

DISS. ETH NO. 29558

# Functional and molecular tumor profiling for precision oncology

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**REBEKKA WEGMANN**  
MSc Biology, ETH Zurich  
born on 09.07.1993

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Berend Snijder  
Prof. Dr. Jacob Corn  
Dr. med. Dr. rer. nat. Christian Britschgi

2023

# Abstract

Cancer is a heterogeneous disease with a wide spectrum of genetic and molecular states, which impact pathogenesis and treatment response. Therefore, while the first cancer treatments focused on simply eliminating rapidly proliferating cells, modern strategies are incorporating a growing understanding of the disease's individual biology, facilitating a transition towards increasingly personalized treatment protocols.

Technological advances in genomic sequencing enabled the characterization of large patient cohorts, providing crucial insights on the genomic alterations driving tumorigenesis. The development of targeted inhibitors tailored to specific mutations has significantly improved prognosis of patients across indications, and matching treatment to a patient's genomic profile has become clinical routine for many indications. However, not all cancers harbor actionable driver mutations, and especially in the case of advanced or recurrent disease, malignant cells acquire secondary mutations resulting in a complex hierarchy of alterations with yet unpredictable effects on treatment outcome. Therefore, while genomic-based precision medicine has shown general success, it does not provide universal benefits to all patients.

Integrating information across different layers of tumor biology has the potential to improve our understanding of cancer biology, facilitating patient stratification. Specifically, multi-omics studies provide molecular measurements across the central dogma of biology by characterizing the genome and epigenome, transcriptome, and proteome. Combining these readouts with functional assays that measure the response of tumor cells to *ex vivo* drug treatment represents a promising approach, which can provide a comprehensive view on the cellular and molecular processes underlying disease heterogeneity. However, while multi-omics studies are well established as a research tool, their clinical translation is still at an early stage.

This thesis investigates combined functional and molecular tumor profiling for precision oncology across a diverse array of cancer indications, encompassing both solid tumors and hematological malignancies. In each study presented in this work, we employ pharmacoscopy (PCY), a single-cell resolved image-based approach which measures the cellular and morphological sample composition and high-throughput drug responses in short-term primary *ex vivo* cultures of cancer specimens. PCY has an established track record in hemato-oncology, with two recent interventional trials demonstrating improved clinical outcome of patients treated according to PCY recommendations. However, functional approaches including PCY are less established for solid tumors, which account for over 90% of all malignancies worldwide. Therefore, an additional goal of this work is to assess the feasibility and utility of PCY for these types of cancers.

Chapter 1 provides a systematic introduction to different approaches in precision oncology and multi-omics measurements, and summarizes recent advances in translating functional multi-omics to the clinic.

In Chapter 2, we integrated PCY with bulk RNA sequencing and targeted next generation sequencing (NGS) to characterize a diverse cohort of 150 malignant serous effusions (MSE) from a variety of solid cancer indications. Our integrative approach validates MSE as a model system for solid tumors, highlights dynamic compositional heterogeneity, and links gene expression to drug response and compound mode of action. Two case studies exemplify the utility of PCY combined with molecular profiling in understanding acquired resistance to targeted therapy and identifying treatment options for relapsed solid tumors.

Chapters 3 to 5 describe work performed in the context of the TumorProfiler (TuPro) project. Besides functional testing by PCY, the TuPro includes routine diagnostic NGS, as well as other emerging technologies measuring DNA, RNA and protein both at the bulk and single-cell level. TuPro thus provides a unique, single-cell resolved view on tumor biology. Results were provided within four weeks of biopsy and discussed at a molecular tumor board, highlighting the feasibility of integrated multi-omic functional tumor profiling for clinical decision support.

Chapter 3 focuses on melanoma, where PCY analysis recovered known drug response patterns associated with histological subtypes as well as additional drug response heterogeneity. A subset of patient samples responded well to chemotherapy *ex vivo*, and for one patient treated according to TuPro recommendations, this translated to a complete clinical remission. Integrative analysis refined the landscape of melanoma subtypes and identified compounds with broad activity across phenotypes.

Chapter 4 describes the TuPro cohort of high-grade serous ovarian cancer. For this indication, PCY analysis highlighted a multi-drug resistance phenotype associated with previously reported gene expression pathways relating to chemoresistance and poor clinical outcome. Finally, PCY-based morphological profiling identified a link between poor treatment response and lower progression free survival, and the presence of large adherent cells in patient-derived *ex vivo* cultures.

Lastly, Chapter 5 describes the hematology arm of the TuPro. Here, we profiled a cohort of relapsed or refractory acute myeloid leukemia patients. Integration of PCY *ex vivo* response with single-cell transcriptomics and single-cell proteomics (cytometry by time of flight) revealed known and novel mechanisms of resistance to the BCL2-inhibitor venetoclax. Furthermore, our approach identified alternative therapeutic strategies in venetoclax resistant samples, including targeting increased proliferation by PLK inhibitor volasertib, or blocking the resistance-associated fatty acid receptor CD36.

In summary, the work presented in this thesis represents a significant contribution to the emerging field of functional multi-omics guided precision oncology. Integrating single-cell resolved

## Abstract

---

*ex vivo* drug responses with molecular measurements provided insights into inter- and intra-patient tumor heterogeneity as well as mechanisms of innate and acquired treatment resistance, and brought comprehensive tumor profiling for personalized cancer treatment one step closer to clinical implementation.

# Zusammenfassung

Krebs ist eine heterogene Krankheit mit einem breiten Spektrum an genetischen und molekularen Charakteristiken, die sich auf den Krankheitsverlauf und das Ansprechen auf die Behandlung auswirken. Während sich die ersten Krebstherapien darauf konzentrierten, generell rasch proliferierende Zellen zu eliminieren, berücksichtigen moderne Strategien ein wachsendes Verständnis der individuellen Biologie der Krankheit, was zunehmend personalisierte Behandlungen ermöglicht.

Fortschritte in der DNA-Sequenzierung haben die Charakterisierung grosser Patientenkohorten ermöglicht und zu entscheidenden Erkenntnissen über die genomischen Veränderungen, welche die Tumorentstehung antreiben, geführt. Die Entwicklung zielgerichteter Therapien, die auf spezifische Mutationen zugeschnitten sind, hat die Prognose von Patienten über Indikationen hinweg erheblich verbessert. Die Abstimmung der Behandlung auf das genetische Profil eines Patienten ist bei vielen Indikationen zur klinischen Routine geworden. Allerdings liegen nicht bei allen Krebsarten Treibermutationen vor, für die eine zielgerichtete Therapie existiert. Insbesondere bei fortgeschrittenen oder rezidivierenden Erkrankungen erwerben maligne Zellen zudem sekundäre Mutationen. Dies führt zu einer komplexen Hierarchie von Veränderungen mit noch unvorhersehbaren Auswirkungen auf das Behandlungsergebnis. Daher hat die genom-basierte Präzisionsmedizin zwar in zahlreichen Bereichen Erfolge vorzuweisen, bietet aber nicht für alle Patienten einen universellen Nutzen.

Die Integration von Informationen über verschiedene Ebenen der Tumorbiologie hinweg hat das Potenzial, unser Verständnis der Krebsbiologie zu verbessern und die Patientenstratifizierung zu erleichtern. So genannte "Multi-omics"-Studien liefern molekulare Messungen entlang des zentralen Dogmas der Biologie, indem sie das Genom und Epigenom, Transkriptom und Proteom charakterisieren. Die Kombination dieser Messwerte mit funktionellen Tests, welche das Ansprechen von Tumorzellen auf eine *ex vivo* Arzneimittelbehandlung messen, stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Dadurch kann ein umfassendes Bild der zellulären und molekularen Prozesse, die der Krankheitsheterogenität zugrunde liegen, gewonnen werden. Obwohl Multi-omics-Studien als Forschungsinstrument gut etabliert sind, befindet sich ihre klinische Umsetzung noch in einem frühen Stadium.

In dieser Arbeit wird die kombinierte funktionelle und molekulare Tumorcharakterisierung für die Präzisionsonkologie in einer Vielzahl von Krebsindikationen untersucht, die sowohl solide Tumore als auch hämatologische Malignome umfassen. In jeder Studie, die in dieser Arbeit vorgestellt wird, setzen wir die Pharmakoskopie (PCY) ein. Dies ist ein mikroskopie-basierter

Ansatz auf Einzelzell-Ebene, der die zelluläre und morphologische Zusammensetzung und das Ansprechen auf eine grosse Anzahl an Medikamenten in kurzfristigen primären *ex vivo* Kulturen von Krebsproben misst. Die PCY hat sich in der Hämatookologie mit zwei Interventionsstudien bewährt. Patienten, die hier nach PCY-Empfehlungen behandelt wurden, zeigten deutlich verbesserte klinische Ergebnisse. Bei soliden Tumoren, die weltweit über 90% aller bösartigen Erkrankungen ausmachen, sind funktionelle Ansätze wie PCY jedoch weniger etabliert. Daher ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Durchführbarkeit und den Nutzen von PCY für diese Krebsarten zu beurteilen.

Kapitel 1 bietet eine systematische Einführung in verschiedene Ansätze der Präzisionsonkologie und Multi-omics-Messungen und fasst die jüngsten Fortschritte bei der Umsetzung funktioneller Multi-omics in der klinischen Routine zusammen.

In Kapitel 2 haben wir PCY mit RNA-Sequenzierung und der genomischen Analyse eines mutationsspezifischen Panels kombiniert, um eine diverse Kohorte von 150 malignen serösen Ergüssen (MSE) aus einer Vielzahl von soliden Krebsindikationen zu charakterisieren. Unser integrativer Ansatz validiert MSE als Modellsystem für solide Tumore, hebt die dynamische Heterogenität ihrer zellulären Komposition hervor und stellt eine Verbindung zwischen der Genexpression und dem Ansprechen auf Medikamente sowie der Wirkungsweise von Substanzen her. Zwei Fallstudien veranschaulichen den Nutzen von PCY in Kombination mit molekularer Profilierung bei der Untersuchung erworbener Resistenz gegen gezielte Therapie und der Identifizierung von Behandlungsoptionen für rezidivierende solide Tumoren.

Die Kapitel 3 bis 5 beschreiben Studien, die im Rahmen des TumorProfiler-Projekts (TuPro) durchgeführt wurden. Neben funktionellen Tests durch PCY umfasst das TuPro-Projekt routinemässige diagnostische Genom-Sequenzierung sowie andere aufkommende Technologien zur Messung von DNA, RNA und Proteinen sowohl auf Bulk- als auch auf Einzelzellebene. TuPro bietet somit einen einzigartigen, auf einzelne Zellen aufgelösten Einblick in die Tumorbiologie. Die Ergebnisse wurden innerhalb von vier Wochen nach der Biopsie bereitgestellt und in einem molekularen Tumorboard diskutiert. Dies unterstreicht die Machbarkeit einer integrierten Multi-omics und funktionalen Tumorcharakterisierung zur Unterstützung klinischer Entscheidungen.

In den Kapiteln 3 und 4 konzentrieren wir uns auf die beiden soliden Tumorindikationen, die Teil des TuPro waren: Melanom und hochgradig seröses Ovarialkarzinom. Beim Melanom ergab die PCY-Analyse bekannte Muster des Ansprechens auf Medikamente, die mit histologischen Subtypen assoziiert sind, sowie eine zusätzliche Heterogenität des Ansprechens auf Medikamente. Eine Untergruppe von Patientenproben reagierte *ex vivo* gut auf Chemotherapie, und bei einem Patienten, der gemäss der TuPro-Empfehlungen behandelt wurde, führte dies zu einer vollständigen klinischen Remission. Die integrative Analyse verfeinerte die Landschaft der Melanom-Subtypen und identifizierte Substanzen mit breiter Aktivität über alle Phänotypen hinweg. Beim hochgradig serösen Ovarialkarzinom zeigte die PCY-Analyse einen Phänotyp der Resistenz gegenüber der Mehrheit der getesteten Substanzen auf. Dieser steht mit Mustern der Genexpression in Verbindung, die bereits mit Zytostatikaresistenz und ungünstiger klin-

ischer Prognose assoziiert wurden. Schliesslich identifizierte die PCY-basierte morphologische Profilerstellung einen Zusammenhang zwischen klinischer Zytostatikaresistenz und geringerem progressionsfreien Überleben und dem Vorhandensein grosser adhärenter Zellen in *ex vivo* Kulturen von Krebsproben.

Schliesslich beschreibt Kapitel 5 den Hämatologie-Arm des TuPro. Hier haben wir eine Kohorte von rezidierten oder refraktären akuten myeloischen Leukämie-Patienten untersucht. Die Integration von PCY-basierten *ex vivo* Reaktionen der AML Zellen mit Transkriptomik und Proteomik auf Einzelzellebene deckte bekannte und neue Mechanismen der Resistenz gegen den BCL2-Inhibitor Venetoclax auf. Darüber hinaus identifizierte unser Ansatz alternative therapeutische Strategien in Venetoclax-resistenten Patienten, einschliesslich der Zielsetzung, die erhöhte Proliferation durch den PLK-Inhibitor Volasertib zu blockieren, oder den mit Resistenz assoziierten Fettsäurerezeptor CD36 zu blockieren.

Zusammenfassend stellt diese Arbeit einen bedeutenden Beitrag zum aufkommenden Feld der funktionellen Multi-omics-geleiteten Präzisionsonkologie dar. Die Integration von Einzelzell-aufgelösten *ex vivo* Wirkstoffreaktionen mit molekularen Messungen ermöglichte Einblicke in die Tumorheterogenität zwischen und innerhalb von Patienten, sowie in Mechanismen der angeborenen und erworbenen Therapieresistenz. Die hier beschriebenen Studien brachten die umfassende Erstellung von Tumorprofilen für die personalisierte Krebstherapie einen Schritt näher an die klinische Umsetzung.