

Project title: An integrated **SY**stems **M**edicine approach to **P**ersonalized **A**nd targeted **T**Herapy in **I**ymphoma (SYMPATHY)

Prof. Dr. Sascha Dietrich, Universitätsklinik Heidelberg

Förderkennzeichen: 01ZX1506

Inhalt:

1.	Aufgabenstellung:	2
2.	Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:	2
3.	Planung und Ablauf des Vorhabens:	2
4.	Wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere:	2
5.	Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste:	3
6.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen:	3
7.	Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele:	3
9.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit:	5
10.	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:	6
11.	Fortschritt an anderen Stellen:	6

- 1. Aufgabenstellung:** Das Ziel der Nachwuchsarbeitsgruppe SYMPATHY war es, einen systemmedizinischen Ansatz zu etablieren, der funktionelle Untersuchungen von primärer Leukämie und Lymphom-Zellen, die multi-omics Charakterisierungen dieser primären Patienten-Zellen und die Entwicklung mathematischer Modelle zur Verknüpfung dieser Datensätze verbindet. Zur funktionellen Charakterisierung der primären Patientenzellen sollten Plattformen entwickelt werden, die es erlauben im Hochdurchsatz Medikamenten-Vulnerabilitäten im Kontext einer protektiven Stroma-Kokultur zu messen. Die detaillierte molekulare Charakterisierung der Patientenzellen (Genom, Transkriptom, Methylo) und der Vergleich der Medikamenten-Vulnerabilitäten über viele Patienten hinweg sollte dazu genutzt werden, ein funktionelles Verständnis der individuellen Biologie der malignen Zelle zu gewinnen und dieses Verständnis für Ansatzpunkte einer personalisierten Leukämie- und Lymphomtherapie zu nutzen.

- 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:** Das Vorhaben wurden in einem idealen Umfeld durchgeführt. Mit meiner Anbindung an das Universitätsklinikum Heidelberg und die Abteilung für Hämatologie war es mir möglich die klinische SMART-Studie durchzuführen und systematisch Patientenproben zu asservieren. Die Anbindung an das EMBL im Rahmen der MMPU (www.mmpu.de) ermöglichte es mir auf Zugriff auf eine sehr gute technische und grundlagenwissenschaftliche Infrastruktur zu erhalten.

- 3. Planung und Ablauf des Vorhabens:** Das Vorhaben wurde nach Maßgabe der Vorhabenbeschreibung geplant und durchgeführt. Technische Herausforderungen und Probleme konnten durch die Anschaffung der Großgeräte (Pipettierroboter und Hochdurchsatz-Mikroskop) überwunden werden.

- 4. Wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere:** Der Startpunkt des Vorhabens bestand darin, dass insbesondere genetische Informationen als Grundlage für personalisierte Therapieentscheidungen genutzt wurden und werden. Aber nur für eine sehr geringe Anzahl von genetischen Alterationen sind robuste Assoziationen mit dem Medikamentenansprechen in Patienten bekannt. Um diese Lücke zu schließen, wurde im Rahmen des Vorhabens große Medikamenten-Screens mit dem Ziel durchgeführt, systematisch Assoziation von genetischen Alterationen der Tumorzellen mit dem Medikamentenansprechen zu finden. Im Fokus standen Erkrankungen des lympho- proliferativen Formenkreis. Da für diese Tumorentitäten kaum bzw. keine Modellzelllinien zur Verfügung stehen, wurde die Plattform für primäre Tumorzellen entwickelt. Zudem sind diese Erkrankungen (z.B.: T-PLL, LPL, MZL, MCL, refr. CLL, B-PLL, Sézary Syndrome) durch eine sehr heterogene Erkrankungsbiologie charakterisiert und viele biologisch wichtige Mutationen finden sich bei nur sehr wenigen Patienten („long tail phenomenon“). Die Entwicklung der Plattform

für primäre Tumorzellen erlaubt es uns das volle biologische Spektrum von lymphoproliferativen Erkrankungen abdecken zu können. **Es wurden keine bekannten spezifischen Konstruktionen, Verfahren oder Schutzrechte für die Durchführung des Vorhabens benutzt.**

5. Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste: Es wurden die üblichen Ressourcen für wissenschaftliche Fachliteratur am UKHD und am EMBL genutzt. Zudem wurde eine Vielzahl von statistischen Softwarelösungen der open source Plattform Biocoductor genutzt.

6. Zusammenarbeit mit anderen Stellen: Die unterschiedlichen Projekte und Publikationen sind in enger Zusammenarbeit mit einer Vielzahl von Arbeitsgruppen entstanden (zum Beispiel AG Huber, EMBL oder AG Lethiö, Karolinska Institut Schweden). Die wissenschaftliche Eigenständigkeit der Förderung hat es mir zudem ermöglicht als Gruppenleiter der MMPU beizutreten und somit von den Ressourcen des EMBLs zu partizipieren. Bei der MMPU handelt es sich um ein Joint Venture der Universität Heidelberg und des EMBLs Heidelberg.

7. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele:

Ziel 1) Im Rahmen des Ziel 1) haben wir uns vorgenommen, eine flexible Co-Kultur Medikamenten-Screening-Plattform für primäre Leukämie und Lymphomzellen zu entwickeln, die es erlaubt den Einfluss des Tumormikromilieus und des genetischen Fingerabdrucks der Tumorzellen auf das Medikamentenansprechen zu studieren.

In einem ersten Schritt haben wir systematisch studiert, inwiefern **lösliche Faktoren der Tumormikroumgebung** das Ansprechen auf Medikamente beeinflussen. Hierfür haben wir 220 Patientenproben (Leukämie und Lymphom-Proben) mit 18 löslichen Faktoren und 15 klinisch wichtigen Medikamenten ko-kultiviert. Mithilfe des resultierenden Datensatzes konnten wir ein Interaktionsnetzwerk über die Signalwegaktivitäten der löslichen Faktoren und die Wirksamkeit spezifischer Signalweginhibitoren generieren. Mithilfe dieses Ansatzes konnten wir zum Beispiel zeigen, dass die Zytokine IL-4 und Interferon gamma die Aktivität von klinisch relevanten B-Zell Rezeptor Inhibitoren entgegenwirken. Hierbei handelt es sich um ein klinisch sehr relevantes Ergebnis, da anzunehmen ist, dass die Kombination von Medikamenten, die die Aktivität diese Zytokine blockieren, die Aktivität dieser Signalwege verbessern. Für alle Patientenproben dieses Screens haben wir ausführlich **1)** das Genom (WES), **2)** das Transkriptom (RNA-Seq) und **3)** den Methylierungsstatus (850k Assays) annotiert. Mithilfe dieser Daten konnten wir zeigen, inwiefern diese Resistenzen durch den zugrunde liegenden Genotyp beeinflusst werden. Das Manuskript zu dieser Arbeit ist im Journal *Molecular Systems Biology* publiziert und wurde auf dem Cover des Journals hervorgehoben (PMID: 35959629).

Um die komplexe **zelluläre Interaktion** von Tumorzellen mit ihrer Mikroumgebung und den Einfluss dieser Interaktionen auf die Wirksamkeit von Medikamenten ex-vivo zu studieren, haben wir erfolgreich eine Mikroskopie-basierte Phänotypisierungsplattform etabliert, die Medikamentensensitivitäten primärer Lymphom- und Leukämie Zellen im Kontext eines ex-vivo Knochenmark-Mikromilieus misst. Mit Verzögerung konnten wir dieses sehr großen und sehr aufwendigen Experiments für über 120 primäre Patientenproben und unterschiedliche Kulturbedingungen fertig stellen. Die Ergebnisse zeigen erstmals systematisch auf, welche klinische relevanten Medikamente durch die Stromnische des Knochenmarks beeinflusst werden. Auch konnten wir mit diesem Ansatz Medikamente identifizieren, die möglicherweise das Potential haben Stromamidierte Resistenz zu überwinden. Die dazugehörige Publikation befindet sich im Reviewprozess (doi: <https://doi.org/10.1101/2022.02.18.481065>, PMID: 34585113).

Ziel 2) Das Ziel 2) fokussiert auf das Verständnis inwiefern intra- und inter-Patienten-Heterogenität das Ansprechen auf zielgerichtete Medikamente beeinflussen können.

Wir haben eine RNA-Einzelzellsequenzierung Pipeline für Lymphknotenbiopsien etabliert. Mit Hilfe dieser Technik war es uns möglich nicht maligne B- und T-Zellen, sowie Tumorzellen zu unterscheiden und Tumor-Subpopulationen im Kontext der Tumormikroumgebung zu identifizieren. Weiterhin haben wir eine Pipeline etabliert, die es uns erlaubt, einzelnen Tumor Subpopulationen ein Drug-Response Profil und einen Genotyp (Whole Genome Sequenzierung) zuordnen zu können. Wir konnten zeigen, dass es transkriptionell differentielle Subpopulation gibt, die ein signifikant unterschiedliches Ansprechen auf Drogen aufweisen, aber einen identischen Genotyp aufzeigen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass differentielles Ansprechen auf Medikamente nicht immer durch den Genotyp vorhergesagt werden können und unterstreicht die Bedeutung einer funktionellen Testplattform für klinische Vorhersagen. Diese Ergebnisse wurden im Journal *Nature Cell Biology* (PMID: 32541878) publiziert.

Wir haben darüber hinaus unterschiedlichste Omics-Ebenen über eine sehr große Gruppe von CLL und Lymphom-Patienten (n>350) charakterisiert und konnten zeigen, dass vor allem die proteomische Ebene eine neue biologische Gruppe der CLL identifizieren konnte, die sich durch einen distinkten Medikamentensensitivitätsphänotyp auszeichnet. Die entsprechende Publikation ist kürzlich in *Nature Communication* (PMID: 36266272) erschienen.

Ziel 3) Das finale Ziel des Antrages war es, eine Pipeline zu erzeugen, die im klinischen Alltag als Hilfestellung für personalisierte Therapieentscheidungen herangezogen werden kann.

Um ein solches Modell zu trainieren haben wir die prospektive SMART Studie initiiert, die Medikamentenansprechen ex-vivo für Patienten bestimmt. Dieser Datensatz ermöglichte es uns den OMICS-Daten einen Behandlungskontext gegenüberzustellen und Therapie-Ansprecher und Nicht-Ansprecher auf der Grundlage der OMICS Daten klassifizieren zu können. Darüber hinaus konnten wir auch das ex-vivo Medikamentenansprechen als eigenständige Omics Ebene nutzen, um das Medikamentenansprechen im Patienten vorhersagen zu können. Es wurden Patienten eingeschlossen, die hämatologische maligne Erkrankung hatten und bei denen eine Notwendigkeit für eine Behandlung bestand. Die Studie konnte erfolgreich rekrutiert werden. Aktuell revidieren wir die Studie für das Journal *Nature Cancer*.

8. Wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

Kostenpunkt	Betrag	
<i>Group leader (ÄIII)</i>	~568.320 Euro	Leitung der Arbeitsgruppe, Aufbau einer Sprechstunde für personalisierte Medizin. Bioinformatische Analysen. Durchführung und Konzeption der klinischen SMART Studie.
<i>Postdoc</i>	~317.187 Euro	Bioinformatische Analysen zu Einzelzellsequenzierung und Multi-omics Integration. Aufbau eines Data Ware Houses für die Speicherung der klinischen Daten, der .
<i>PhD student</i>	~175.000 Euro	Durchführung und Konzeption der Medikamentenscreens.
<i>Technician(s)</i>	~ 308.000 Euro	Assistenz bei der Durchführung der Medikamentenscreens, Probenverarbeitung und Vorbereitung der Proben für Omics-Charakterisierung
<i>Hochdurchsatz-Mikroskop</i>	~760.000	Notwendig zur Durchführung der der Medikamentenscreens
<i>Pipettierroboter</i>	~250.000	Notwendig zur Durchführung der der Medikamentenscreens
<i>Verbrauchsmaterial</i>	~250.000	Sequenzierkosten, Kosten Proteomics, Kosten allgemeiner Laborbedarf

9. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit: Die im Vorhaben SYMPATHY geleisteten Arbeiten haben zu einer Vielzahl hochrangiger Publikationen geführt. Zudem sind zwei naturwissenschaftlich Doktoranden, sowie drei medizinische Doktoranden im Rahmen des Projektes graduiert. Auf der Grundlage der erreichten Erfolge wurde der Mittelempfänger Sascha Dietrich auf den Lehrstuhl für Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Düsseldorf berufen.

Die im Projekt geleisteten Arbeiten haben final die Durchführung der klinischen SMART Studie ermöglicht. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass funktionelle Tests genutzt werden können, um Medikamentenansprechen für maligne Erkrankungen im Patienten vorhersagen zu können. Funktionelle Tests können die prädiktive Aussage

von genetischen Tests für klinische Endpunkte wie das Medikamentenansprechen im Patienten verbessern.

10. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:

Die im Rahmen des Projektes etablierte Infrastruktur wird für die klinische Integration der funktionellen Charakterisierung von Tumorzellen für die Prädiktion des klinischen Ansprechens auf Krebs-Medikamente genutzt. Die etablierten Prädiktionsmodelle werden in einer weiterführenden klinischen Bestätigungsstudie erneut evaluiert. Darüber hinaus ist die unsere Medikamenten-Profilung-Plattform bereits jetzt schon fester Bestandteil des molekularen Tumorboards. Die Plattform soll im nächsten Schritt auf weitere Zentren übertragen werden. Das Zentrum für Hämatologie der Uniklinik Freiburg stellt dafür das erste Pilotzentrum dar.

11. Fortschritt an anderen Stellen: Während der Durchführung des Vorhabens hat sich der Stellenwert funktioneller Test für die Vorhersage des Medikamentensprechens maligner Erkrankung deutlich verbessert. Neben der vom Antragsteller koordinierten Studie wurden zwei weitere Studien publiziert, die den Nutzen funktioneller Tests aufzeigen. Im Unterschied zu der im Rahmen der Förderung durchgeführten SMART-Studie integrieren die an anderer Stelle publizierten Ansätze Ergebnisse in eine molekulares Tumorboard. Unsere SMART Studie beschreibt hingegen erstmalig wie gut das in-vivo und ex-vivo Ansprechen auf Tumormedikamente korreliert.

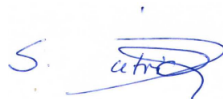
12. Veröffentlichungen der Ergebnisse:

1. Dietrich, S, Oles, M, Lu, J et al., Drug Perturbation Based Stratification of Blood Cancer. **Journal of Clinical Investigation. 2018**
2. Liebers N, Speer C, Benning L, Bruch PM, Kraemer I, Meissner J, Schnitzler P, Kräusslich HG, Dreger P, Mueller-Tidow C, Poschke I, **Dietrich S**. Humoral and cellular responses after COVID-19 vaccination in anti-CD20 treated lymphoma patients. **Blood 2021**
3. Herbst SA, Stolarczyk MA, Becirovic T, Liu Y, Kolb C, Herling M, Müller-Tidow C, **Dietrich S**. Bone marrow stroma cells massively phagocytose apoptotic cells leading to misinterpretation of co-culture experiments. **iScience. 2021**
4. Roider T, Brinkmann BJ, Kim V, Knoll M, Kolb C, Roessner PM, Bordas M, Dreger P, Müller-Tidow C, Huber W, Seiffert M, **Dietrich S**. Autologous culture model of nodal B cell lymphoma identifies ex vivo determinants of response to bispecific antibodies **Blood Adv. 2021** in press
5. Liebers N, Duell J, Fitzgerald D, Kerkhoff A, Noerenberg D, Kaebisch E, Acker F, Fuhrmann S, Leng C, Welslau M, Chemnitz J, Middeke JM, Weber T, Holtick U, Trappe R, Pfannes R, Liersch R, Spoer C, Fuxius S, Gebauer N, Caillé L, Geer T, Koenecke C, Keller U, Claus R, Mougiakakos D, Mayer S, Huettmann A, Pott C, Trummer A, Wulf G, Brunnberg U, Bullinger L, Hess G, Mueller-Tidow C, Glass B, Lenz G, Dreger P, **Dietrich S**. Polatuzumab vedotin as a salvage and bridging treatment in relapsed or refractory large B-cell lymphomas. **Blood Adv. 2021**

6. Roider T, Wang X, Hüttl K, Müller-Tidow C, Klapper W, Rosenwald A, Stewart JP, de Castro DG, Dreger P, Hermine O, Kluin-Nelemans HC, Grabe N, Dreyling M, Pott C, Ott G, Hoster E, **Dietrich S**. The impact of SAMHD1 expression and mutation status in mantle cell lymphoma: An analysis of the MCL Younger and Elderly trial. **Int J Cancer. 2021**
7. Roider T, Seufert J, Uvarovskii A, Frauhammer F, Bordas M, Abedpour N, Stolarczyk M, Mallm JP, Rabe R, Bruch PM, Balke-Want H, Hundemer M, Rippe K, Goepfert B, Seiffert M, Brors B, Mechttersheimer G, Zenz T, Peifer M, Chapuy B, Schlesner M, Müller-Tidow C, Fröhling S, Huber W, Anders SA, **Dietrich S**. Dissecting intratumor heterogeneity of nodal B cell lymphomas on the transcriptional, genetic, and drug response level. **Nature Cell Biology. 2020**
8. Liebers N, Roider T, Bohn J, Haberbosch I, Pircher A., Ferstl B., Ebnöther M, Wendtner CM, Dearden C, Follows GA, Ho AD, Müller-Tidow C, Dreger P, Troussard X, Zenz T, **Dietrich S**. BRAF inhibitor treatment in classic hairy cell leukemia: a long-term follow up study of patients treated outside of trials. **Leukemia. 2020**
9. Herbst SA, Vesterlund M, ..., Huber W, Tausch E, Lehtiö J, **Dietrich S**. Proteogenomics refines the molecular classification of chronic lymphocytic leukemia. **Nature Communication. 2022**
10. Jeong H, Grimes K, Rauwolf KK, Bruch PM, Rausch T, Hasenfeld P, Benito E, Roider T, Sabarinathan R, Porubsky D, Herbst SA, Erarslan-Uysal B, Jann JC, Marschall T, Nowak D, Bourquin JP, Kulozik AE, **Dietrich S**, Bornhauser B, Sanders AD, Korbel JO. Functional analysis of structural variants in single cells using Strand-seq. **Nature Biotechnology 2022**
11. Bruch PM, Giles HA, Kolb C, Herbst SA, Becirovic T, Roider T, Lu J, Scheinost S, Wagner L, Huellein J, Berest I, Kriegsmann M, Kriegsmann K, Zgorzelski C, Dreger P, Zaugg JB, Müller-Tidow C, Zenz T, Huber W, **Dietrich S**. Drug-microenvironment perturbations reveal resistance mechanisms and prognostic subgroups in CLL. **Mol Syst Biol. 2022**
12. Janssen M, Schmidt C, Bruch PM, Blank MF, Rohde C, Waclawiczek A, Heid D, Renders S, Göllner S, Vierbaum L, Besenbeck B, Herbst SA, Knoll M, Kolb C, Przybylla A, Weidenauer K, Ludwig AK, Fabre MA, Gu M, Schlenk RF, Stölzel F, Bornhäuser M, Röllig C, Platzbecker U, Baldus CD, Serve H, Sauer T, Raffel S, Pabst C, Vassiliou GS, Vick B, Jeremias I, Trumpp A, Krijgsveld J, Müller-Tidow C, Dietrich S. Venetoclax synergizes with Gilteritinib in FLT3 wildtype high-risk Acute Myeloid Leukemia by suppressing MCL-1. **Blood 2022**

Weiterhin sind die bisher veröffentlichten Daten sowohl als Rohdaten, als auch in Form von interaktiven Apps der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden. **Siehe www.dietrichlab.de**

Alle Ergebnisse und Software-Lösungen werden "open source" der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt. Schutzrechtliche Aspekte ergeben sich nicht.



Düsseldorf, 31.10.2022

Prof. Dr. Sascha Dietrich

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung)
3. Titel An integrated Systems Medicine approach to Personalized And targeted Therapy in Iymphoma (SYMPATHY)	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Sascha Dietrich Peter Bruch Nora Liebers Maike Janssen Sophie Herbst Berit Brinkmann Tobias Roider	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.04.2022
	6. Veröffentlichungsdatum 31.10.2022
	7. Form der Publikation Es sind 12 Publikationen in Letzt. Oder Erst-Autorenschaft entstanden. Software und Resource Apps sind unter www.dietrichlab.de zu finden.
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universitätsklinikum Heidelberg Im Neuenheimer Feld 410 69120 Heidelberg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 01ZX1506
	11. Seitenzahl
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben n.a.	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) BMBF	
18. Kurzfassung Das Ziel der Nachwuchsarbeitsgruppe SYMPATHY war es, einen systemmedizinischen Ansatz zu etablieren, der funktionelle Untersuchungen primärer Leukämie und Lymphom-Zellen, die multi-omics Charakterisierungen dieser primären Patienten-Zellen und die Entwicklung mathematischer Modelle zur Verknüpfung dieser Datensätze verbindet. Zur funktionellen Charakterisierung der primären Patientenzellen wurden unterschiedliche Plattformen entwickelt, die es erlauben im Hochdurchsatz Medikamenten-Vulnerabilitäten im Kontext der Tumormikroumgebung zu messen. Auf der Grundlage einer detaillierten molekularen Charakterisierung der Patientenzellen und des Vergleichs der Medikamenten-Vulnerabilitäten über viele Patienten hinweg wurde ein funktionelles Verständnis der individuellen Biologie jeder einzelnen Tumorseite generiert, welches für Ansatzpunkte einer personalisierten Leukämie- und Lymphom-Therapie herangezogen werden kann. Das finale Ziel im Rahmen einer prospektiven Studie eine funktionelle Screening-Plattform zu etablieren, die in den klinischen Alltag integriert werden kann wurde erreicht.	
19. Schlagwörter Systemmedizin, Lymphom, Leukämie, Hämatologie	
20. Verlag n.a.	21. Preis