDNA deutlich reduziert war. Ursachen hierfür waren unter anderem DNA-Verluste während der Anreicherung sowie Inkompatibilitäten einzelner Reagenzien mit der Nanopore-Sequenzierung, die zu einer unzureichenden Sequenzierqualität führten. Trotz umfangreicher Optimierungsversuche konnte dieses Problem innerhalb der Förderperiode nicht vollständig behoben werden.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde entschieden, auf die Anreicherung zu verzichten und die isolierte cfDNA direkt mittels Nanopore-Sequenzierung zu analysieren. In diesem Ansatz konnten cfDNA-Proben von Patienten mit AVPC, NEPC und metastasiert kastrationsresistentem Prostatakarzinom erfolgreich sequenziert werden. Für den Großteil der Proben wurden verwertbare Sequenzdatensätze mit einer Datenmenge von ca. 0,1–0,4 Gb pro Probe generiert.

In einem kürzlich publizierten Beitrag wurde die erfolgreiche Sequenzierung bisulfit-konvertierter ctDNA zur Identifikation molekularer Subtypen des Prostatakarzinoms beschrieben. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde versucht, die dort publizierten, subtypspezifischen Sequenzsignaturen in den im Projekt generierten Nanopore-Datensätzen wiederzufinden. Dies war trotz korrekter Durchführung der experimentellen Schritte nicht möglich. Die Analysen deuten darauf hin, dass die mittels Nanopore-Sequenzierung erzielte Sequenztiefe für bisulfit-konvertierte ctDNA nicht ausreichend ist, um die in der Publikation beschriebene bioinformatische Auswertung zuverlässig anzuwenden.

Als methodische Kontrolle wurde, die im genannten Beitrag etablierte Sequenzier- und Analysepipeline unabhängig von dieser Förderung im Rahmen der Career-Booster-Förderung durch das MSNZ von PD Dr. Stefan Werner erfolgreich implementiert und getestet. Dies spricht dafür, dass die beobachteten Limitationen primär auf die Sequenzier-technologie und nicht auf die Probenaufarbeitung oder bioinformatische Methodik zurückzuführen sind.

In der Folge wurde der Fokus der Datenanalyse auf die Identifikation krebsassoziierter genomischer Alterationen gelegt. Dabei konnten insbesondere Copy-Number-Aberrationen detektiert werden, die mit bekannten Mustern aggressiver und neuroendokriner Prostatakarzinome übereinstimmen. Diese Analysen waren insbesondere in Proben mit einem hohen Anteil tumorassoziierter DNA in der zirkulierenden cfDNA erfolgreich und aussagekräftig (Abbildung 1).

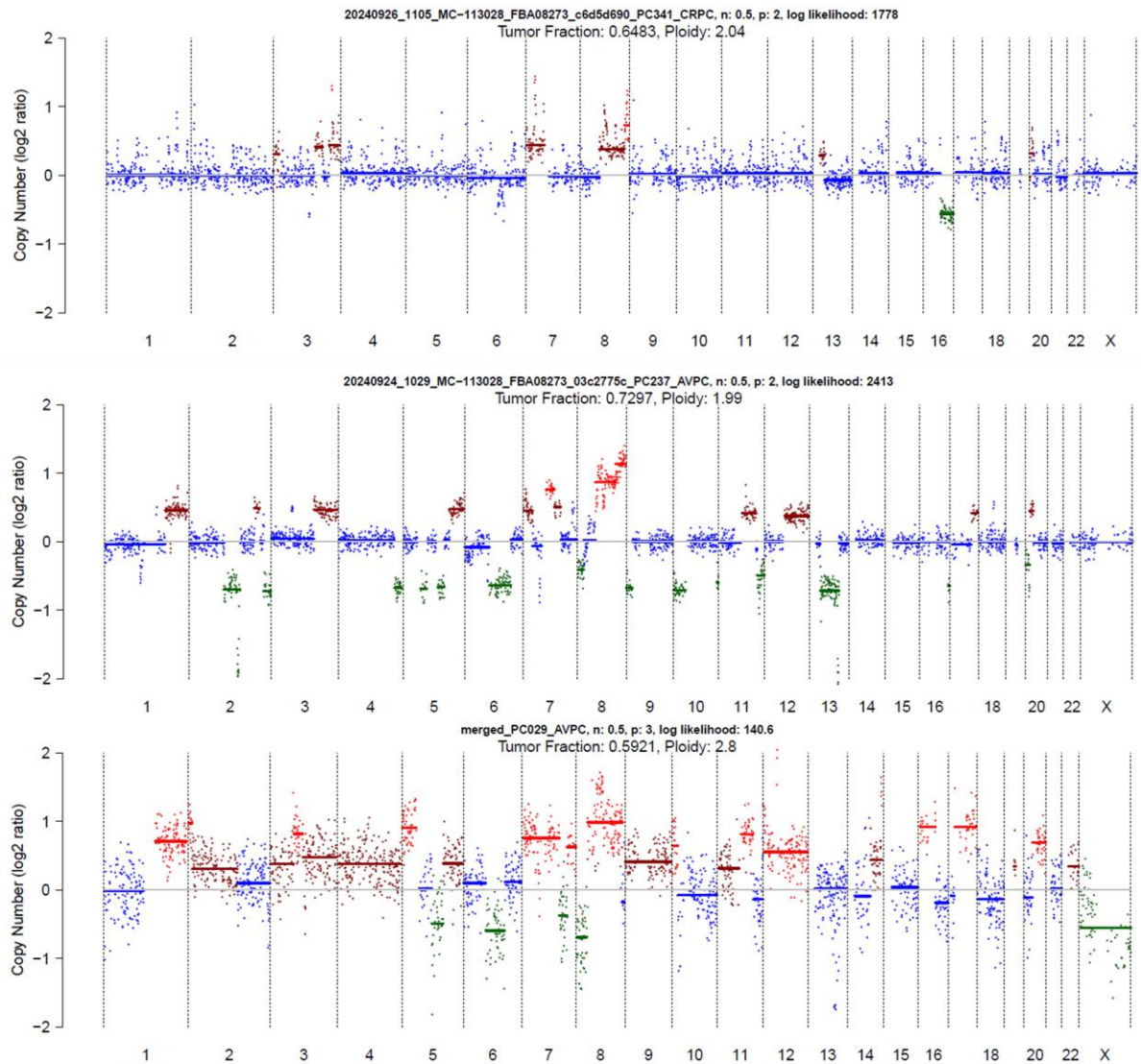


Abbildung 1: Copy-Number-Profile aus cfDNA von Patienten mit aggressiven Prostatakarzinomvarianten, bestimmt mittels Oxford-Nanopore-Sequenzierung. Dargestellt sind genomweite log₂-Kopienzahlverhältnisse über alle Chromosomen. Die Analysen zeigen charakteristische chromosomale Zugewinne (rot) und Verluste (grün), die mit bekannten Mustern aggressiver und neuroendokriner Prostatakarzinome übereinstimmen und das Vorhandensein tumorassoziiertes DNA in cfDNA.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse die prinzipielle Eignung der Nanopore-Sequenzierung für die Analyse klinischer cfDNA-Proben und für genomische Fragestellungen. Das im Antrag formulierte Ziel, therapierelevante Phänotypen anhand von Methylierungsmustern in Nanopore-sequenzierter cfDNA zu identifizieren, konnte jedoch nicht erreicht werden.

4. Bewertung und Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Projekts unterstreichen die hohe Relevanz epigenetischer Veränderungen für die Charakterisierung aggressiver Prostatakarzinomvarianten. Gleichzeitig verdeutlichen sie die

methodischen Herausforderungen bei der Analyse von DNA-Methylierung in cfDNA, insbesondere bei sehr geringen Ausgangsmengen und in Kombination mit neuartigen Sequenzierstechnologien.

Die identifizierten Limitationen stellen keinen negativen Befund dar, sondern liefern wichtige Erkenntnisse für die Weiterentwicklung zukünftiger Analysepipelines. Insbesondere wurde deutlich, dass alternative Sequenzierstrategien – etwa die Kombination mit Illumina-basierter Bisulfit-Sequenzierung – oder weiter optimierte Anreicherungsprotokolle erforderlich sind, um das volle diagnostische Potenzial epigenetischer Biomarker in der Flüssigbiopsie auszuschöpfen.

5. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass epigenetische Analysen der cfDNA ein vielversprechender Ansatz zur verbesserten Diagnostik aggressiver Prostatakarzinomvarianten sind. Obwohl die ursprünglich geplante Kombination aus Methylierungsanreicherung und Nanopore-Sequenzierung technisch limitiert war, wurden wichtige methodische Grundlagen geschaffen und relevante krankheitsspezifische Signale identifiziert.

Die gewonnenen Erkenntnisse bilden eine solide Basis für weiterführende Projekte, in denen optimierte Sequenzier- und Anreicherungsstrategien eingesetzt werden sollen. Langfristig tragen die Ergebnisse dazu bei, neue blutbasierte Biomarker zu entwickeln, die eine frühzeitigere Erkennung aggressiver Krankheitsverläufe ermöglichen und damit die Therapieentscheidung und Prognose betroffener Patienten verbessern können.

Hamburg, 26.01.2026



Prof. Gunhild von Amsberg



PD Stefan Werner