



# SCHLUSSBERICHT

**ADDRESS – Translationale Forschung für Personen  
mit DNA Reparaturdefekten (TP4, TP8, TP9)**

Förderkennzeichen: 01GM1909E

Prof. Schlemmer, Prof. Pfister, Prof. Milde

## Teil I: Kurze Darstellung zu

### **1. Aufgabenstellung**

Das Ziel des ADDRESS- Verbundes war es, innerhalb eines klinisch-wissenschaftlichen Forschungsansatzes mithilfe von Patientenorganisationen, Ärzten diverser Disziplinen und Wissenschaftlern die medizinische und psychosoziale Versorgung, Krebsfrüherkennung, Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen bei Menschen mit gestörter DNA-Reparatur (DADR) zu verbessern. Dies sollte den Aufbau einer web-basierten Infrastruktur mit Gesundheitsinformationen, therapeutischem Unterstützungsangebot und der Sammlung wissenschaftlicher Daten umfassen, als auch die molekularen Ursachen von DADDRs aufzuklären und das so erworbene Wissen zu nutzen, um neue Therapiemöglichkeiten in verschiedenen Tier- und Zellmodellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte die Krebsfrüherkennung mit bildgebenden Verfahren und verschiedenen Analysemethoden verbessert und eine psychosoziale Unterstützung für Patientinnen und Patienten erarbeitet werden.

Die 3 Ziele der Förderung der Teilprojekte 4, 8 und 9 waren die folgenden:

**TP4:** zielt auf die Verbesserung der Krebs-Überwachung durch innovative bildgebende Verfahren ab

**TP8:** untersucht DADR-spezifische somatische Signaturen und die Methylierungs-Profile von Tumoren, die bei Personen mit DADR auftreten, um Behandlungsziele zu identifizieren und diese diagnostisch nutzen zu können

**TP9:** generiert Mausmodelle (PDX), die in frühen klinischen Versuchen eingesetzt werden können.

### **2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Störungen mit gestörter DNA-Reparatur (DADR) sind seltene genetische Erkrankungen mit gestörten DNA-Reparatur-Mechanismen. Ein gemeinsames Merkmal der betroffenen Personen ist ein stark erhöhtes Krebsrisiko. Die Behandlung ist aufgrund des zugrunde liegenden Gendefekts häufig kompliziert.

Die Patienten leiden möglicherweise unter übermäßiger Toxizität/Sekundärneoplasmen, schlechtem Ansprechen auf die Behandlung und eine hohe Sterblichkeit, wenn sie mit Standard Strahlen-/Chemotherapie behandelt werden. Die Entwicklung von Behandlungsstrategien ist dringend erforderlich. Das vorgeschlagene Konsortium setzt sich zusammen aus (a) Patientenvertretern, (b) Ärzten aus den Bereichen Psychosomatik Gynäkologie, Hämatologie/Onkologie für Kinder und Erwachsene, Radiologie, Pathologie und Humangenetik sowie (c) auf Krebs und DNA-Reparatur spezialisierte Wissenschaftler.

Unser Ziel war: **(1)** die Verbesserung der Information/Beteiligung der Patienten selber sowie die therapeutische Beratung für Angehörige der Gesundheitsberufe (SP1); **(2)** weitere Aufklärung der krankheitsverursachenden Mechanismen (SP2); **(3)** Verbesserung der psychosozialen Unterstützung und der Krebsüberwachung unter Einsatz innovativer bildgebender Verfahren bei Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom (SP3, SP4); **(4)** Förderung des Einsatzes von „Bürstenbiopsien“ als Krebsüberwachungsinstrument bei Personen mit Fanconi-Anämie, die ein übermäßiges Mundkrebsrisiko aufweisen (SP5); **(5)** Identifizierung genetischer Marker für die Leukämieentwicklung (SP6, SP7); **(6)** Charakterisierung der genetischen und epigenetischen Profile von Tumoren, um diese

Erkenntnisse diagnostisch zu nutzen und neue Schwachstellen für die Behandlung zu identifizieren; (SP8); (7) Erforschung neuer Krebstherapien in präklinischen Krankheitsmodellen (SP9).

### **3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

#### **TP4:**

Das Projekt zur Entwicklung eines MR-basierten spezialisierten Bildgebungsansatzes für Li-Fraumeni-Patienten zielte auf eine effektive Translation in die klinische Anwendung unter Berücksichtigung von Versorgungsaspekten sowohl hinsichtlich technischer (technische Machbarkeit und Verfahrensintegrität) als auch patientenindividueller Aspekte (z.B. der Compliance und Verträglichkeit der Früherkennung). Die interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb des Konsortiums mit TP3 (Prof. Dr. Schott) sollte in diesem translationalen Forschungsprojekt an der Schnittstelle von Diagnoseforschung und versorgungsnaher Forschung für Patienten/innen mit Li-Fraumeni-Syndrom eine Verbesserung der derzeitig stark limitierten diagnostischen Krebsfrüherkennung und -diagnostik erforschen. Durch die optimale Schnittstellentranslation von neuen bildgebenden Früherkennungstests aus der Abteilung Radiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (Prof. Schlemmer) für die onkologisch schwer betroffenen Patienten/innen in enger Kooperation mit der Spezialsprechstunde der Universitätsfrauenklinik Heidelberg (Prof. Schott) zeigt sich einerseits die translationale Relevanz als auch eine unmittelbare integrative Kooperation innerhalb des Konsortiums in Kooperation zwischen zwei Teilprojekten. Eine Ausrollung der Methode über das ADDRESS-Netzwerk in weitere Patienten/innen-gruppen wurde vorgesehen und somit die Notwendigkeit und Chancen für die Einbindung in einen solchen einzigartigen Forschungsverbund auch hier demonstriert.

#### **TP8:**

Die Hauptziele des Teilprojekts waren a) die Etablierung neuartiger, vom Patienten abgeleiteter Xenograft (PDX)-Modelle und b) die Erforschung neuartiger medikamentöser Ansätze zur Behandlung von DADDR.

Optimale Behandlungen sollten sowohl wirksam sein (d. H. antitumorale Wirkungen haben) als auch nicht toxisch sein, was insbesondere bei Krankheiten, die a priori zu genotoxischem Stress neigen, schwer zu erreichen ist. Wir sind dieses Problem mit einem „unbiased“ Screening-Ansatz angegangen. Zwei Modellkrankheiten des Spektrums (LFS und FA) wurden in Proof-of-Principle Experimenten verwendet.

Anhand von Modellen (PDX und Tumorzelllinien) beider Krankheiten wurden mittel- bis großformatige Medikamentenscreens mittels High Content Imaging durchgeführt. Dies ermöglichte die Identifizierung wirksamer Arzneimittel, die einerseits Zelltod induzieren, aber auch die geringsten genotoxische Wirkung auf die Zellen haben. Es wurden neue PDX-Modelle aus primärem Tumormaterial von Patienten mit DADDR entwickelt. Die orthotope und / oder subkutane Transplantation von primärem Tumormaterial in NOD / SCIDMäusen ermöglichte die Erzeugung neuer Tumormodelle. Nach eingehender Charakterisierung (DNA-Methylierungsanalysen, DNA- und RNA-Sequenzierung) wurden diese Modelle sowohl in vitro als auch in vivo für weitere Screening-Versuche mit Medikamenten eingesetzt. Da die Verwendung von PDX Modellen etablierten Zelllinien, die sich seit langem in Zellkultur befinden, überlegen sind, sollten diese neuartigen Ergebnisse klinisch

relevantere Ergebnisse liefern und eine signifikant höhere Chance für eine erfolgreiche Translation in die Klinik haben.

#### TP9:

Das Hauptziel dieses Teilprojekts bestand darin, die molekularen Ursachen und Mutations-Muster von Tumoren zu untersuchen, die bei Personen mit Defekten in der Reaktion auf DNA-Schäden auftreten. Die Ergebnisse dieser molekularen Analysen trägt dazu beitragen, geeignete Ziele für die Krebstherapie zu identifizieren und diese Informationen diagnostisch nutzbar zu machen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Hochdurchsatzsequenzierung vom Tumormaterial und den dazugehörigen Normalproben (i.d.R. Blut) durchgeführt: a) Gesamtgenomanalysen; hierdurch können kleine Mutationen (Varianten einzelner Basen und Indels) sowie Strukturvarianten wie beispielsweise Translokationen identifiziert werden und b) Analysen des gesamten Transkriptoms, zur Identifikation von Veränderungen der Genexpression und Genfusionen. Die DNA-Methylierung im Tumor und Normalgewebe wurden unter Verwendung von Methylierungsarrays untersucht. Anschließend wurden somatische Mutationssignaturen und -muster (z. B. Chromothripsis) sowie Methylierungsprofile von DADDR-assoziierten Tumoren auf der Grundlage der Identifizierung und Klassifizierung genetischer und epigenetischer Veränderungen erstellt, durch die Verwendung von verschiedenen bioinformatischen Methoden.

## Teil II: Eingehende Darstellung

### 1. Erzielte Ergebnisse im Einzelnen

#### TP4:

#### **AP1: Evaluation technischer Implementierbarkeit und Herstellung der 3D Mikrophantome für die Qualitätssicherung und Kalibrierung der quantitativen Daten**

Vor Projektbeginn wurden umfangreiche Vorbereitungen durchgeführt, um sicherzustellen, dass sämtliche technischen und personellen Ressourcen optimal zur Verfügung standen. Dies umfasste die Sichtung der verfügbaren MRT-Scanner des Deutschen Krebsforschungszentrums und die detaillierte Planung ihrer zeitlichen Verfügbarkeit, um einen reibungslosen Ablauf der geplanten Untersuchungen zu gewährleisten. Ebenso erfolgte die gezielte Auswahl und Einstellung des erforderlichen Personals. In einem Team aus Experten in den Bereichen Krebsfrüherkennung, Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) und Ganzkörper-MRT-Bildgebung wurde innerhalb mehrerer Sitzungen erfolgreich ein umfangreiches POSIP-MRT-Protokoll inklusive hochaufgelöster DWI-Sequenzen speziell für die Detektion von Malignomen bei LFS-Betroffenen entwickelt. Die Parameter der erforderlichen MRT-Sequenzen, insbesondere der diffusionsgewichteten Sequenzen, wurden detailliert geplant, um ein qualitativ hochwertiges Protokoll zu ermöglichen, ohne eine Untersuchungsdauer zu überschreiten, die für die Studienteilnehmenden zu belastend ist. Die technische Durchführbarkeit der erforderlichen MRT-Sequenzen an den verfügbaren Geräten wurde sorgfältig evaluiert, um sicherzustellen, dass die Daten in höchster Qualität erfasst werden konnten. Parallel erfolgte die Entwicklung und Herstellung von hochwertigen 3D-Mikrophantomen auf der Basis von Polyvinylpyrrolidon K30. Diese speziell entwickelten Modelle dienen dazu, die Diffusionseigenschaften von gesundem und von gesundem und maligne entartetem Gewebe im MRT authentisch nachzubilden. Es wurden erfolgreich mehrere Testmessungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Darstellung des Phantoms in den diffusionsgewichteten Sequenzen (DWI) zu überprüfen.

#### **AP2: Einrichtung von POSIP an den MRT-Geräten, Schulung Personal und in-vitro und in-vivo Testmessungen**

***MS1:** Erfolgreiche Implementierung in den klinischen Routineablauf und erfolgreiche qualitative und quantitative in-vitro und in-vivo Akquisition der POSIP-Daten in den genutzten MRTGeräten am Standort DKFZ und NCT.*

Ein wichtiger Schritt im Projekt war die Einrichtung des zusammengestellten MRT-Protokolls an den MRT-Scannern. Das technische Personal wurde ausführlich geschult, um sicherzustellen, dass es mit den technischen Anforderungen und der Handhabung der Untersuchungssequenzen vertraut ist. Es wurden multiple Testmessungen an gesunden Probanden inklusive der fertiggestellten Mikrophantomen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit von qualitativ hochwertigen MRT-Daten innerhalb des regulären klinischen Ablaufs zu gewährleisten.

Es wurden erfolgreich standardisierte Verfahren für die Rekrutierung, die Aufklärung und die Untersuchung der Studienteilnehmenden, sowie die klinische Befundung und die Studienauswertung etabliert. Hierbei war die Schulung des medizinischen Personals von entscheidender Bedeutung, um

einerseits eine optimale und umfassende Aufklärung der LFS-Betroffenen über Untersuchung, Kontrastmittelgaben und Studieninhalte sicherzustellen, ohne ihre ohnehin häufig bereits hohe psychische Belastung zu erhöhen. Andererseits wurde es detailliert in die klinische Auswertung der MRT-Daten hinsichtlich der bei LFS auftretenden Tumoren eingewiesen, um einen reibungslosen Ablauf der Befundung zu gewährleisten. Für die Speicherung der MRT-Daten sowie die Ausführung der qualitativen und quantitativen Studiauswertungen wurde eine Datenbank eingerichtet.

Schließlich wurde in dieser Phase ein Fragebogen vorbereitet, um die Angstgefühle der Studienteilnehmenden während der Untersuchung unmittelbar im Anschluss an diese zu evaluieren. Hierzu wurde ein vorbestehender, in einer auswärtigen Studie überprüfter Fragebogen von Ahlander et al. aus dem Englischen übersetzt.

### **AP3: Translationale klinische Datenakquise**

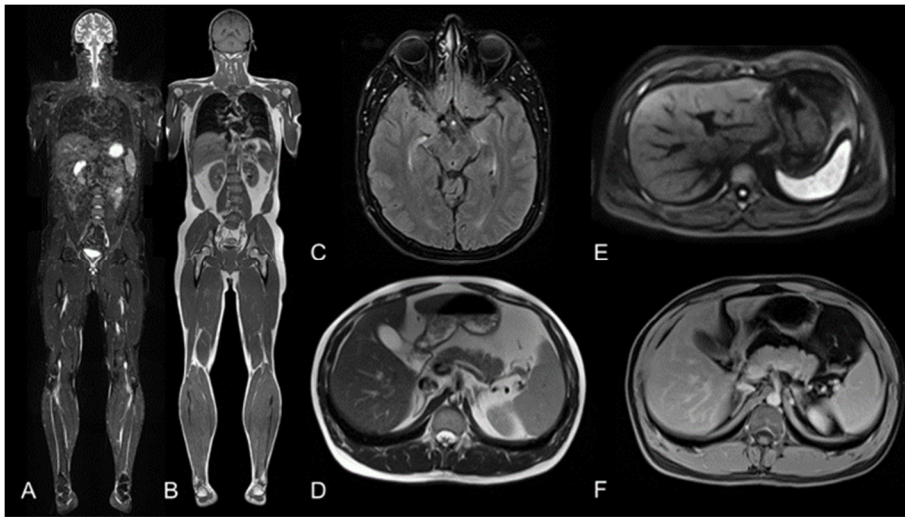
*MS2.1-2.8 Erfolgreiche Datenaufnahme mittels POSIP MRT-Protokoll in den Studienpatienten/innen sowie erfolgreiche Durchführung der Befragung der teilnehmenden Patienten/innen mit 3-monatiger Re-Evaluation.*

Unter Anwendung der standardisierten Verfahrensweisen wurden die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer mittels Informationsbroschüren in verschiedenen klinischen Einrichtungen sowie mithilfe einer engen Kooperation mit den übrigen Subprojekten innerhalb des Konsortiums kontaktiert und über die Studie aufgeklärt.

Nach anfänglichen Verzögerungen aufgrund der COVID-19-Pandemie gelang es, insgesamt 116 Betroffene mit LFS für die Studie zu gewinnen. Im Verlauf mussten drei Teilnehmende ausgeschlossen werden, wobei zwei aufgrund von Klaustrophobie die MRT-Untersuchung nicht abschließen konnten und bei einer Teilnehmerin retrospektiv festgestellt wurde, dass die dem LFS zugrunde liegende TP53-Genvariante in ihrem Fall nicht als pathogen einzustufen war. Insgesamt konnte somit bei 113 Teilnehmenden erfolgreich eine initiale Ganzkörper-MRT-Untersuchung gemäß dem Protokoll durchgeführt werden. Darüber hinaus erhielten 69 Teilnehmende nach einem Jahr eine zweite Folgeuntersuchung, von denen wiederum sieben Teilnehmende nach zwei Jahren bereits ein drittes Mal untersucht wurden.

Nach wiederholten Optimierungen unserer standardisierten Verfahrensweisen war es möglich, den Großteil der Teilnehmenden zur Ausfüllung des Fragebogens zur Evaluation ihrer untersuchungsbezogenen Angstgefühle zu motivieren. Die Ergebnisse dieser Befragungen wurden in regelmäßigen Abständen ausgewertet, um die Durchführbarkeit der Untersuchungen zu überprüfen. Alle Teilnehmenden erhielten eine ausführliche klinische Befundung ihrer MRT-Untersuchungen.

In der Phase der Datenakquise wurde die zentrale Bedeutung von TP4 als Schnittstellenprojekt für die Rekrutierung von Teilnehmenden auch für andere Teilprojekte des Konsortiums deutlich. Es gelang, erfolgreich einen standardisierten Ablauf zu etablieren, bei dem die Studienteilnehmenden des MRT-Projektes während der Patientenaufklärung über die anderen Teilprojekte informiert und die für diese erforderlichen Blutentnahmen beim Legen des Kontrastmittelzugangs durchgeführt wurden.



**Abbildung 1** Beispiel der durchgeführten MRT-Sequenzen bei einem gesunden Studienteilnehmer. A: koronare TIRM, B: koronare T1, C: axiale FLAIR (Kopf), D: axiale T2, E: axiale diffusionsgewichtete Sequenz (DWI), F: axiale T1 dixon mit Kontrastmittel.

#### AP4: Semantische Anreicherung der MRT- Daten

**MS3:** Erfolgreiche Patienten/innenrekrutierung mit Einschluss und erfolgreicher technischer Datenakquise in >95% der untersuchten Patienten/innen.

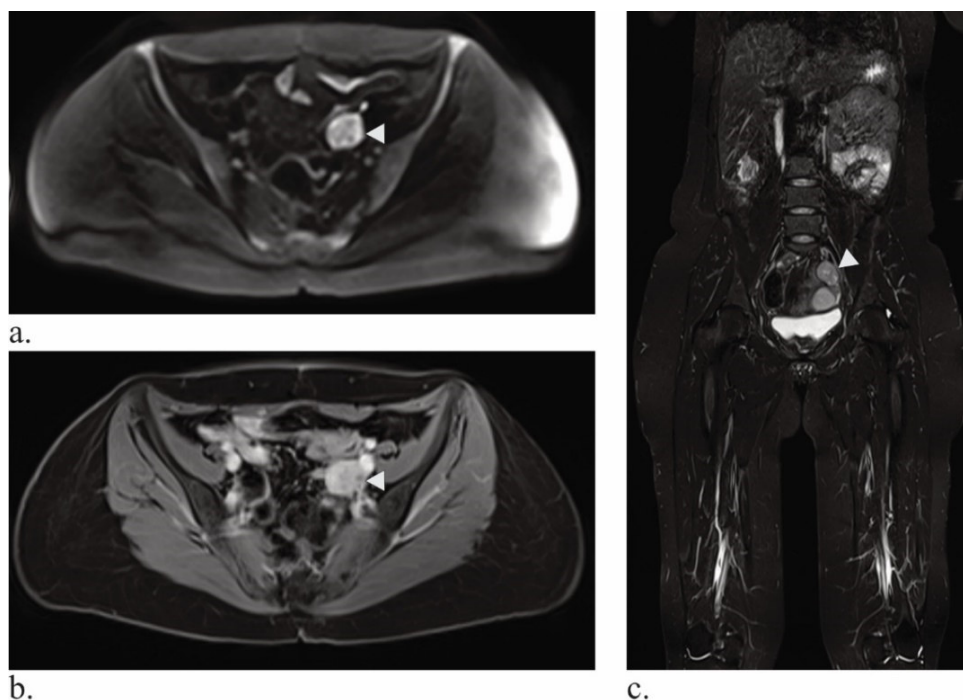
Nach Abschluss der klinischen Beurteilung erfolgte eine umfassende Auswertung der MRT-Daten durch die Studienärztin. Die quantitativen DWI-Parameter (ADC, Kurtosis) wurden erfolgreich berechnet und alle gewonnenen Daten in die zuvor angelegte Datenbank eingespeist. Alle in den klinischen Befunden beschriebenen Läsionen wurden jeweils in jeder angewandten MRT-Sequenz, einschließlich der DWI und den kontrastmittelgestützten Sequenzen, segmentiert. Zur Bewertung der Läsionsdetektion wurde eine 5-Punkte-Likert-Skala entwickelt, mithilfe derer drei ärztliche Reader erfolgreich die Sichtbarkeit der Läsionen in allen Sequenzen beurteilten. Zusätzlich wurden die Daten aller Abklärungsuntersuchungen, deren Indikation aufgrund der Ganzkörper-MRT gestellt wurde, gesammelt, um die Anzahl der falsch-positiven Befunde zu beurteilen. Bei der Auswertung der jährlichen Follow-Up-Untersuchungen wurde auf Grundlage der Ergebnisse zusätzlich eine erneute retrospektive Evaluation der vorhergehenden MRT hinsichtlich nicht beschriebener Läsionen durchgeführt, um falsch-negative Ergebnisse zu ermitteln. Alle Daten wurden mit vorliegenden Früherkennungsuntersuchungen verglichen, die vor Beginn der Studie extern und häufig in fragmentierten Einzeluntersuchungen bei den Studienteilnehmenden durchgeführt worden waren.

#### AP5: Translationale Funktions- und Machbarkeitsanalyse des POSIP-Ansatzes

**MS4:** Technische Machbarkeit hinsichtlich WP1-5 ist erfüllt. Die technische Sensitivität für die Detektion von Läsion beträgt >90%. Die Daten sind in >95% der Untersuchungen ausreichend und insgesamt von hervorragender Qualität.

Insgesamt wurden bei den eingeschlossenen 113 Studienteilnehmenden 188 Ganzkörper-MRT-Untersuchungen mit dem POSIP-Studienprotokoll durchgeführt. Die Auswertung der Fragebögen ergab insgesamt niedrige Angstlevel der Studienteilnehmenden während der Untersuchung, was eine reguläre jährliche Durchführbarkeit der Untersuchung zur Früherkennung bei Betroffenen mit LFS unterstützt. Der Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit vor Beginn der Studie extern durchgeführten Früherkennungsuntersuchungen zeigte eine deutliche Verkürzung der Untersuchungsdauer und eine verringerte Anzahl an Terminen für die LFS-Betroffenen.

Insgesamt konnten in den Untersuchungen 188 Läsionen detektiert und erfolgreich ausgewertet werden, wobei es sich bei 38 um behandlungsbedürftige Malignome handelte. Die MRT-Daten waren von durchweg hoher Qualität und demonstrierten nach Auswertung der jährlichen Folge- und zusätzlich indizierten Abklärungsuntersuchungen eine hervorragende Sensitivität des Protokolls für die im Zusammenhang mit dem LFS auftretenden Malignome (> 90%) sowie eine geringe Zahl an falsch-positiven Befunden (1.6% aller MRT-Untersuchungen). Besonders bei den hochauflösenden diffusionsgewichteten Sequenzen und der FLAIR-Sequenz des Kopfes bestätigten die Reader-Analysen eine äußerst sensitive Darstellung aller aufgetretenen Tumore, was die herausragende Bedeutung dieser beiden Sequenzen als entscheidende Grundpfeiler des Protokolls unterstreicht. So hätten laut Ergebnissen der Readerauswertung mithilfe der Kombination dieser beider Sequenzen mit einer regulären morphologischen T2-Sequenz alle in der Studie aufgetretenen Malignome detektiert werden können.



**Abbildung 2** Beispiel einer detektierten Läsion im kleinen Becken links bei einer Studienteilnehmerin. a: diffusionsgewichtete Sequenz (DWI), b: kontrastmittelgestützter T1, koronarer TIRM. Es zeigt sich eine hervorragende Sichtbarkeit der Läsion insbesondere in der DWI. I

#### AP6: Abschließende Evaluierung und Vorbereitung klinischer Trials

Die Ergebnisse der Studie zeigen eine gute Durchführbarkeit des MRT-Protokolls bei Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern mit LFS und eine deutliche Verkürzung der Untersuchungsdauer im Vergleich zu außerhalb der Studie durchgeführten fragmentierten Einzeluntersuchungen. Die Abbruchrate der MRT-Untersuchungen war gering, die Bereitschaft zur Teilnahme an jährlichen Folgeuntersuchungen hoch und die Fragebögen ergaben insgesamt geringe Angstgefühle während der Untersuchung, was eine problemlose Anwendbarkeit des Protokolls innerhalb eines regulären Krebsfrüherkennungsprogramms bei LFS bestätigt.

Die quantitativen und qualitativen Ergebnisse zeigten die Fähigkeit des Protokolls, maligne Läsionen im LFS zuverlässig zu detektieren. Die ausgezeichneten Resultate der kontrastmittelfreien Sequenzen,

insbesondere der diffusionsgewichteten Sequenz und der FLAIR-Sequenz, legen nahe, dass in Zukunft eine Verkürzung des Protokolls und gegebenenfalls ein Verzicht auf die regelmäßige Verabreichung von MRT-Kontrastmitteln in Betracht gezogen werden könnte. Um dies zu bestätigen, sind weitere längerfristige, multizentrische Verlaufsstudien erforderlich. Eine solche Studie bereiten wir in Kooperation mit den übrigen Subprojekten des ADDRESS-Verbundes für die nächste Förderperiode vor.

## TP8:

### **AP1: Molekulare Charakterisierung mittels DNA und RNA-Sequenzierung**

#### *MS1: DNA und RNA-Sequenzierung von DADDR-assoziierten Tumoren*

Da die COVID-19-Pandemie den Beginn der Datenerfassung in den anderen ADDRESS-Teilprojekten verzögerte, konnten wir auch Patienten aus unserem INFORM-Register mit relevanten Syndromen in ADDRESS aufnehmen. Für die INFORM-Patienten verfügten wir bereits über Whole-Exome-Sequenzierungsdaten (Tumor + Blut) sowie über RNA-seq- (Tumor) und DNA-Methylierungs-Array-Daten. Insgesamt haben wir bei 61 Patienten mit DADDR-assoziierten Tumoren eine Deep-Coverage-DNA-Sequenzierung (>30x Kontrolle; ~60-90x Tumor) durchgeführt. Zusätzlich wurde bei diesen Patienten, wenn RNA extrahiert werden konnte, eine gleichzeitige RNA-Sequenzierung durchgeführt.

#### *MS2: Bioinformatische QC und Analyse der Molekularen Daten*

Alle DNA- und RNA-Sequenzierungen durchliefen zunächst die standardisierte und gut validierte DKFZ ODCF QC- und Analyse-Pipeline (<https://github.com/DKFZ-ODCF>), welche SNV/Indel-Calling, CNV-Analysen über ACE-seq für deep WGS-Proben und strukturelle Variantenanalysen mit dem SOPHIA-Algorithmus durchführt.

#### *MS3: Analysieren von Mutations-Mustern der DADDR-Tumore*

Die Mutationsmuster in diesen DADDR-Tumoren wurden bisher auf mehreren Ebenen untersucht. Zunächst wurden allgemeine Mutationsanalysen durchgeführt, um festzustellen, ob diesen Tumorarten entitätsspezifische Mutationen in Genen oder Signalwegen zugrunde liegen. Für die Bewertung der Mutationssignaturen wurden zwei Methoden gleichzeitig angewandt. Für alle CPS-Typen, für die uns Daten aus der Ganzgenomsequenzierung vorliegen, haben wir mit SigProfiler (Alexandrov et. Al. 2022; PMID: 36388765) (<https://signal.mutationsignatures.com>) wurde zur Validierung dieser Mutationssignatur-Ergebnisse verwendet. Die YAPSA-Analyse wurde auch schon früher für diese Proben durchgeführt, aber seit der ursprünglichen Einreichung sind neuere, aktualisierte Tools zur Analyse der Mutationssignatur verfügbar. Daher haben wir für unsere Interpretation diese aktuelleren Instrumente verwendet. Obwohl die vollständige Interpretation noch nicht abgeschlossen ist, haben wir gesehen, dass es angereicherte Signaturen gibt, die anscheinend entitätsspezifisch sind, und einige, die für jede Art von DADDR im Vergleich zu anderen einzigartig sind.

### **AP2: Molekulare Charakterisierung mittels DNA-Methylierungs-Analysen**

#### *MS4: Infinium Methylierungs EPIC-Array der Tumorgewebe und des Normalgewebes*

Um die Ziele in AP2 zu erreichen, haben wir Infinium-Methylierungs-EPIC-Arrays für Tumorproben und, wenn möglich, für Normalgewebe durchgeführt. In einigen Fällen wurden für ältere Proben, die zu dieser Studie hinzugefügt wurden (d. h. INFORM-Proben), für die bereits 850/450k-Methylierungs-Array-Daten vorhanden waren, diese verwendet. Auf eine erneute Methylierungs-Analyse wurde verzichtet, da oftmals kein Material mehr zur Verfügung stand.

**MS5:** *Bioinformatische QC und Analyse der Methylierungs-Daten*

Die vom Array-Reader erzeugten idat-Dateien wurden gemäß dem Herstellerprotokoll auf allgemeine Qualitätskennzahlen geprüft.

**MS6:** *erweiterte methylierungs-basierte Klassifizierung der DADDR-Tumore*

Um zu beurteilen, wie ähnlich die Methylierungsprofile von DADDR-Tumoren den Methylierungsprofilen verwandter Tumorentitäten ohne DADDR-Syndrome sind, wurden ein „unüberwachtes Clustering“ und eine t-SNE-Dimensionsreduktion (van der Maaten und Hinton, 2008) zusammen mit Tumorproben verwandter Entitäten/sporadischer Gegenstücke derselben Diagnose durchgeführt, die in unserer Datenbank verfügbar sind. Die Tumorproben dieser DADDR-Fälle, bei denen es sich um ZNS oder Sarkome handelte, wurden entweder dem Standard-Methylierungsklassifikator für ZNS-Tumore oder im Falle von Sarkomen dem sarkom-spezifischen Klassifikator unterzogen, um eine möglichst genaue Subtyp-Assoziation auf der Grundlage der bekannten Pathologie und im Vergleich zu unserem großen Referenzsatz von Methylierungsprofilen, der alle verfügbaren Tumorentitäten enthält, zu erstellen (<https://www.molecularneuropathology.org/>).

**MS7:** *Untersuchung, ob Methylierungsmuster spezifisch sind für angeborene Erkrankungen*

Wir haben Analysen der Methylierungsdaten durchgeführt und führen diese noch immer durch, um herauszufinden, ob es DADDR-spezifische Methylierungsmuster gibt, die entweder entitätsspezifisch oder entitätsunabhängig sind. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte DADDR-Tumoren wie Li-Fraumeni weniger gut einem bestimmten Subtyp auf der Grundlage des Standard-Methyl-Klassifikators zugeordnet werden können, was möglicherweise auf die größere Menge an DNA-Schäden oder andere für diese Tumoren spezifische Merkmale zurückzuführen ist. Wir haben mit Hilfe der linearen Modellierung über Limma differenzielle Vergleiche durchgeführt, um festzustellen, welche spezifischen Methylierungsstellen für angeborene DADDR-Tumoren spezifisch sind und welche nicht. Wir hoffen, diese weiter zu erforschen, um herauszufinden, was diese spezifischen Stellen funktionell für die Krebspathogenese und das Alter des Auftretens bedeuten könnten. Außerdem hoffen wir, diese Erkenntnisse auf aktuelle Tumorklassifizierungsmethoden anwenden zu können, um diese Entitäten besser in ihre richtigen molekularen Subtypen einordnen zu können.

**MS8:** Zusammenführung der Ergebnisse/Daten aus DNA/RNA-Sequenzierung sowie Methylierungsanalysen

Wir planen, in naher Zukunft die von uns gesammelten multi-omischen Informationen zu integrieren, um zu sehen, ob es komplexere regulatorische Erklärungen gibt, die zum Verständnis von DADDR-Tumoren abgeleitet werden können. Wenn wir die verfügbaren WGS- und RNA-seq-Daten hinzufügen, können wir möglicherweise sogenannte meQTLs oder funktionelle Veränderungen in der Genexpression entdecken, die diese Tumoren in ihrer Pathogenese unterscheiden und möglicherweise als potenzielle prädiktive Biomarker zur Verbesserung der Früherkennung und Überwachung dienen.

## TP9:

### **AP1: Generierung von PDX-Modellen (n=4-5 PDX-Modelle/Jahr)**

#### **MS1:** Sammlung der Primärtumore

Für die Dauer dieses Teilprojekts haben wir frisches Tumormaterial von n = 5 Patienten mit DADDR erhalten: 2 Li-Fraumeni-Syndrom-assoziierte Medulloblastome (MB) und 3 Fanconi-Anämie-assoziierte Plattenepithelkarzinome. Es wurden darüber hinaus die Infrastruktur und Logistik verbessert, um die Anzahl und Menge an eingesandtem Tumormaterial zu erhöhen.

#### **MS2:** Etablierung der PDX-Etablierungs-Pipeline

Die Tumorentnahme und der Prozess der PDX-Generierung und -Expansion erfolgten gemäß den festgelegten SOPs. Isolierte Krebszellen wurden entweder orthotopisch (MB) oder subkutan (Karzinome) in immundefiziente NSG-Mäuse injiziert. Ein Modell (LFS-assoziiertes MB) wurde etabliert und wird derzeit mit Luciferase stabil transduziert, um die bildgebende Überwachung des Tumorwachstums in vivo zu erleichtern. Bei den übrigen vier Proben scheiterte der Versuch, ein PDX-Modell zu etablieren, an der unzureichenden Menge an Tumormaterial. Darüber hinaus wurden n=6 zuvor etablierte DADDR-assoziierte PDX-Modelle in unser Labor transferiert, expandiert und stabil mit Luciferase transduziert.

#### **MS3:** Molekulare Charakterisierung der etablierten PDX-Modelle

Da es keine vollständig etablierten Modelle gibt, wurde noch kein PDX molekular charakterisiert. Sobald der Luziferase-Markierungsprozess des LFS-assoziierten MB-Modells abgeschlossen ist, wird dieses PDX-Modell zur Charakterisierung durch die Pfister-Gruppe im Rahmen des TP8 bearbeitet werden.

## AP2: Drug-Screen

### *MS4: Etablierung der Medikamenten-Testungs-Pipeline*

Wir haben eine umfassende Arzneimittelbibliothek mit 345 Wirkstoffen entwickelt, darunter Kinaseinhibitoren (55,9 %), konventionelle Chemotherapie (16,5 %), differenzierende oder epigenetische Modifikatoren (9,9 %), apoptotische Modulatoren (6,4 %), Rapalogs (5,5 %), metabolische Modifikatoren (1,4 %) und andere Wirkstoffe (4,3 %). Einzelne Wirkstoffe wurden zunächst in etablierten In-vitro-Zelllinien untersucht, die zwei DADDRs modellieren: Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) und Constitutional Mismatch Repair Deficiency (CMMRD). Pro DADDR wurden zwei Hirntumor- und eine Nichttumor-Zelllinie verwendet. Anschließend wurde die genotoxische Wirkung ausgewählter Verbindungen in LFS-Fibroblasten mit Hilfe eines Mikronukleus-Assays untersucht. Nicht genotoxische Wirkstoffe wurden dann validiert und in Kombinationen in TP53mut-Krebszelllinien getestet, um das beste Wirkstoffpaar zu finden.

### *MS5: Screening der etablierten Modelle*

In Ermangelung vollständig etablierter Modelle wurde derzeit noch kein PDX für Medikamententests verwendet.

### *MS6: in vitro-Validierung der aussichtsreichsten Medikamente in Zell-Linien (n=5) für jeweils LFS und FA*

Im Rahmen des Single Drug Screening wurden 26 bzw. 16 positive Treffer für LFS und CMMRD identifiziert, die die folgenden Kriterien erfüllten: (a) DSS<sub>3</sub> kleiner als 10 in einer nicht kanzerösen Zelllinie; (b) dDSS<sub>3</sub> (Differenz zwischen den Werten in kanzerösen und nicht kanzerösen Zelllinien) größer als 20; (c) geringe bis keine genotoxische Wirkung in einer nicht kanzerösen Zelllinie (nur LFS). Wir fokussierten uns fortan auf LFS als Modellkrankheit aufgrund des signifikant grösseren Angebotes an Modellen in vitro und in vivo für LFS-Tumore. Wir bewerteten die Wirksamkeit der Wirkstofftreffer in den TP53<sup>mut</sup>-Hirnkrebszelllinien SJ-GBM2 und UW228-2, wobei wir E<sub>max</sub> > 50 % als zusätzliches Kriterium verwendeten. Die Wirkstoffe wurden in 3 biologischen Wiederholungen und 3 technischen Wiederholungen mit jeweils 7 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0.1nM und 10µM getestet. Sieben Wirkstoffe wurden als echte Positive identifiziert: 2 ATM/ATR-Inhibitoren, 2 CHK1/2-Inhibitoren, 2 Mikrotubuli-assoziierte Wirkstoffe und ein WEE1-Inhibitor. Anschließend führten wir ein in vitro-Kombinations-Screening durch. Da die identifizierten Kinaseinhibitoren auf denselben Signalweg abzielen, wurde jeder von ihnen nur in Kombination mit Mikrotubuli assoziierten Wirkstoffen getestet. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei ein Matrixdesign und die Software "SynergyFinder+" zur Berechnung der Synergiewerte verwendet wurden. Die wirksamste Kombination war der WEE1-Inhibitor Adavosertib mit dem Mikrotubuli assoziierten Wirkstoff Vincristin. In einer Kooperation mit dem Labor von Dr. Marcel Kool am Princess Máxima Center wird die ausgewählte Kombination in vitro in von Patienten abgeleiteten Organoiden (PDOs) getestet. Die vorläufigen Ergebnisse in zwei SHH-MB-PDOs unterstützen unsere Beobachtungen hinsichtlich der Wirksamkeit der Adavosertib-Vincristin-Kombination und ihrer additiven Wechselwirkung. Weitere Tests in anderen TP53<sup>mut</sup> SHH-MB PDOs werden noch durchgeführt.

### *MS7: in vivo-Validierung der aussichtreichsten Medikamente (oder Medikamenten-Kombinationen)*

Der Tierversuchsantrag für die In-vivo-Wirkstoffprüfung wurde vom RP Karlsruhe genehmigt. Das In-vivo-Projekt besteht aus zwei Teilen: Toxizitätsprüfung im LFS-Mausmodell und Wirksamkeitsprüfung in drei LFS-SHH-MB-PDX-Modellen. In beiden Teilen werden die Tiere in 4 Gruppen eingeteilt: Kontrolle, Adavosertib-Behandlung, Vincristin-Behandlung und Kombinationsbehandlung. Im ersten

Teil werden die Überlebensrate der Mäuse, die organspezifische Toxizität sowie postmortale DNA-Schadensmarker untersucht. Im zweiten Teil werden wir das Überleben der Mäuse und die Tumorgroße analysieren. Die In-vivo-Versuche sind für den Zeitraum von Ende 2023 bis Ende 2024 geplant.

Darüber hinaus wurde eine wegweisende Studie über den klinischen Verlauf von pädiatrischen LFS-Medulloblastomen mit der derzeit grössten bekannten klinischen Kohorte hochrangig in Neuro-Oncology publiziert (Kolodziejczak AS et al: Clinical outcome of pediatric medulloblastoma patients with Li-Fraumeni syndrome. Neuro Oncol. 2023 Jun 28;noad114. doi: 10.1093/neuonc/noad114. Online ahead of print.).

## **2. wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Diese werden im Verwendungsnachweis dargestellt.

## **3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Durch die umfassenden Analysen mehrerer DAADRs konnten wir wesentlich dazu beitragen ein besseres Verständnis sowohl der molekularen als auch der klinischen Aspekte zu erlangen.

So können betroffene Familien durch bessere Information und Kommunikation dazu befähigt werden, die genetischen und funktionellen Ursachen ihrer Krankheit zu erkennen und somit die Krebsüberwachung verbessern, was das Ergebnis für die betroffenen Personen drastisch verbessert. Patienten mit DADDRs stehen neue Wege der Krebstherapie zur Verfügung und überwindet so die Hürde der derzeit verfügbaren Krebsbehandlungen, die mit schlechten Behandlungsergebnissen und schweren Toxizitäten verbunden sind. Das Projekt verbessert sowohl die Lebensqualität als auch die Ergebnisse der Betroffenen nachhaltig.

## **4. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

## **5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Trifft nicht zu.

## **6. Veröffentlichungen der Ergebnisse**

Kolodziejczak AS, Guerrini-Rousseau L, Planchon JM, Ecker J, Selt F, Mynarek M, Obrecht D, Sill M, Autry RJ, Zhao E, Hirsch S, Amouyal E, Dufour C, Ayrault O, Torrejon J, Waszak SM, Ramaswamy V, Pentikainen V, Demir HA, Clifford SC, Schwalbe EC, Massimi L, Snuderl M, Galbraith K, Karajannis MA, Hill K, Li BK, Walsh M, White CL, Redmond S, Loizos L, Jakob M, Kordes UR, Schmid I, Hauer J, Blattmann C, Filippidou M, Piccolo G, Scheurlen W, Farrag A, Grund K, Sutter C, Pietsch T, Frank S, Schewe DM, Malkin D, Ben-Arush M, Sehested A, Wong TT, Wu KS, Liu YL, Carceller F, Mueller S, Stoller S, Taylor MD, Tabori U, Bouffet E, Kool M, Sahm F, von Deimling A, Korshunov A, von Hoff K,



Kratz CP, Sturm D, Jones DTW, Rutkowski S, van Tilburg CM, Witt O, Bougeard G, Pajtler KW, Pfister SM, Bourdeaut F, **Milde T.**: Clinical outcome of pediatric medulloblastoma patients with Li-Fraumeni syndrome. *Neuro Oncol.* 2023 Jun 28:noad114. doi: 10.1093/neuonc/noad114

Hasselblatt M, Thomas C, Federico A, Nemes K, Johann PD, Bison B, Bens S, Dahlum S, Kordes U, Redlich A, Lessel L, Pajtler KW, Mawrin C, Schüller U, Nolte K, Kramm CM, Hinz F, Sahm F, Giannini C, Penkert J, Kratz CP, **Pfister SM**, Siebert R, Paulus W, Kool M, Frühwald MC. SMARCB1-deficient and SMARCA4-deficient Malignant Brain Tumors With Complex Copy Number Alterations and TP53 Mutations May Represent the First Clinical Manifestation of Li-Fraumeni Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology* 2022; 46(9): 1277-1283

Kratz CP, Smirnov D, Autry R, Jäger N, Waszak SM, Grosshennig A, Berutti R, Wendorff M, Hainaut P, **Pfister SM**, Prokisch H, Ripperger T, Malkin D. Heterozygous BRCA1/2 and Mismatch Repair Gene Pathogenic Variants in Children and Adolescents with Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2022; 114(11): 1523-1532

Penkert J., Struwe F.J., Dutzmann C.M., Doergeloh B.B., Montellier E., Freycon C., Keymling M., Schlemmer H.P., Sängler B., Hoffmann B., Gerasimov T., Blattmann .C, Fetscher S., Frühwald M., Hettmer S., Kordes U., Ridola V., Kroiss Benninger S., Mastronuzzi A., Schott S., Nees J., Prokop A., Redlich A., Seidel M.G., Zimmermann S., Pajtler K.W., **Pfister S.M.**, Hainaut P., Kratz C.P. Genotype-phenotype associations within the Li-Fraumeni spectrum: a report from the German Registry. *Journal of Hematology & Oncology* 2022; 15(1): 107

**Pfister SM**, Reyes-Múgica M, Chan JKC, Hasle H, Lazar AJ, Rossi S, Ferrari A, Jarzembowski JA, Pritchard-Jones K, Hill DA, Jacques TS, Wesseling P, López Terrada DH, von Deimling A, Kratz CP, Cree IA, Alaggio R. A Summary of the Inaugural WHO Classification of Pediatric Tumors: Transitioning from the Optical into the Molecular Era. *Cancer Discovery* 2022; 12(2): 331-355

Suwala AK, Stichel D, Schrimpf D, Kloor M, Wefers AK, Reinhardt A, Maas SLN, Kratz CP, Schweizer L, Hasselblatt M, Snuderl M, Abedalthagafi MSJ, Abdullaev Z, Monoranu CM, Bergmann M, Pekrun A, Freyschlag C, Aronica E, Kramm CM, Hinz F, Sievers P, Korshunov A, Kool M, **Pfister SM**, Sturm D, Jones DTW, Wick W, Unterberg A, Hartmann C, Dodgshun A, Tabori U, Wesseling P, Sahm F, von Deimling A, Reuss DE. Primary mismatch repair deficient IDH-mutant astrocytoma (PMMRDIA) is a distinct type with a poor prognosis. *Acta Neuropathologica* 2021; 141(1): 85-100



### Teil III: Erfolgskontrollbericht (intern BMBF)

Siehe extra Formular