

Schlussbericht

Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL)

Standort: Translational Lung Research Center Heidelberg

Partner: Universitätsklinikum Heidelberg & Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Förderkennzeichen: 82DZL004A1

Förderperiode: 01.01.2016 – 31.12.2020

Autoren: Sebastián Boutin, Uwe Haberkorn, Hans-Ulrich Kauczor, Heimo Mairbäurl, Marcus Mall, Martina Muckenthaler, Olaf Sommerburg, Mirjam Stahl, Albrecht Stenzinger, Birgit Teucher, Mark Wielpütz.

Gefördert durch



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Baden-Württemberg

MINISTERIUM FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND KUNST

Hinweis: Die Abschnitte I und III/1 beschreiben übergreifende Aspekte und sind bei allen DZL-Partnern weitgehend textgleich.

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis für das Vorhaben FKZ 82DZL004A1

Zuwendungsempfänger: Universitätsklinikum Heidelberg / Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (TLRC)
Vorhabenbezeichnung: Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL)
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2016 – 31.12.2020

I. Kurze Darstellung des Vorhabens

– Aufgabenstellung und Zielsetzung

Lungenkrankheiten gehören zu den weltweit häufigsten Todesursachen. Es wird erwartet, dass ihre Häufigkeit und die damit einhergehende sozioökonomische Belastung in den nächsten Jahrzehnten weiter ansteigt. Mit dem Zusammenschluss der fünf führenden deutschen Lungenforschungszentren (Airway Research Center North (ARCN), Biomedical Research in Endstage and Obstructive Lung Diseases Hannover (BREATH), Universities of Giessen & Marburg Lung Center (UGMLC), Translational Lung Research Center Heidelberg (TLRC) und Comprehensive Pneumology Center Munich (CPC-M)) wurde im November 2011 das Deutsche Zentrum für Lungenforschung (DZL), gegründet. Alle Partner stimmten einer kohärenten Forschungsstrategie zu, um die Mission des DZL zu erfüllen: **Translationale Forschung zur Bekämpfung weitverbreiteter Lungenkrankheiten.**

Das DZL-Programm fokussiert sich auf folgende **Krankheitsbereiche (DA – disease areas)**: Asthma und Allergie (AA), Chronische Obstruktive Lungenerkrankung/Emphysem (COPD), Zystische Fibrose (CF), Pneumonie und Akute Lungenschädigung (ALI), Diffuse Parenchymale Lungenerkrankungen (DPLD), Lungenhochdruck (PH), Lungenerkrankungen im Endstadium (ELD) und Lungenkrebs (LC). Für jede der untersuchten Krankheiten gilt, dass sich DZL-Forscher mit dem gesamten translationalen Forschungsprozess *from bench to bedside* („vom Labor bis zum Krankenbett“) befassen: Von der Untersuchung der molekularen Charakteristika und Mechanismen der Krankheit in humanem Biomaterial, humanen/experimentellen Zellsystemen und Tiermodellen bis hin zur Verwendung dieser Daten in der Praxis – z.B. als Grundlage für innovative klinische Studien oder in der praktischen Anwendung in der Patientenversorgung. Umgekehrt werden Erkenntnisse aus dem klinischen Bereich genutzt, um neue Basisforschung anzuregen (*from bench to bedside to bench*). Ein übergeordnetes wissenschaftliches Konzept verbindet die verschiedenen Krankheitsbereiche. Die Forschung ist in kooperativen Programmen

organsiert und wird von zentralen Plattformen (Management, Biobank und Datenmanagement, Bildgebung) sowie einer Vielzahl von eigenen oder assoziierten Kohorten und Registern sowie dem **Clinical Trial Board** ergänzt.

Das **DZL-Technologietransfer-Konsortium** unterstützt die Verwertung innovativer Erkenntnisse. In der **DZL Academy** werden junge Wissenschaftler durch zielgerichtete Programme wie die Finanzierung von Forschungsaufenthalten an anderen DZL-Standorten, lungenspezifische Vorlesungsreihen und wissenschaftliche Symposien, die Deutsch-Französische Lungenschule sowie dem Angebot des Mentorings gefördert.

Verschiedene Maßnahmen wie internationale Symposien, eine starke Internetpräsenz, Pressemitteilungen über DZL- und Standort-Websites sowie den Informationsdienst Wissenschaft, DZL-geförderte Publikationen und der patientenbezogene **Lungeninformationsdienst** (LID) sorgen für die öffentliche Wahrnehmung des DZL.

Mit der Evaluierung des DZL zum Abschluss der ersten Förderperiode (2011-15) wurden alle Programme der Krankheitsbereiche für das **DZL 2.0 (2016-20)** angepasst, um Erkenntnisse und technologische Durchbrüche über einen DZL-weiten iterativen Prozess einzubeziehen. Der gegenseitige Austausch von Ideen und Erkenntnissen über Forschungsbereiche hinweg soll weiter gefördert werden, z. B. durch die Etablierung von bereichsübergreifenden Forschungsthemen. Die Strategien der Plattform Biobanking und der Imaging-Plattform wurden umgestaltet, um die Vereinheitlichung von Verfahren und SOPs weiter zu fördern, das zentrale Datenmanagement (Data Warehouse) zu optimieren und die systembiologische/medizinische Analyse von DZL-Daten zu erleichtern.

Zusätzliche krankheitsspezifische Register/Kohorten, die weitere Interessensgebiete des DZL adressieren, sollen mit den jeweiligen Krankheitsbereichen (intern finanziert oder angegliedert) verbunden werden. Zudem soll sich das DZL mit extern finanzierten bevölkerungsbasierten Kohorten vernetzen. Das Programm der DZL Academy soll um neue Module erweitert und durch Einrichtung eines DZL Academy Boards besser strukturiert werden.

Neben CAPNETZ sollen im DZL 2.0 auch COSYONET und PROGRESS DZL-Partner werden, die DZL-Mittel erhalten. Wie im DZL 1.0 werden aus dem DZL-Budget lokale Infrastrukturen, Professuren und Nachwuchsgruppen sowie Standortbeiträge für zentrale wissenschaftliche Aktivitäten und Infrastrukturen wie Plattformen und gemeinsame Aktivitäten aus den Krankheitsbereichen finanziert: Das Gesamtbudget für zentrale gemeinsame Aktivitäten wird sich im DZL 2.0 um mehr als 60 % erhöhen.

– **Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Das DZL wurde im Herbst 2011 als eines von sechs Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung (DZG) gegründet. Es ist als eingetragener Verein mit Sitz und Geschäftsstelle in Gießen organisiert. Die Mitgliedsorganisationen gliedern sich in fünf Standortverbünde (siehe „Zusammenarbeit mit anderen Stellen“, unten). Das DZL wird durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und die Bundesländer, in denen die jeweiligen Standortverbünde angesiedelt sind, gefördert. Die Finanzverwaltung im Auftrag des BMBF (90% der Mittel) und der Länder (10%) erfolgt durch das HelmholtzZentrum München, das Mittel an die Zuwendungsempfänger weiterleitet.

Das DZL wurde in den Jahren 2016-20 aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Förderperiode (2011-15) fortgeführt (siehe unten). Mit der Evaluierung im Jahr 2015 wurde das ursprüngliche Programm basierend auf den Vorschlägen von Gutachtern und Wissenschaftlichem Beirat in einzelnen Punkten angepasst, um aktuellen Entwicklungen Rechnung zu tragen.

– **Planung und Ablauf des Vorhabens,**

Genaue Planung und Ablauf des Vorhabens sind im Meilensteinplan im Anhang detailliert dargelegt.

– **wissenschaftlich und technischer Stand, an den angeknüpft wurde (Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte sofern relevant)**

Grundlage für die zweite Förderperiode des DZL waren insbesondere die förderpolitischen Ergebnisse der ersten Förderperiode. Dabei sind zu nennen:

- Einbindung von 218 Wissenschaftlern/Ärzten in das DZL-Netzwerk
- Rekrutierung von international ausgewiesenen Wissenschaftlern aus dem In- und Ausland
- Einbindung internationaler, renommierter Wissenschaftler in den Beirat
- Durchführung von thematisch fokussierten, internationalen Symposien
- Aufbau und Gestaltung einer DZL-Website mit Bereich für die Mitglieder
- Bereitstellung von kompetitiven Mitteln für frühe klinische Studien (*investigator initiated*)
- Aufbau zentraler Daten-, Gewebe-, und Bilddatenbanken mit einheitlichen SOPs, Einverständniserklärungen, etc.
- Aufbau von Nachwuchsprogrammen (Mentoring, Deutsch-Französische Lungen-schule)

- Publikationen (gesamt: ca. 2000, Impact-Faktor >10: 240)
- DZL-Beteiligung an klinischen Kohorten und Registern
- Informationen für Patienten durch Einbindung des Lungeninformationsdiensts am Helmholtz Zentrum München (www.lungeninformationsdienst.de)

Im **Bereich der Translation** (vom Forschungsergebnis zum Patienten) konnten in der ersten Förderperiode bereits Ergebnisse erzielt werden:

- Weltweite Zulassung einer neuen Therapie für Pulmonal-arterielle Hypertonie (Riociguat) (PH)
- Zulassung der weltweit ersten Therapie für chronisch-thromboembolische Pulmonale Hypertonie (Riociguat) (PH)
- Erstmaliger definitiver Nachweis der Wirksamkeit einer neuen, anti-proliferativen Therapie (Imatinib) bei Pulmonal-arterieller Hypertonie, allerdings noch keine Zulassung wegen Nebenwirkungen (PH)
- Erfolgreiche erste Studie eines neuen Therapieansatzes am Menschen (GATA-3-DNAzym) bei Asthma (AA)
- Erfolgreiche erste Studie eines neuen Therapieansatzes am Menschen (GM-CSF-Inhalation) bei akutem Lungenschaden (ALI)
- Erfolgreicher erster Einsatz der Wach-ECMO (extrakorporale Membran-oxygenierung) am Patienten bei Lungenerkrankung im Endstadium (ELD)
- Weltweit erste präventive Studie (hypertone Kochsalzlösung) bei Kleinkindern mit Mukoviszidose (CF)
- Erste Anwendung neuer diagnostischer Methoden am Patienten (morpho-funktionelles MRI der Lunge (PLI), funktionale Bestimmung des CTFR durch intestinale Messung (CF))

Die Entwicklungen in der **Plattform Biobanking** waren von wissenschaftlichem Nutzen für das gesamte DZL. Der Zugriff auf Biomaterialien und klinische Daten aus den Bereichen aller Disease Areas stellt für die DZL-weite und darüber hinaus gehende Lungenforschung einen absoluten Mehrwert dar. Des Weiteren stellen die geleisteten Arbeiten einen wichtigen Schritt zur Vernetzung des Biobankings zwischen den DZGs und weiteren nationalen Biobankstrukturen (z.B. AG Biobanken der Technologie- und Methodenplattform für die vernetzte medizinische Forschung, TMF, und German Biobank Node, GBN) dar.

– Inhalte und Ergebnisse

Die vielfältigen und sich ergänzenden institutionellen Ausrichtungen der DZL-Partner in Bezug auf die Forschungsschwerpunkte und Expertisen, die **Bündelung der monetären (institutionelle Budgets, DZL-Budget, weitere Drittmittel) und nicht-monetären Ressourcen (Wissen, Technologien, Biobanken, Patientenkohorten etc.)** sowie die Anreize für standortübergreifende Kooperationen und Austauschprogramme waren von zentraler Bedeutung für den Erfolg des DZL.

Über die [DZL Academy](#) wurden junge Wissenschaftler durch zielgerichtete Programme gefördert, wie z.B. die Finanzierung von Forschungsaufenthalten an anderen DZL-Standorten, lungenspezifische Vorlesungsreihen und wissenschaftliche Symposien sowie das Angebot des Mentoring. Über die DZL-Homepage, die Organisation von internationalen Symposien und eine exzellente Publikationsleistung hat sich die Sichtbarkeit des DZL in der nationalen und internationalen Forschungslandschaft fest etabliert.

Die Forschung im DZL wird zu einem hohen Maße in standortübergreifenden Projekten organisiert und profitiert von der Etablierung zahlreicher **krankheitsspezifischer Patientenkohorten/-register** und einem zentralen Gremium zur DZL-internen Förderung **klinischer IIT-Studien** (*investigator initiated trials*). In der Förderperiode 2016-2020 wurden 14 klinische Studien (Fördervolumen: 5,69 Mio. €) und 14 Projekte zur Antragsstellung (inkl. Einholung der behördlichen Genehmigungen) für geplante klinische Studien (Fördervolumen: 414 T€) unterstützt. Die Öffentlichkeitsarbeit des DZL fokussiert sich weiterhin auf die starke Präsenz des [Lungeninformationsdiensts](#) im Internet und dessen Organisation von Patientenforen sowie alljährlichen Gesprächsrunden der DZL-Pneumologen und -Wissenschaftler mit Patientenorganisationen im Rahmen der Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie.

Die zentralen **Plattformen Bildgebung und Biobank/Datenmanagement** sind essentielle Infrastrukturen geworden, die die enge Zusammenarbeit zwischen den Krankheitsbereichen fördern. Das **DZL Data Warehouse** umfasst mittlerweile Daten von 37.000 Patienten. Das zentrale Datenmanagement und die weitere Entwicklung der Funktionalität des Data Warehouse inklusive der Harmonisierung von Daten und Prozessen sind entscheidend für die optimale Nutzung dieser einmaligen Ressource. Das **DZL-Technologie-Transfer-Konsortium** unterstützt weiterhin die Verwertung innovativer Forschungsergebnisse.

In der zweiten Förderperiode wurden zusätzliche **strategische Partnerschaften** eingegangen, um die Expertise im DZL und den Ausbau der zur Verfügung stehenden Patientendaten zu stärken, insbesondere hinsichtlich der longitudinalen Beobachtung von Patienten mit COPD (COSYCONET, 2016), der Prävalenz von Lungenerkrankungen in der allgemeinen Bevölkerung in Deutschland (NAKO-Gesundheitsstudie, 2016), der Untersuchung der genetischen Basis von Pathogenese und Resistenz der ambulant

erworbenen Pneumonie (PROGRESS, 2016/17), der Epidemiologie von Lungen-erkrankungen (Robert-Koch-Institut, 2017), der translationalen Lungenforschung im Bereich Bronchiektasen, die nicht durch Zystische Fibrose verursacht wurden (PROGNOSIS, 2016/17) sowie auch im Bereich Zystische Fibrose, Pneumonie und akutes Lungenversagen (Berlin Institute of Health, BIH, 2018).

Zu den **herausragenden Erfolgen** zählen die weltweite Genehmigung einer vom DZL geförderten neuen Medikation für PH, die Entwicklung von neuen pharmakologischen Ansätzen zur Bekämpfung von allergischem Asthma, COPD und akutem Lungenversagen, enorme Fortschritte in der Früherkennung und Behandlung von Zystischer Fibrose, die Etablierung von Wach-ECMO im Endstadium von Lungenerkrankungen, innovative Entwicklungen hin zu einer implantierbaren Lunge und neuartige Bildgebungstechniken – erstmals angewendet am Menschen. In allen Krankheitsbereichen wurden neue therapeutische Angriffspunkte identifiziert und in die präklinische Testung eingebracht sowie neuartige Zell- und Tiermodelle etabliert. Bis heute wurden aus DZL-mitfinanzierten Projekten hervorgehend knapp **50 Patente und Lizenzen** angemeldet bzw. erteilt. DZL-Wissenschaftler haben allein in den vergangenen fünf Jahren (2016 – 2020; DZL 2.0) mehr als **700 Manuskripte in hochrangigen Fachzeitschriften** (Impact-Faktor >10) der Lungenforschung bzw. Fachzeitschriften der lungen-relevanten Grundlagenforschung veröffentlicht. DZL-Wissenschaftler sind in über 250 klinische Studien der Phasen I-IV involviert und kooperieren mit über 100 internationalen kommerziellen Partnern, insbesondere im Rahmen von Projekten der Grundlagen- und angewandten Forschung, als auch in der Durchführung von klinischen Studien.

Über die fünf DZL-Standorte hinweg wurden **21 Professuren bzw. Nachwuchsgruppenleiter** mit der Unterstützung von DZL-Mitteln eingerichtet und international renommierte Professoren mit einem Schwerpunkt in der lungenrelevanten Forschung erfolgreich angeworben. Das Portfolio der zentralen Einrichtungen, die allen Standorten gleichermaßen zur Verfügung stehen, wurde erheblich erweitert und neue, dem DZL gewidmete Forschungsgebäude/Labore wurden bereits an spezifischen Standorten etabliert oder sind in Planung. Die **Anbindung von großen klinischen Lungenzentren an die Universitätsmedizin** (ARCN, TRLC, CPC-M) wurde erst durch die Gründung des DZL erreicht und dies hat die Forschungslandschaft für die Lunge in Deutschland nachhaltig geändert. Ohne diesen Zusammenschluss wäre die Bereitschaft zu der nun bestehenden kooperativen Zusammenarbeit zwischen Zentren sowie Grundlagenwissenschaftlern und Klinikern bei weitem nicht so erfolgreich. Das hat auch zu einem in Deutschland noch nie dagewesenen Ausbau der Methodenkompetenz, der technologischen Anlagen und der wissenschaftlichen Expertise für die Lungenforschung beigetragen.

Mit der im Sommer 2017 empfohlenen Weiterentwicklung des Fördermodells der Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung hat der **Wissenschaftsrat** den DZG gegenüber seine hohe Anerkennung für die geleistete Forschung ausgesprochen. Es heißt

weiter, dass das Modell DZG sich zum einen in der Förderung der translationalen Forschung und zum anderen in der Erhöhung der Sichtbarkeit und Anerkennung der Forschung weltweit verdient gemacht hat. Der Wissenschaftsrat empfiehlt die Stärkung der bahnbrechenden Rolle des DZL und seiner fünf Partnerstandorte sowie bei Bedarf die Aufnahme weiterer Partner.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die in den ersten beiden Förderperioden geleistete Zusammenführung der leitenden deutschen Lungenzentren zu einem nationalen Zentrum mit einer kohärenten Forschungsstrategie und starken kooperativen Aktivitäten einen messbaren Mehrwert für die Lungenforschung in Deutschland generiert und die internationale Sichtbarkeit erheblich gestärkt hat. Das DZL geht mit den gewonnenen Erkenntnissen in die **dritte Förderperiode (2021-23)**.

– **konkreter Nutzen und Anwendungsmöglichkeiten der Ergebnisse**

Die Forschungsergebnisse des DZL haben zu zahlreichen hochrangigen Publikationen geführt und Eingang in Leitlinien gefunden (siehe Abschnitt „Inhalt und Ergebnisse“). Um die Nutzung unserer Forschungsergebnisse zu fördern, wurden sie auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt. Ein DZL International Symposium wurde im Jahr 2016 eigens dafür organisiert. Zahlreiche angemeldete Patente und Ergebnisse klinischer Studien bieten Anwendungsmöglichkeiten unserer Forschung zur Verbesserung von Prävention, Diagnostik und Therapie von Lungenerkrankungen. Einen konkreten Nutzer hatten auch Patienten, die an unseren, größtenteils gemeinsam mit dem Lungeninformationsdienst durchgeführten Informationsveranstaltungen – entweder beispielsweise aus Anlass des fünfjährigen Bestehens des DZL an den Standorten oder während des DGP-Kongresses – teilgenommen haben.

– **Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Im Deutschen Zentrum für Lungenforschung arbeiten rund 260 Wissenschaftler und ihre Arbeitsgruppen aus 29 universitären und nicht-universitären Forschungseinrichtungen sowie Kliniken an fünf deutschen DZL-Standorten und weiteren Standorten der assoziierten Partner zusammen. Ein intensiver Austausch sowohl der DZL-Forscher zwischen den Standorten als auch des gesamten Verbundes ist daher von immenser Bedeutung für das gemeinsame Ziel, Lungenerkrankungen bestmöglich zu erforschen und bekämpfen zu können. Neben wöchentlichen Telefon-/Videokonferenzen und zahlreichen regelmäßigen Treffen der Arbeitsgruppen, Gremien und administrativen Einheiten ist insbesondere das DZL-Jahrestreffen ein wichtiges Instrument, diese Kooperation zu befördern.

Mit zuletzt ca. 500 Teilnehmern und mehr als 270 Postern im Januar 2020 bietet das Jahrestreffen ein erfolgreiches Forum zur Darstellung der Forschungsfortschritte und der Vernetzung. Das bereits in der ersten Förderperiode (2011 - 2015) vom DZL initiierte und

gesponserte internationale Symposium (internationale Referenten und Teilnehmer) wurde 2016 weitergeführt. Beide Konferenzen wechseln zwischen den Standorten und tragen somit auch zur Vernetzung der Forschung zwischen den Standorten und Kooperationsanbahnung mit externen/internationalen Partnern bei. Die Mitglieder des wissenschaftlichen Beirates des DZL stehen dem Vorstand hinsichtlich der Ausgestaltung des Forschungsprogramms und der Weiterentwicklung des Zentrums beratend zur Seite.

Die Mitglieder und assoziierten Mitglieder des DZL:

ARCN	LungenClinic Grosshansdorf	Ghd
	Forschungszentrum Borstel	FZB
	Christian-Albrechts-Universität Kiel	CAU
	Universität zu Lübeck	UzL
	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck	UKSH HL
	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel	UKSH KI
BREATH	Medizinische Hochschule Hannover	MHH
	Fraunhofer-Institut ITEM	ITEM
	Leibniz-Universität Hannover	LUH
UGMLC	Justus-Liebig-Universität Gießen	JLU
	Philipps-Universität Marburg	UMR
	Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim	MPI-BN
TLRC	Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg	RKU
	Thoraxklinik Heidelberg	Thorax
	European Molecular Biology Laboratory	EMBL
	Deutsches Krebsforschungszentrum	DKFZ
CPC-M	HelmholtzZentrum für Gesundheit und Umwelt	HMGU
	Ludwig-Maximilians-Universität München	LMU
	Klinikum der Universität München	KUM
	Asklepios Fachkliniken Gauting	ASK

Das DZL hat sich seit seiner Gründung an mehreren **Netzwerken zu Erforschung verschiedener Lungenkrankheiten** beteiligt und ist mit weiteren Organisationen assoziiert, die zur Realisierung der Forschungsvorhaben beitragen. Die Erweiterung und der Ausbau der Partnerschaften in den Bereichen Wissenschaft und Forschung, Nachwuchsförderung, Patienteninformation und -interessen, klinische Studien, Industrie und Aufklärungsarbeit werden aktiv verfolgt.

Das DZL kooperiert eng mit dem am HelmholtzZentrum München ansässigen **Lungeninformationsdienst (LID)** und unterstützt das Angebot allgemeinverständlich aufbereiteter Information aus Forschung und Klinik rund um Lungenerkrankungen. Die Wissenschaftler und Ärzte der DZL-Standorte übernehmen für die redaktionellen Beiträge des LID und individuelle Anfragen an den LID eine beratende Funktion. Gemeinsam mit dem DZL richtete der Lungeninformationsdienst Patientenforen an verschiedenen Standorten des Zentrums aus.

Bereits seit Gründung des DZL besteht eine enge Zusammenarbeit mit dem Netzwerk COSYCONET (German **C**OPD and **S**ystemic consequences – **C**omorbidities **N**ETwork) durch Wissenschaftler, die beiden Einrichtungen angehören. Seit 2016 wird die Zugehörigkeit von COSYCONET zum DZL durch den Status als assoziierter Partner sowie finanzielle Unterstützung aus dem DZL-Budget untermauert. An dem deutschlandweiten Register für die Lungenerkrankung COPD, der weltweit dritthäufigsten Todesursache, sind 29 Studienzentren beteiligt. Im Rahmen der Kohortenstudie wird eine Langzeitbeobachtung an mehr als 2.700 COPD Patienten durchgeführt. Die Untersuchungen sollen neue Daten zur Entwicklung der Erkrankung, ihrem Schweregrad und ihren Begleiterkrankungen liefern. COSYCONET verfügt über eine Biobank, eine Bilddatenbank sowie phänotypische Daten, die als Grundlage für die verschiedenen Teilprojekte dienen

Seit Beginn des DZL ist CAPNETZ (German Competence Network for **C**ommunity-**A**cquired **P**neumonia) assoziierter Partner des DZL. Das Kompetenznetzwerk hat sich zum Ziel gesetzt, neue Erkenntnisse zur Entstehung und zum Verlauf der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP) zu gewinnen, verbesserte diagnostische Standards und Therapien zu entwickeln, sowie Aufklärung und Prävention zu stärken. Mit der europaweit größten, über 12.000 registrierten Patienten umfassenden epidemiologischen Studie und der weltweit umfangreichsten Datenbank zu CAP hat das DZL einen starken Partner gewonnen.

Register und Patientenkohorten sind für die translationale Forschung im DZL von großer und zunehmender Bedeutung. Große Kohorten und Register werden durch assoziierte Institutionen ins DZL eingebracht:

- PROGNOSIS (the PROspective German Non-CF Bronchiectasis Registry), Teil von EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration)
- Ped CAPNETZ (pädiatrische CAP-Kohorte innerhalb von CAPNETZ)
- COMPERA (Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension)

- NAKO (Nationale Gesundheitsstudie)
- PROGRESS (Pneumonia Research Network on Genetic Resistance and Susceptibility for the Evolution of Severe Sepsis)
- PRI (Pulmonary Research Institute) an der LungenClinic Grosshansdorf, seit 2015
- RKI (Robert-Koch-Institut), seit März 2017
- BIH (Berliner Institut für Gesundheitsforschung), seit März 2018

Strategische Partnerschaften wurden mit den beiden in der Lungenforschung relevanten Fachgesellschaften, der DGP (Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin) und der GPP (Gesellschaft für pädiatrische Pneumologie) eingegangen. Zudem ist die Fachzeitschrift der DGP, die „Pneumologie“, Organ des DZL. In ihr erscheinen regelmäßig die „Mitteilungsseiten des DZL“, in denen Entwicklungen und Nachrichten des DZL an das deutschsprachige Fachpublikum kommuniziert werden.

Mit den anderen **Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung (DZG)** erfolgt ein regelmäßiger Austausch. Diese Zusammenarbeit ermöglicht es, dass Fragestellungen, die alle DZG betreffen, nicht mehrfach separat gelöst werden müssen. So treffen sich Geschäftsführer und Vorstände der DZGs regelmäßig, um gemeinsame Aktivitäten (World Health Summit, Parlamentarische Abende, DZG Magazin etc.) zu planen und um Strategien für gemeinsame Herausforderungen zu entwickeln. Zudem existieren auf Projektebene beispielsweise Verknüpfungen mit dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF: Tuberkulose, Infektionen der Lunge), dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislaufforschung (DZHK: kardiopulmonale Komorbiditäten) und dem Deutschen Konsortium Tumor- und Krebsforschung (DKTK: Lungenkrebs). Vertreter der DZGs begegnen sich in verschiedenen Foren wie der TMF (Technologie- und Methodenplattform für die vernetzte medizinische Forschung e.V.), wo gemeinsame Strategien (z. B. im Biobankensektor, der Netzwerkorganisation oder der Wissenschaftskommunikation) entwickelt werden.

II. Eingehende Darstellung des Vorhabens

Krankheitsbereich COPD

COPD-F2: Untersuchungen zur Rolle der löslichen Guanylat-Cyclase Signalgebung in rauchinduzierten Schädigungen der Atemwege/Emphysemen und Ansprechen auf cGMP-erhöhende Therapien)

Für dieses von UGMLC geleitete Flagship-Projekt der DA COPD (PI Norbert Weissmann) zur Untersuchung der Rolle der löslichen Guanylatcyclase in der Pathogenese und als therapeutischen Angriffspunkt für das Zigarettenrau-induzierte Emphysem im Mausmodell wurden vom TLRC Mäuse einer dort entwickelten transgene Aktivatorlinie (CCSP-rtTAM2/LC1) für die für das Vorhaben erforderliche Lungenparenchym-spezifische (Alveolarzellen Typ 2 Zellen) Deletion der sGCβ1 gezüchtet, genotypisiert und für Verpaarungen mit geflochten sGCβ1-Mäusen zur Generierung von dreifach Mutanten Mäuse (CCSP-rtTAM2/LC1/sGCβ1flox/flox) mit induzierbarer Deletion der sGCβ1 in Alveolar-Typ 2 Zellen an die Kooperationspartner nach Gießen gesendet. Weiter wurden am TLRC die Methoden zur molekularen und funktionalen Untersuchung des pulmonalen Phänotyps dieses neuen Mausmodells (z.B. Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in der BAL mittels Durchflußzytometrie, Sauerstoffsättigung und Lungenfunktionsmessung) sowie elektrophysiologische Messungen zur Untersuchung des Ionentransports durch das native Atemwegsepithel und Primärzellkulturen (Ussing-Kammer Messungen) erfolgreich etabliert. Aufgrund des Umzugs von Professor Mall nach Berlin wurde dieser Meilenstein am TLRC seit 2018 nicht weiterbearbeitet. Die Aktivatorlinie (CCSP-rtTAM2/LC1) sowie die oben genannten Methoden wurden am TLRC jedoch für die Generierung und Charakterisierung eines neuen Mausmodells mit konditionaler Deletion der Ubiquitinligase Nedd4.2 im Lungenepithel verwendet. Aus diesen Arbeiten ist ein neues und einzigartiges Mausmodell hervorgegangen, welches eine spontane Lungenfibrose entwickelt, welche eine große Ähnlichkeit mit der ideopathischen Lungenfibrose (IPF) beim Menschen aufweist und im DZL nun für Arbeiten an dieser Lungenerkrankung zur Verfügung steht. In 2020 wurden Arbeiten zur Revision durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in der renommierten Fachzeitschrift *Nature Communications* publiziert (Duerr J, et al. *Nat Commun.* 2020)

COPD-1.6: Untersuchung der Dehydrierung der Atemwegsoberfläche bei obstruktiver Bronchitis im β-ENaC Mausmodell

Das βENaC-Mausmodell konnte in DZL 2.0 erfolgreich in den folgenden Projekten zu Untersuchungen der Rolle von Mukus in der Pathogenese chronisch-obstruktiver Lungenerkrankungen eingesetzt werden:

In Kooperation mit dem CPC-M (PI Önder Yildirim) wurde der Effekt von Zigarettenrauch in neonatalen β ENaC-Mäusen untersucht und mit Wildtyp-Geschwistertieren verglichen. Hierbei konnten wir zeigen, dass wenige Tage an Passivrauchexposition ausreichen um sogar bei neonatalen Wildtyp-Mäusen eine neutrophile pulmonale Entzündung und Remodeling der Atemwege auszulösen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass sowohl die Zigarettenrauch-induzierte neutrophile Entzündung, als auch die Mukusobstruktion der Atemwege bei β ENaC-Mäusen signifikant verstärkt war. Diese Arbeiten konnten somit erstmals zeigen i) dass Passivrauchexposition in der Neonatalperiode desaströse Effekte auf die Lungengesundheit hat und ii) dass diese schädliche Wirkung beim Vorliegen einer Störung der mukoziliären Clearance und dadurch bedingter Mukusobstruktion, wie sie bei β ENaC-Mäusen aber auch Patienten mit muko-obstruktiven Lungenerkrankungen wie chronische Bronchitis, COPD, Cystische Fibrose oder Asthma vorkommen, erheblich verstärkt werden. Die Ergebnisse erklären die in epidemiologischen Studien beobachtete hohe Vulnerabilität von Säuglingen gegenüber Passivrauchexposition und wurden in dem renommierten *American Journal of Physiology Lung Cell Mol Physiol* (Jia et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311: L602–L610, 2016) publiziert.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen zum Einfluss neonataler Zigarettenrauchexposition wurde das β ENaC-Mausmodell am TLRC verwendet um die Rolle einer gestörten mukoziliären Clearance bei der Entstehung der Allergen-getriggerten Atemwegserkrankung spielt. Hierbei konnten wir mittels Exposition von β ENaC-Mäusen mit häufig vorkommenden Umweltallergenen wie Hausstaubmilbe und Schimmelpilz (*Aspergillus fumigatus*) erstmals zeigen, dass eine Störung der mukoziliären Clearance einen wesentlichen Risikofaktor in der *in vivo* Pathogenese Allergen-induzierter Atemwegserkrankungen darstellt. Insbesondere zeigten diese Studien, dass die eosinophile Atemwegsentzündung sowie die Verschlechterung der Lungenfunktion nach Allergenexposition bei β ENaC-Mäusen signifikant stärker ausgeprägt waren als bei Wildtyp-Mäusen. Darüber hinaus konnten wir erstmals zeigen, dass eine Verbesserung der mukoziliären Clearance durch pharmakologische Verbesserung der Befeuchtung der Atemwegsoberflächen *in vivo* zu einer signifikanten Reduktion der Allergen-induzierten Atemwegserkrankung führt und somit einen vielversprechenden neuen therapeutischen Ansatz darstellen könnten. Die Ergebnisse sind somit relevant für das Verständnis der Krankheitsentstehung und die Entwicklung neuer Therapien für Allergen-induzierte Atemwegserkrankungen und wurden in der renommierten Fachzeitschrift *Journal of Allergy Clinical Immunology* (Fritzsche B et al., *J Allergy Clin Immunol.* 140:190-203, 2017) publiziert.

Weiter wurden die β ENaC-Mäuse in einer Kooperation mit dem ARCN (PI Peter König) für die Entwicklung der intravitale Optical Coherence Microscopy (OCM) zur *in vivo* Messung des Mukustransports und der Wirksamkeit verschiedener mukolytischer therapeutischer

Interventionen fortgeführt und in 2020 zur Publikation fertiggestellt. In diesen Untersuchungen ist es erstmals gelungen, Mukustransport in einem lebenden Organismus zu visualisieren und zu zeigen, dass die Mukusclearance durch Verbesserung der Befeuchtung der Atemwege, z.B. durch Inhalation mit hypertonem Kochsalz, beim Vorliegen einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung signifikant verbessert werden kann. Diese neue Methode wurde als *Innovative Methodology* im American Journal of Physiology Lung Cell Mol Physiol veröffentlicht und steht im DZL für zukünftige präklinische Untersuchungen zur *in vivo* Wirksamkeit neuer pharmakologischer Strategien zur Verbesserung der mukoziloären Clearance und Reduktion der Mukusobstruktion zur Verfügung (Pieper M, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2020;318:L518-L524).

Darüber hinaus wurde die am β ENaC-Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse zur Rolle von Mukus in der Pathogenese der Inflammation und des Remodelings bei chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen in einem häufig zitierten Übersichtsartikel (68 Zitate in Web of Science) in einem von Matthias Ochs (BREATH) als Gasteditor herausgegebenen Special Issue des Fachjournals Cell Tissue Research publiziert (Zhou-Suckow Z, et al. Cell Tissue Res. 2017).

COPD-2.4: Detektion und Quantifizierung lokaler Veränderungen der Atemwegsfunktion und Atemwegsentzündung mittels MRI

Diese Arbeiten wurden zusammen mit Punkt CF-4.1 und 4.2 durchgeführt und werden an dieser Stelle zusammenfassend dargestellt

COPD-2.6 Validierung der FRET Sensoren für die klinische Anwendung

Proteasen sind wichtige pathophysiologische Modulatoren der Krankheitsprogression bei chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen wie COPD oder Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF). Eine wichtige Charakteristik dieser Erkrankungen ist die Ansammlung von zähflüssigem Mukus in den Atemwegen, in welchen Entzündungsmediatoren sowie Entzündungszellen wie Neutrophile und Makrophagen akkumulieren können. Die im Rahmen von DZL1.0 entwickelten FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Sensoren erlauben die spezifische und sensitive Quantifizierung der Aktivität von Makrophagen- und Neutrophilenelastase (NE) auf inflammatorischen Zellen sowie in der löslichen Phase von Atemwegssekreten.

Im Rahmen der aktuellen Förderperiode wurde eine Querschnittsstudie zur klinischen Relevanz von NE auf der Oberfläche von Sputum-Neutrophilen und in den zellfreien Sputum-Überständen bei lungengesunden Probanden (n=8) sowie Patienten mit CF (n=46) durchgeführt, welche im European Respiratory Journal publiziert wurde (Dittrich et al., ERJ 2018). In dieser initialen klinischen Studie wurden die FRET-Sensoren am Konfokalmikroskop

validiert. Dieser Ansatz erlaubte es zunächst, die Lokalisation auf der Zelloberfläche zu validieren.

Die hochsensitiven FRET-Reporter ermöglichen es, Proteaseaktivität bereits in sehr niedrigen Konzentrationen zu messen. Dies ist insbesondere in frühen Krankheitsstadien relevant, in welchen die Proteaseaktivität durch konventionelle Methoden nur in einem Bruchteil der Patientenmaterialien detektiert werden kann. Patienten mit Mukoviszidose werden in vielen westlichen Ländern im Rahmen von Neugeborenen screenings früh identifiziert und engmaschig klinisch überwacht. Daher stellt die Mukoviszidose eine Modellerkrankung für die Untersuchung von Frühstadien obstruktiver Atemwegserkrankungen dar. In Zusammenarbeit mit dem australischen ARESTCF-Konsortium sowie mit Prof. Dr. Tirouvanziam an der US-amerikanischen Emory-Universität konnten die FRET-Reporter in Atemwegsmaterial von Säuglingen und Kleinkindern mit Mukoviszidose angewendet und die Ergebnisse mit klinischen Biomarkern korreliert werden. Die Ergebnisse wurden als Teil einer Studie zur Bedeutung der Exozytose von Neutrophilenelastase in der Frühphase obstruktiver Lungenerkrankungen im American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine publiziert (Margaroli et al., AJRCCM 2018).

Neben der Neutrophilenelastase sekretieren Neutrophile Granulozyten auch weitere Serinproteasen: Protease 3 und Cathepsin G. Über die pathophysiologische Bedeutung dieser Enzyme bei obstruktiven Lungenerkrankung war aufgrund bis dato limitierter Quantifizierungsmethoden wenig bekannt. Im Rahmen der aktuellen Förderperiode wurde am EMBL Heidelberg ein neuer FRET-Reporter für Cathepsin G entwickelt und erfolgreich in Atemwegssekreten von Patienten mit Mukoviszidose und COPD eingesetzt. Das Manuskript wurde in ACS Central Science publiziert (Guerra et al., ACS Central Science 2019).

In den initialen Studien beruhte der Assay zur Quantifizierung von Proteaseaktivität auf der Oberfläche inflammatorischer Atemwegszellen auf Konfokalmikroskopie. Diese Methode erlaubt es, die Enzymaktivität genau zu lokalisieren, ist jedoch aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und der aufwändigen Probenaufarbeitung nur schwer in die klinische Anwendung zu übertragen. Um eine standortübergreifende und robustere Anwendung der FRET-Reporter zu ermöglichen, wurde in der Folge auf die Durchflusszytometrie übertragen (Hagner et al, ERJ 2020). Hierfür wurden inflammatorische Zellen der Atemwege aus Sputum von Mukoviszidose-Patienten isoliert (n=12) und deren zelloberflächengebundene Neutrophilenelastase Aktivität sowohl am Konfokalmikroskop als auch am Durchflusszytometer bestimmt. Die Resultate der beiden Messungen korrelierten signifikant miteinander, der dynamische Bereich sowie das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen waren am Durchflusszytometer dem am Konfokalmikroskop jedoch überlegen. Dies resultierte in dieser kleinen Kohorte in einer signifikanten Korrelation von FEV1 % predicted mit dem am Durchflusszytometer, jedoch nicht mit den am Konfokalmikroskop gemessenen

Aktivitäten. Mit der Durchflusszytometer-basierten Messungen steht nun ein schneller und sensitiver Ansatz zur Quantifizierung zellgebundener Proteasen-Aktivitäten zur Verfügung.

Die mikrobielle Besiedelung der Atemwege spielt einen entscheidenden Faktor bei der Progression obstruktiver Lungenerkrankungen, welche im Rahmen von Exazerbationen einen protrahierten Verlauf nehmen. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Prof. A. Dalpke und Dr. S. Boutin von der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikum Heidelberg die Assoziation von neutrophiler Inflammation mit dem Mikrobiom der Atemwege sowie mit Lungenfunktionsparametern untersucht. Hierzu wurden im Verlauf von 2019 und 2020 gepaarte Sputumproben von 106 Patienten mit Mukoviszidose gesammelt und 1.) zur Ermittlung des Mikrobioms mittels 16S rRNA Amplicon-Sequenzierung sowie 2.) zur Messung inflammatorischer Biomarker verwendet, insbesondere der freien Neutrophilenelastaseaktivität mittels der neuartigen FRET-Sensoren. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass bei obstruktiven Lungenerkrankungen eine diverse Mikrobiota mit einer geringeren Atemwegsinflammation sowie einer besseren Lungenfunktion verbunden ist. Die Arbeit wurde kürzlich beim Journal of Cystic Fibrosis zur Publikation angenommen (Frey et al., JCF 2021).

In 2021 bereits Relationship between airway dysbiosis, inflammation and lung function in adults with cystic fibrosis. Frey DL, Boutin S, Dittrich SA, Graeber SY, Stahl M, Wege S, Herth FJF, Sommerburg O, Schultz C, Mall MA, Dalpke AH. J Cyst Fibros. 2021 Jan 8:S1569-1993(20)30954-1. doi: 10.1016/j.jcf.2020.12.022. Online ahead of print.

COPD-4.2: Identifikation von Prädiktoren des Krankheitsverlaufs durch Weiterverfolgung der bereits ins Forschungsprogramme eingebundenen Kohorten einschließlich Bildgebung

Die prospektive klinische Studie in einer Subkohorte der COSYCONET Kohorte (MR-COPD I) untersucht vergleichend MRT und CT zur Phänotypisierung der COPD. Die Akquisition der Bilddaten wurde im Juli 2016 erfolgreich abgeschlossen. Wie geplant wurden mehr als 600 Patienten an insgesamt 16 Zentren eingeschlossen und mit Hilfe standardisierter Bildgebungsprotokolle untersucht. Mehr als 500 Datensätze sind vollständig und von hoher Qualität, so dass sie für die weitere visuelle und Software-basierte Analyse zur Messung von Imaging Biomarkern geeignet sind. Diese Analysen und der Vergleich mit den klinischen und funktionellen Daten wurden in 2016 und wurden bis 2020 fortgeführt. Vorläufige Daten deuten darauf hin, dass mittels MRT-basierter dynamischer Lungenperfusionsanalyse pathologische Veränderungen der Lunge im Rahmen der COPD erfolgreich detektiert werden können, bei gleichzeitig höherer Sensitivität im Vergleich zur strukturellen CT-Bildgebung. Daneben zeigt sich ein moderates Agreement zwischen MRT und CT bei der Unterscheidung von atemwegsdominiertem und emphysemdominiertem COPD-Phänotyp. Gleichzeitig konnte in dem multizentrischen Setting gezeigt werden, dass die funktionelle Lungen-MRT erfolgreich

in der Breite durchgeführt werden kann, trotz deutlicher struktureller Unterschiede der einzelnen Zentren. Die visuelle, quantitative und nachfolgend statistische Auswertung der erhobenen Bilddaten wird noch nach 2020 fort dauern. Erste Ergebnisse hierzu wurden 2020 durch die COSYCONET Studiengruppe publiziert (Kahnert et al. *Respir Med* 2020).

Darüber hinaus liegen umfangreiche Daten aus regelmäßigen Phantommessungen vor, die an den CT- und MRT-Scannern der jeweiligen Zentren zu Zwecken der Qualitätskontrolle durchgeführt wurden, um Unterschiede in der Bildqualität über alle Zentren hinweg systematisch zu erfassen, ebenso wie Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Diese Daten wurden 2018 veröffentlicht (Triphan SMF, Biederer J, Burmester K, Fellhauer I, Vogelmeier CF, Jorres RA, et al. *Design and application of an MR reference phantom for multicentre lung imaging trials*. PLoS One. 2018;13(7):e0199148).

Mögliche klinische Anwendungsbereiche der dynamische Lungenperfusions-MRT liegen in der Detektion der COPD vor dem Zeitpunkt der klinischen Manifestation. Ferner könnte die MRT im Rahmen des Monitorings eine frühzeitigere Prognose des Krankheitsverlaufes erlauben als andere diagnostische Verfahren und Patienten mit rasch progredienten Verläufen frühzeitig identifizieren. Weitere Beziehungen zwischen bildbasierten Biomarkern/COPD-Phänotypen und klinischen Biomarkern oder Verläufen werden fortlaufend evaluiert. Im Rahmen einer 2020 erstmals zur Publikation eingereichte Arbeit (Schiweck et al.) konnte ein neues Verfahren zur Quantifizierung der minderperfundierten Lungenareale in Prozent des Lungenvolumens entwickelt werden; die Arbeit befindet sich momentan im Reviewprozess. Dieser potentielle neue Biomarker korrelierte dabei gut mit visuellen Perfusionsscores sowie der Spirometrie. Insbesondere aber fanden wir eine sehr gute Korrelation mit den erkrankten Lungenarealen in der Computertomographie als Summe aus Emphysem und funktionellem Airtrapping.

Im Rahmen des DZL wurde das Folgeprojekt MR-COPD II fortgeführt (2016 – 2020; FKZ 82DZLS24A1). Es konnte ein bildbasiertes Follow-up mittels CT und MRT nach 3 Jahren bis Ende 2020 für 252 Patienten aus COSYCONET durchgeführt werden. Für ein weiteres Follow-up mit klinischen Parametern (BODE, PFT) nach 6 Jahren werden noch mindestens bis 2024 Patientenuntersuchungen durchgeführt werden, um den Wert der CT- und MRT-Bildgebung für die Prognose und das Monitoring des Fortschreitens der COPD zu ermitteln. Gegenwärtig werden die Daten abschließend mittels visueller Scores sowie quantitativer Nachverarbeitungssoftware ausgewertet, und zur Publikation vorbereitet.

COPD-6.1: Durchführung von longitudinalen und Querschnittsauswertungen zur Identifizierung klinischer und Biomarker-Muster für den Krankheitsverlauf und Induktion/Fortschreiten von Begleiterkrankungen mittels Deep Phenotyping (Tiefenphänotypisierung) von Patienten und Probanden (Lungenfunktion, Bildgebung, kardiovaskuläre Leistung, körperliche Fitness, COPD assoziierte Begleiterkrankungen, systemische Entzündung)

Drei verschiedene Komorbiditäten der COPD wurden untersucht: (1) Rippenfrakturen, (2) Osteopenie, (3) kardiovaskuläre Erkrankungen. (1) In einer Pilotstudie haben wir die Prävalenz von Rippenfrakturen bei COPD Patienten in unterschiedlichen GOLD Stadien aus einer klinischen Population mit verfügbaren CT-Untersuchungen ausgewertet. Rippenfrakturen waren in fortgeschrittenen GOLD Stadien häufiger als in niedrigen. Diese Auswertung wird nun auch auf der Basis der prospektiven MRT/CT Studie, die in einer Subkohorte der COSYCONET Kohorte durchgeführt wurde, vorgenommen, um die Ergebnisse zu replizieren und zu bestätigen. (2) Wir haben eine Methodologie entwickelt, um die Knochendichte aus unterschiedlichen klinischen CT Untersuchungen mittels Implementierung einer internen Referenz zur Normalisierung zu messen. Dies wird die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Patienten mit unterschiedlichen Untersuchungen erheblich verbessern. Weitergehende Auswertungen sind vorgesehen. (3) Gefäßverkalkungen sind ein anerkannter Imaging Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen. An Pilotdaten aus einer klinischen Population konnten wir zeigen, dass das Ausmaß extrakoronarer Gefäßverkalkungen bei Rauchern mit COPD sämtlicher Schweregrade einen unabhängigen Risikofaktor für die kardiovaskuläre Ereignisse darstellt. Hierzu wurden insgesamt 160 Raucher mit diagnostizierter COPD im GOLD-Stadium I-IV sowie weitere 40 Raucher ohne COPD bei vergleichbaren Pack years mittels CT untersucht und die Verkalkungen der thorakalen Aorta quantitativ vermessen. Hierbei zeigte sich, dass bei vergleichbarer Rauchhistorie das GOLD-Stadium einen unabhängigen Prediktor für die Schwere der atherosklerotischen Verkalkungen darstellt. Jobst et al. Interpretieren dieses als Hinweis auf eine systemische Inflammation im Falle einer manifesten COPD. Die Arbeit wurde 2018 zur Publikation angenommen (Jobst BJ et al. *Exp Ther Med* 2019). Diese Vorarbeiten wurden ab 2020 im Rahmen des Projekts „Komorbidom der großen Volkskrankheiten“, gefördert vom Land Baden-Württemberg, in Kooperation fortgeführt und durch die Nutzung von Verfahren der künstlichen Intelligenz deutlich verbessert. Erste Ergebnisse hieraus sind für 2021 zu erwarten.

Die Prozesse im Rahmen einer automatisierten Bildanalyse von CT-Daten wurden durch die JRG-SFI fortgesetzt untersucht (Vergleiche u.a. Wielpütz et al. *Thoracic Imag* 2013). Seit dieser früheren Arbeit wurde die CT-Technik verbessert, so dass mit neueren Rekonstruktionsalgorithmen, der sog. Iterativen Rekonstruktion, eine erheblich geringe Strahlendosis appliziert werden muss. Eine aktuelle Studie ging der Frage nach, ob hierdurch die Ergebnisse einer automatisierten Quantifizierung der Atemwegsdimensionen und des

Lungenparenchyms (Densitometrie) beeinflusst wird. Hierzu wurden 10 ex vivo Phantome mit Schweinelungen bei verschiedenen Dosisstufen und gewöhnlicher sowie iterativer Rekonstruktion mittels CT untersucht. Erfreulicherweise gibt es keinen relevanten Einfluss im Vergleich zur Standard-Dosis-CT, so dass zukünftig auch Niedrig-Dosis-CTs mit iterativer Rekonstruktion quantitativ ausgewertet können. Dies ist auch eine Voraussetzung für die MR-COPD II Studie. Eine Arbeit wurde bereits in 2017 zur Publikation angenommen (Leutz P [...] Wielpütz MO *PLoS One* 2017), eine weitere Arbeit wurde 2020 publiziert (Leutz-Schmidt P et al. *PLoS One* 2020). Eine weitere Aktivität befasst sich mit der Optimierung der Segmentierung der Atemwege und erschwerten Bedingungen wie der Präsenz von intravenösem Kontrastmittel. Die Mitarbeiter der Juniorgruppe nutzten die dynamischen Kontrastmittelserien eines vierdimensionalen CTs im Schwein dazu, die Effekte von Kontrastmittel auf die Atemwegssegmentierungen weitgehend zu eliminieren. Hierdurch werden CTs mit und ohne Kontrastmittel vergleichbarer (Konietzke P [...] Wielpütz MO *PLoS One* 2020). Des Weiteren wurden durch neue Algorithmen nicht nur die Segmentierung der gesamten Lunge und ihrer Atemwege, sondern nun auch der einzelnen Lungenlappen möglich. In einer ersten Arbeit wurden hierzu verschiedene Softwaretypen einschließlich einer durch die SFI-JRG selbst programmierten Software verglichen (Lim HJ [...] Heussel CP *PLoS One* 2016). In 2017 ging die JRG-SFI dann der Frage nach, ob die Intaktheit der Lappenspalten das Verteilungsmuster des Lungenemphysems bei 50 COPD-Patienten beeinflusst (Müller J [...] Wielpütz MO *Eur J Radiol* 2017). Hier zeigt sich, dass eine hypothetische Kollateralventilation bei defekten Lappenspalten offenbar nicht relevant die Emphysemheterogenität beeinflusst. Die Segmentierungsalgorithmen wurden regelmäßig erweitert und wissenschaftlich überprüft. Die letzten Verbesserungen bedienten sich dabei den Methoden der künstlichen Intelligenz in Kooperation mit der Michigan University (Prof. Galbán) und der Stanford University (Prof. Robinson), und wurden 2019 publiziert (Weinheimer O [...] Galbán CJ *Acad Radiol* 2019). In 2020 befasste sich die Gruppe mit der Produktion und Validierung eines „Miniphantoms“, welches bei einer CT Untersuchung am Patienten mitgeführt werden kann, um Untersuchungsspezifisch für Atemwegsdurchmesser und Lungendichte zu kalibrieren. Die Ergebnisse werden gegenwärtig zur Publikation vorbereitet. Prof. Galbán wird in 2020 und folgende jeweils einen einmonatigen Forschungsaufenthalt am TLRC verbringen, um die gemeinsamen Projekte zu vertiefen.

Bislang lagen nur wenige publizierte Daten zur longitudinalen Entwicklung des Emphysems sowie des Atemwegsremodellings bei schweren Rauchern vor. Zunächst hatte die Gruppe in 2018 an 757 starken Rauchern aus der Heidelberger Lungenkrebscreeningstudie LUSI mittels quantitativer CT belegen können, dass in einer Population mit wenig Emphysem dieses innerhalb von 4 Jahren nicht wesentlich fortschreitet, und dass durch das Rauchen getriggerte inflammatorische Änderungen der Lungendichte reversibel sind. (Jobst B [...] Wielpütz MO. *Effects of smoking cessation on quantitative computed tomography in smokers at risk in a lung*

cancer screening population. Eur Radiol 20018). Im Anschluss zeigten dieselben Autoren des TLRC in einer vergleichbaren Kohorte, dass ebenso auch die quantitativen Veränderungen der Atemwegswand nach Rauchstopp innerhalb von 2 Jahren reversibel erscheinen können (Jobst B [...] Wielpütz MO. *Longitudinal airway remodeling in active and past smokers in a lung cancer screening population*. Eur Radiol 2019). In 2019 wurden dann weitere Arbeiten zur kurzfristigen Progression des Emphysems und des Atemwegsremodellings in einem dreimonatigen Intervall bei 70 Patienten mit schwerer COPD durchgeführt. Konietzke et al. fanden heraus, dass bereits in diesem kurzen Zeitraum bei Patienten mit bereits fortgeschrittener COPD eine kurzfristige Verschlechterung des Emphysems mittels quantitativer CT messbar ist, wohingegen die Atemwegswandverdickung abnimmt (Konietzke P [...] Weinheimer O. *Quantitative CT detects progression in COPD patients with severe emphysema in a 3-month interval*. Eur Radiol 2020). Diese Methoden konnten auch auf eine Kohorte von Asthmapatienten vor und nach Thermoplastie übertragen werden (Konietzke P [...] Schuhmann M *Eur J Radiol* 2018).

Krankheitsbereich Zystische Fibrose (CF; Mukoviszidose)

CF-F1: Evaluierung des alternativen Chloridkanals SLC26A9 als Modifikator und neuer therapeutischer Angriffspunkt bei Zystischer Fibrose (Leuchtturmprojekt der CF-Grundlagenforschung)

Die Anwendung der humanen bronchialen CFBE Zellen etablierte sich erfolgreich in biochemischen und elektrophysiologischen als auch funktionellen Studien für ein Hochdurchsatz-Screening in DZL2.0. Aufbauend auf der Publikation (Salomon et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: L593–L602, 2016) sind hier ein weiteres Manuskript in Vorbereitung, die die Funktion von SLC26A9 und dessen mögliche Aktivierung im CF Zellmodell beschreiben.

In 2020 wurden die bisher etablierten Epithelzellmodelle mit der stabilen Überexpression des Chloridkanals SLC26A9 noch erweitert. So wurden CFBE Zellen mit einer Überexpression der häufigsten $\Delta F508\text{del}$ CFTR-Mutation (CFBE $\Delta F508\text{del}$ -CFTR) zusätzlich mit dem Chloridkanal SLC26A9 überexprimiert. Dieser wichtige Zusatz ermöglicht nun die Untersuchung, inwiefern eine funktionelle Korrektur der $\Delta F508\text{del}$ CFTR-Mutation einen Einfluss auf den SLC26A9-vermittelten Chloridstrom besitzt- ergänzend zum theoretischen Ansatz bisher, welcher den Einfluss von SLC26A9 selbst in den Vordergrund stellte. Hintergrund ist hier auch, dass die Modulator-Therapie mit CFTR Korrektoren und Potentiatoren bei CF Patienten um neue Kombinationen ergänzt wird (Zulassung von Kaftrio), so können die aktuellen molekularen CFTR Modulator-Therapien von CF Patienten in das *in vitro* Set-up übertragen werden. Das ermöglicht entscheidende Einsichten in die molekulare Interaktion von SLC26A9 und CFTR und trägt zum Verständnis der Regulation bei. Die 2020 etablierten SLC26A9-überexprimierenden

CFBE dF508del-CFTR Zellen zeigen, dass eine ca. 2000fache Überexpression von SLC26A9 vorliegt, die sich ähnlich lokalisiert wie in den CFBE Epithelzellen und den CFBE Epithelzellen mit CFTR Überexpression. Erste elektrophysiologische Untersuchungen ergaben einen Anstieg sowohl im basalen Chloridstrom als auch im Calcium-vermittelten Strom. Unter Verwendung der CFTR Korrektoren wurde ein Anstieg im basalen Chloridstrom in SLC26A9-überexprimierenden Zellen verzeichnet. Ebenso führte die CFTR-Korrektur zu einem Anstieg des CFTR-vermittelten Stromes in Anwesenheit von SLC26A9. Diese in *in vitro* Modellen gewonnenen Ergebnisse zeigen auf, dass SLC26A9 mit funktionell korrigierten CFTR interagiert und die Anwesenheit von SLC26A9 nochmals den Chloridstrom erhöhen kann.

Um den translationalen Charakter des Projektes zu erhöhen, wurden in DZL2.0 Methodiken zur Gewinnung und Kultivierung von humanen primären Epithelzellen etabliert. Weiterhin wurden, vor allem 2020, elektrophysiologische Messungen von humanen nasalen primären Epithelzellen durchgeführt, um den vorhandenen Chloridstrom zu charakterisieren. Hier können neue Studien angesetzt werden, um humane nasale primäre Epithelzellen von CF Patienten bzgl. der Expression und der Funktion von SLC26A9 zu untersuchen. Interessant wäre dabei, ob eine Korrelation der Funktion von SLC26A9 und CFTR möglich ist.

Die tierexperimentellen Studien wurden im Rahmen von DZL2.0 umfangreich durchgeführt, um die Rolle von SLC26A9 in der Pathogenese von muko-obstruktiven Atemwegserkrankungen zu verstehen. Die Arbeit erfolgte mit Unterstützung des Small Animal Imaging Lab Teams am Sky Scan (DZL 1.0 Pos. 0850 Lfd. Nr. 61) und des Teams vom EMBL (Platform Imaging). Der Phänotyp der Maus (SLC26A9^{-/-}/βENaC-tg) wurde dafür longitudinal untersucht. Entscheidend ist dabei das Ergebnis, dass SLC26A9 den neonatalen Lungenphänotyp signifikant beeinflusst. Die Sterblichkeit des CF Mausmodells wird durch die Anwesenheit der Deletion von SLC26A9 signifikant erhöht. Eine Atemwegsobstruktion, eine Atemwegsentszündung und ein verminderter Chloridstrom tragen zum Phänotyp der SLC26A9^{-/-} bei. Es zeigt sich, dass SLC26A9 ein entscheidender Faktor für die Sekretion von Mukus und für die Ausprägung einer Th1-vermittelten Atemwegsentszündung ist. In 2020 wurden die Studien mit Mäusen am postnatalen Tag 3 ausgeweitet, um die Bedeutung von SLC26A9 auf die neonatale CF Pathogenese besser zu verstehen. Da im CF Mausmodell mit einer Muko-Obstruktion ab Tag 3 zu rechnen ist, sind hier die Auswertungen der Entzündungsparameter und der Muzin Expression im doppelt transgenen Mausmodell entscheidend. Die finalen Auswertungen sind für 2021 geplant.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass SLC26A9 ein funktioneller Chloridkanal am Atemwegsepithel mit signifikanter Interaktion und Funktion ist. *In vitro* wurden sowohl der Ansatz der Charakterisierung und Aktivierung von SLC26A9 als auch der Interaktion mit CFTR erfolgreich verfolgt. Im Mausmodell konnte der signifikante Einfluss von SLC26A9 auf die CF Pathogenese in der Neonatal-Periode herausgearbeitet werden.

CF-F2: Aufklärung der pathogenetischen Rolle des mikrobiellen Metagenoms bei Zystischer Fibrose (CF) (CF-translationalales Leuchtturmprojekt)

Kohorte

Insgesamt wurden 10568 Proben (3373 Rachenabstriche, 3027 Nasenabstriche, 4149 Sputum und 19 BAL) von 377 Patienten gesammelt. Innerhalb von 24h werden die Proben verarbeitet und in je 2 Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot von 200µl wird mit PMA Farbstoff behandelt, welches die Amplifikation extrazellulärer DNA vermeidet, um anschließend mittels 16S-rDNA Sequenzierung analysiert zu werden. Das zweite Aliquot (200µL bis 1 ml) wird für Biobanking-Zwecke in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Pipeline

Unsere 16S-rDNA Sequenzierungs Pipeline basiert auf einem dualen PCR System. Die erste PCR amplifiziert die V4 Region, wie sie von „Earth-microbiome project“ und von „Human-microbiome project“ beschrieben und entwickelt wurde. Diese Primer werden mit einer Sequenz kombiniert, die zu den Illumina-Sequenzierungsprimer komplementär ist. Bei der zweiten PCR werden Barcodes und eine zusätzliche P5 und P7 Sequenz adaptiert, was die Sequenzierung mit jedem Illumina System ermöglicht.

Mit diesem internen Protokoll und dem MiSeq im Haus können wir das Mikrobiom einer Probe für weniger als 20 Euro sequenzieren und somit größere Kohorten analysieren. Um die Qualität sicherzustellen, enthält jeder Lauf einen Standard, bestehend aus 20 bekannten Spezies, um die Repräsentativität einer jeder Spezies zu gewährleisten. Zudem werden die Negativkontrollen aus der DNA Extraktion, sowie der PCR, bei ausreichender DNA Menge sequenziert um mögliche Kontaminationen auszuschließen.

Das zweite Hauptziel war die Etablierung einer Metagenom und Metatranskriptom-Pipeline. Hierzu haben wir mittels des NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kits, mikrobielle DNA angereichert, um möglichst keine humane DNA zu sequenzieren. Die Bioinformatik basiert auf Python-Skripten und bezieht sich auf bekannte Datenbanken wie Kraken und Prokka. Validiert wurde die Methodik mit CF-Sputa. Für die Metatranskriptom-Pipeline wurde das Direct-zol Kit zur Extraktion von RNA genutzt, mit anschließender Entfernung von eukaryotischer und ribosomaler RNA auf poly-dT Basis. Dieser Prozess ermöglicht es uns unabhängig voneinander 2 Bereiche (Human + Mikrobiom) zu analysieren und somit den gesamten Datenbereich abzudecken.

Beim Vergleich der 3 Pipelines (16S, Metagenomik und Metatranskriptomik) in 2020 konnten wir feststellen, dass der Anteil an RNA Viren (Metatranskriptomik) in der Kohorte nicht zu missachten ist und eventuell eine größere Rolle im Mikrobiom spielt, wohingegen DNA Viren eine untergeordnetere Komponente darstellen.

Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass der 16S-basierte und metagenomische Ansatz in Bezug auf die taxonomische Analyse vernünftige, äquivalente Ergebnisse liefert, während das Metatranskriptom eine stärkere Divergenz aufweist. Dies zeigt, dass die 16S-rDNA Sequenzierung ein genaues und kostengünstiges Protokoll zur Durchführung einer metataxonomischen Analyse ist. Metagenomische Analysen ermöglichen es Informationen des Genrepertoires zu erhalten und sollten daher in Projekten zusätzlich zu den 16S Daten, genutzt werden.

Der Aufbau einer Pipeline unter Verwendung eines Virus-PCR Panels konnte aufgrund 2er Probleme noch nicht abgeschlossen werden. Erstens wird RNA in CF Sputa bereits beim Auswurf abgebaut, was bei der RNA Sequenzierung umgangen werden konnte, wohingegen es bei PCR basierten Protokollen zu Problemen führte. Zweitens konnte die Virologieabteilung das Protokoll aufgrund der COVID-19 Pandemie nicht weiterentwickeln.

Ergebnisse

Die 16S-rDNA-Sequenzierung war aufgrund der Kosteneffizienz und Zuverlässigkeit der Technik, die erfolgreichste Pipeline. Wir konnten die Heterogenität der Atemwege (Nase, Rachen und Lunge) in Abhängigkeit vom Status einer P. aeruginosa-Infektion untersuchen (Boutin et al., 2015, Plos One). Wir konzentrierten die Arbeit auf die Wechselwirkung von Pseudomonas aeruginosa mit dem Mikrobiom der unteren Atemwege und zeigten, dass sich eine Dysbiose der unteren Atemwege nur aufgrund einer chronischen Infektion mit P. aeruginosa entwickelt (Boutin et al., 2017, ERJ). Diese Ergebnisse führten zu einem Translationsprojekt, in welchem wir eine quantitative PCR entwickelten, welche früher und sensitiver P. aeruginosa detektiert als der kulturelle Nachweis. (Boutin et al., 2018, JCF). Wir verglichen auch das Mikrobiom des Rachens von CF-Patienten, mit einer gesunden Kohorte und Patienten mit Asthma. Die Ergebnisse zeigen, dass CF-Patienten im Vergleich zu den beiden anderen Kohorten ein divergierendes Mikrobiom aufweisen (Boutin et al., 2017, Mediators Inflamm.). In 2019 und 2020 konzentrierten wir uns auf die Verbindung zwischen Entzündungen und dem Mikrobiom der unteren Atemwege bei CF-Patienten und konnten zeigen, dass kommensale Bakterien in einer Querschnittskohorte mit einer geringeren Entzündungsreaktion assoziiert sind (Frey et al., 2021, JCF). Wir konnten auch zeigen, dass dies ein langfristiger Effekt ist, indem wir Langzeitdaten mit Daten innerhalb eines und 3 Jahren verglichen (Frey et al. in Bearbeitung).

Aufgrund der Entwicklung einer CFTR-Korrektor- und Modulatortherapie haben wir in 2020 die Untersuchungen zum Einfluss der Orkambi-Behandlung auf das Lungenmikrobiom mittels 16S-rDNA-Sequenzierung abgeschlossen und zeigten, dass eine Kurzzeitbehandlung mit Orkambi die Diversität des Mikrobioms bereits signifikant erhöht (Gräber et al., 2021, accepted in Ann. Am. Thorac. Soc). In 2020 haben wir zudem in Zusammenarbeit mit Prof. M. Mall die Auswirkungen anderer CFTR-Therapien, wie der Dreifachkombination untersucht. Es

fehlen noch Langzeitdaten für das CF-Mikrobiom, jedoch bietet unsere Kohorte an Patienten und unsere umfangreiche Biobank exzellente Möglichkeiten diese Daten zu generieren. Des Weiteren haben wir in 2020 die Analyse der Langzeitentwicklung des Mikrobioms über einen Zeitraum von 3 bis 5 Jahren bei Jugendlichen abgeschlossen und beobachtet, dass jeder Patient ein personalisiertes Mikrobiom aufwies. Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass ein stabiles Lungenmikrobiom an sich, keine bessere Gesundheit des Patienten vorhersagt. Patienten, die eine stärkere Abnahme der Lungenfunktion zeigten, zeigten ein stabileres Mikrobiom mit einer hohen Dominanz einer einzelnen Spezies. Auf der Phylum-Ebene zeigten die Rückgänge im Laufe der Zeit den stärksten Anstieg der Proteobakterien und zudem einen starken Rückgang sowohl der Phyla Bacteroides als auch der Firmicutes. Ergebnisse zeigen, dass neben der Dominanz von Pathogeninfektionen die Häufigkeit und das Gleichgewicht der Phyla Bacteroidetes und Firmicutes eine Rolle bei der Störung des Lungenmikrobioms und der Lungenfunktion zu spielen scheint (Metzger et al., submitted ERJ).

Die oberen Atemwege sind ebenfalls stark unterschätzt, daher haben wir in 2020 ein Projekt gestartet, in dem Nasenspülungen mit unseren routinemäßigen Nasenabstrichen (Eswabs) verglichen werden. Wir konnten zeigen, dass die Nasenspülung im Vergleich zu den Tupfern eine signifikant erhöhte Diversität und geringere Biomasse aufweist. Darüber hinaus korrelierten die Mikrobiomdaten der Nasenspülung besser mit den zum Zeitpunkt der Probenahme gemessenen Entzündungsmarkern, was darauf hinweist, dass die Nasenspülung möglicherweise eine genauere Momentaufnahme der relevanten Krankheitserreger in der Nase von CF-Patienten liefert (in Prep.). Um die Stabilität des Zusammenhangs zwischen den Entzündungsmarkern und dem Nasenmikrobiom zu bestätigen, werden wir diese spezifische Kohorte für einen längeren Zeitraum analysieren.

Wir haben unsere Pipelines auch außerhalb von CF verwendet, um zu zeigen, dass Lungendysbiose mit anderen Krankheiten verbunden ist. Wir zeigten, dass der Krankheitsverlauf von Patienten mit Lungendysbiose und Patienten mit sepsisinduziertem ARDS korrelierten (Schmitt et al., 2020, J Hosp Infect). Wir verglichen auch das orale Mikrobiom (Speichel und Plaque) von Kindern mit Asthma, im Vergleich zu Kindern mit Allergien und zu gesunden Kindern und konnten zeigen, dass Kinder mit Allergien ein asthmaähnliches Mikrobiom in der Plaque aufwiesen. (Arweiler et al., submitted Allergy). Wir arbeiten derzeit auch an den Auswirkungen von IPF. In einer Pilotstudie, in Zusammenarbeit mit Prof. Kreuter, wird das Virom und Mikrobiom von 50 Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose untersucht (DPLD: Pilotprojekt 1 / Umwidmung 2, 2018). Die Rekrutierung der Kohorte ist in allen Zentren abgeschlossen. Jedoch haben wir aus einigen Zentren noch nicht alle Proben erhalten. Die EXperTENTION (82DZLT24A2) -Studie wird unsere Pipeline verwenden, um die Wirksamkeit der parodontalen Behandlung bei systemischen Entzündungen und die Prävention von Exazerbationen bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) zu untersuchen.

Die Studie zur Exazerbation bei CF mit 16S-rDNA-Sequenzierung zeigte Hinweise auf eine mikrobiombedingte Exazerbation, aber ohne funktionellen Input. Daher werden wir unsere metagenomische Pipeline nutzen, um 50 Exazerbationsereignisse bei 50 CF-Patienten mit je einer Probe vor der Exazerbation, zu Beginn der Exazerbation und in einem Zeitraum von 3 Wochen bis 4 Monate nach Exazerbation, zu untersuchen. Die Probenvorbereitung hat gut funktioniert, so dass die Proben jetzt zur Sequenzierung gesendet werden konnten.

Die metatranskriptomische Methode ist kostenintensiv, daher konnten wir uns auf Basis der mit DZL-Mitteln finanzierten Vorarbeiten in 2020 einen DFG-grant (DA 592/10-1), zur Deckung der Sequenzierkosten, sichern

In 2021 bereits Relationship between airway dysbiosis, inflammation and lung function in adults with cystic fibrosis. Frey DL, Boutin S, Dittrich SA, Graeber SY, Stahl M, Wege S, Herth FJF, Sommerburg O, Schultz C, Mall MA, Dalpke AH. J Cyst Fibros. 2021 Jan 8:S1569-1993(20)30954-1. doi: 10.1016/j.jcf.2020.12.022. Online ahead of print.

CF-F3: Randomisierte, doppelblinde, kontrollierte Studien zur Sicherheit und Effizienz einer präventiven Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung in Säuglingen mit Zystischer Fibrose (PRESIS) (klinisches CF-Leuchtturmprojekt)

Basierend auf präklinischen Daten aus einem Mausmodell für die CF-Lungenerkrankung, in denen unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass die präventive Therapie von Mäusen mit CF-ähnlicher Lungenerkrankung mit hypertonem Kochsalz ab Geburt zu einer Verbesserung des Überlebens, Abnahme des intrabronchialen Schleims und besserem Gedeihen der Mäuse im Vergleich zur Placebobehandlung führte, führten wir ab der Förderperiode DZL 1.0 die multizentrische PRESIS-Studie durch. In dieser wurde die Sicherheit und Wirksamkeit einer frühen Inhalationstherapie mit hypertonem Kochsalz bei Säuglingen mit CF im Vergleich zur Inhalation mit isotonem Kochsalz untersucht. Diese an 4 DZL-Standorten durchgeführte Studie konnte mit dem last-patient-out im November 2016 erfolgreich abgeschlossen werden, wobei das ursprüngliche Rekrutierungsziel von n=40 Patienten mit 42 rekrutierten Säuglingen mit CF sogar leicht überschritten werden konnte. 2017 erfolgten das abschließende Monitoring der PRESIS-Datenbank und im Anschluss die Datenauswertung mit Unterstützung des KKS Heidelberg. In 2018 konnte das Manuskript zur PRESIS-Studie erfolgreich im *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Stahl M et al., Amer J Respir Crit Care Med 2019; Impact Factor: 17.425) veröffentlicht werden. Erfreulicherweise erschien hierzu ein Editorial, welches neben der Bedeutung der Studie für die Therapie früh diagnostizierter CF-Säuglinge auch hervorhob, dass diese Studie zeigt, dass randomisiert-kontrollierte Studien, die den Goldstandard zur Findung einer Therapie darstellen, auch schon in diesem Alter durchführbar sind. Nennenswert ist hierbei auch der erfolgreiche Einsatz der nicht-invasiven Endpunkte MBW und MRT, die wir vorab für den multizentrischen Einsatz validiert hatten (Stahl M et al,

J Cyst Fibros 2018; Wielpütz MO et al., J Cyst Fibros 2018). Inzwischen hat die Behandlung von Säuglingen und Kleinkindern mit CF mittels Inhalation von hypertoner Kochsalzlösung ab Diagnosestellung Eingang in die deutschsprachige Leitlinie zur Diagnostik und Therapie bei CF in den ersten beiden Lebensjahren gefunden (AWMF-Registernummer 026 – 024; S3-Leitlinie: Mukoviszidose bei Kindern in den ersten beiden Lebensjahren, Diagnostik und Therapie; Version vom 6.3.2020).

Darüber hinaus erfolgte im Rahmen von DZL2.0 ein longitudinales Follow-up (23 Patienten am TLRC, 39 Patienten Gesamt-DZL) mit den etablierten Endpunkten MRT und MBW über die nächsten Jahre bis mind. zum Erreichen des Schulalters. Die bei Abschluss der PRESIS-Studie in 2016 jüngsten Patienten werden bis Ende 2021 sechs Jahre alt geworden sein, sodass dann eine Auswertung hinsichtlich der Sicherheit und Wirksamkeit der langfristigen Anwendung von NaCl 6% inhalativ erfolgen kann. Diese Nachverfolgung (2016-2020) erfolgt im Rahmen der longitudinalen Beobachtungsstudie TRACK-CF (s. CF-4.1) mit jährlichen Kontrollen mittels MRT und MBW sowie monatlichen Telefoninterviews zur detaillierten Symptom- und Therapiedokumentation. Zusätzlich werden die Lebensqualität und die mikrobiologischen Befunde erfasst.

Als Voraussetzung für die Nutzung von MRT und MBW als nicht-invasive Endpunkte für Studien im Säuglingsalter führten wir zudem eine multizentrische Validierung dieser Methoden durch. Hierbei zeigte sich eine gute Durchführbarkeit und eine hohe Sensitivität beider Verfahren für frühe Lungenveränderungen bei CF. Die Ergebnisse dieser multizentrischen Studien konnten 2018 erfolgreich publiziert werden (Stahl M et al, J Cyst Fibros 2018; Wielpütz MO et al., J Cyst Fibros 2018).

CF-1.2: Fortsetzung von Modifikatoren-Studien in β ENaC-transgenen Mäusen mit CF-ähnlicher Lungenerkrankung zur Identifizierung therapeutischer Angriffspunkte des unzureichenden Ionentransports, Mukus, Entzündung und Infektion.

In DZL1.0 konnten wir in der β ENaC-transgenen Maus den Interleukin 1 Rezeptor (IL1R) als vielversprechenden neuen Angriffspunkt für eine antiinflammatorische Therapie der CF-Lungenerkrankung identifizieren. Hierbei konnten wir zeigen, dass die IL1R-vermittelte Signaltransduktion eine zentrale Rolle in der Pathogenese der neutrophilen Atemwegsentzündung sowie der damit verbundenen strukturellen Lungenschädigung spielt und dass diese Prozesse mit dem zugelassenen IL-1R Antagonisten Anakinra im Mausmodell effektiv gehemmt werden können. Die in DZL 2.0 fortgeführten Untersuchungen zeigten, dass diese Hemmung keinen Einfluss auf die Immunabwehr gegen den CF relevanten Pathogenen *Pseudomonas* aufweist. Somit konnte das therapeutische Potential sowie die Sicherheit von Anakinra als potentielle antiinflammatorische Therapie bekräftigt werden. In Kooperation mit BREATH (PI Stanke) und CPC (PI Griese) konnten wir zeigen, dass bestimmte Varianten im IL1R-

Gen bei Patienten mit CF mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert sind. Diese Ergebnisse untermauern das Potential des IL-1R-Signalwegs als einen weiteren therapeutischen Angriffspunkt bei CF (Stanke et al., 2017).

Zur weiteren Evaluierung der Wirkung und Sicherheit von Anakinra als antiinflammatorische Strategie im Kontext der bei CF-Patienten häufigen chronischen Infektion mit *Pseudomonas*, wurden chronische *Pseudomonas*-Infektionsmodelle in β ENaC-Mäusen und Wildtyp-Mäusen etabliert und im Kontext von Meilenstein CF-3 untersucht.

Des Weiteren haben wir mit der funktionellen Rolle von Atemwegs-Macrophagen (AM) in der Pathogenese von CF beschäftigt. Erhobene Daten aus DZL1.0 zeigten, dass es bei β ENaC-Mäusen mit CF-ähnlicher Lungenerkrankung sowie bei CF-Patienten zu einer Aktivierung der Makrophagen in den Atemwegen kommt, welche u.a. durch Freisetzung von Proteasen (Makrophagen-Elastase, MMP-12) an der Entstehung struktureller Lungenschäden beteiligt sind (Trojanek et al., 2014). Um die grundlegenden Veränderungen in Makrophagen in CF-ähnlicher Lungenerkrankung zu verstehen und funktionell einzuordnen, wurden intensive epigenetische Analysen an primären Macrophagen von β ENaC-Mäusen und Wildtyp Mäusen, in Zusammenarbeit mit der Durchflußzytometry am EMBL und DZL-PI Prof. Christoph Plass vom DKFZ, vorgenommen. Wir konnten starke epigenetische Änderung in AMs aus β ENaC-Mäusen nachweisen. Wir identifizierten DNA-Hypomethylierung und Chromatin-Öffnung in β ENaC-AMs, speziell in Promoter-Regionen. Dies deuten auf eine erhöhte Zugänglichkeit der DNA hin und damit auf Änderungen in der Transkriptionssignatur. In der Tat weist die beobachtete Genexpression (RNAseq) eine starke Korrelation mit der epigenetischen Konstitution des Promotors auf. Die erhaltenen Transkriptionsdaten aus AMs von β ENaC-Mäusen ähneln Signaturen, die für CF aber auch andere chronische Lungenerkrankungen, wie COPD und Asthma, beschrieben wurden. Ergebnisse aus Untersuchungen an primär kultivierten Makrophagen deuten darauf hin, dass Mukus/Muzine per se einen pro-inflammatorischen Effekt auf Makrophagen haben. Funktionell zeigen Makrophagen aus β ENaC-Mäusen eine Reduktion in ihrer Phagozytose- und Efferozytosekapazität und eine hyperinflammatorische Immunantwort gegenüber bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS). Die in 2020 weitergeführten Experimente zeigten, das LPS Behandlung von AMs eine starke Veränderung auf Chromatinebene hervorruft, und die exzessive Immunantwort durch Transkriptionsfaktoren der Interferon Response Faktor (IRF) Familie, hier vor allem IRF1, stimuliert wurde. Diese Daten bestärken eine proinflammatorische Rolle von Makrophagen während bakteriellen Exazerbationen und in der Pathogenese von CF-Lungenerkrankungen. Das in 2020 erstellte Manuskript wurde zum Review in Nature Communications akzeptiert und ist aktuell in Revision.

CF-3. Nutzung einer etablierten präklinischen Pipeline für die Evaluierung neuer therapeutischer Strategien die auf den epithelialen Ionentransport, Schleim und Entzündung abzielen

Für den Meilenstein CF-3, wurde in Kooperation mit UGMLC spezifische DNAzyme zur Korrektur des Ionentransportdefekts in β ENaC-überexprimierenden Mäusen entwickelt und deren therapeutische Wirksamkeit überprüft. Funktionelle Assays für die therapeutischen Wirkung dieser DNAzyme an hoch differenzierten primären Atemwegsepithelkulturen, einschließlich elektrophysiologischer Untersuchungen in Ussingkammern sowie Messungen der Höhe und Regulation des Atemwegsoberflächenfilms mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops wurden etabliert. Jedoch zeigten die am UGMLC hergestellten DNAzyme Moleküle (gerichtet gegen RNA der α -, β - und γ -Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals ENaC), in mehreren unabhängigen Experimenten, keine Hemmung der Funktion von ENaC und entsprechend keine therapeutischen Effekte in der β ENaC-überexprimierenden Maus (CF-3.1).

Wie in CF-1.2 bereits beschrieben, wurde die Hemmung des IL1-Rezeptors durch Anakinra untersucht und als sicheres und wirksames therapeutisches Mittel in akuter Pseudomonas Infektion im Mausmodell bestätigt. Aufbauend auf diesen Befunden ging es in CF-3.4 im Besonderen um die Sicherheit dieser antiinflammatorischen Strategie im Kontext der bei CF-Patienten häufigen chronischen Pseudomonasinfektion. Hierfür wurde ein chronisches Pseudomonas-Infektionsmodell in β ENaC-Mäusen und Wildtyp-Mäusen etabliert und der Effekt einer Therapie mit Anakinra im Rahmen der chronischen Pseudomonas-Infektion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Anakinra (wie in nicht-infizierten Mäusen) zu einer Hemmung der neutrophilen Entzündung führte, jedoch die Abwehr von Pseudomonas zu beeinträchtigen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Therapie mit Anakinra bereits bei neonatalen β ENaC-Mäusen antiinflammatorisch wirkte und auch dort keine ungünstigen Effekte auf die bei β ENaC-Mäusen vorkommende spontane Atemwegsinfektion mit Keimen der oropharyngealen Flora hatte. Mit diesen Untersuchungen konnten wir das therapeutische Potential sowie die Sicherheit von Anakinra als potentielle antiinflammatorische Therapie der CF-Lungenerkrankung weiter untermauern. Diese in vivo Untersuchungen in einem präklinischen Mausmodell bildeten die Grundlage für Ausarbeitung eines Studienprotokolles für einen Investigator Initiated Trial (IIT) als multizentrischen Phase IIa Studie im DZL mit Anakinra als neue antiinflammatorische Therapie bei Patienten mit CF (FKZ82DZLV34A1).

Unter CF-1.2 wurden die phänotypische und funktionelle Veränderung von Atemwegs Makrophagen β EnaC Mausmodel näher untersucht und deren Rolle in Pathogenese und Inflammation von CF-Lungenerkrankungen identifiziert. Um die erworbenen Erkenntnisse und daraus resultierenden therapeutischen Möglichkeiten in das humane Krankheitsbild zu übertragen und potentiell neue therapeutische Strategien zu evaluieren, wurden in CF-3 in

Zusammenarbeit mit Hannover (BREATH), die induzierte pluripotente Stammzellen (IPS) Methode erfolgreich am TLRC etabliert. IPS Zellen von einem gesunden Probanden und einem CF- Patienten wurden zu Makrophagen differenziert und funktionell verglichen. Behandlung der Makrophagen mit bakteriellem Lipopolysaccharide (LPS) zeigte eine verstärkte hyperinflammatorische Antwort der CF generierten Makrophagen, im Vergleich zu gesunden Zellen. Diese Daten unterstützen die Annahmen, dass Makrophagen in CF eine proinflammatorische Rolle spielen, insbesondere in Hinblick auf bakterielle Infektionen. Des Weiteren konnten wir aufzeigen, dass Muzine einen Stimulator für IPS-generierte Makrophagen darstellen. Zur Validierung dieser Befunde und eventueller Identifizierung von Patientenheterogenität, wurden 2020 zwei weitere CF-IPS Zelllinien evaluiert um phänotypische Unterschiede von Makrophagen zu charakterisieren und mögliche therapeutische Wege zu identifizieren.

CF-4.1: Verwendung etablierter MRT und MBW Protokolle in der TRACK-CF Säuglingsstudie, Exazerbationsstudien, PRESIS und anderen Studien zur frühen Intervention.

Die während DZL1.0 etablierten MRT- und MBW-Protokolle werden zur quantitativen, longitudinalen Phänotypisierung der frühen CF-Lungenerkrankung in der CF-Neugeborenen-Kohorte (TRACK-CF: aktuell 150 Patienten, davon 20 in 2020 rekrutiert) genutzt. Zudem haben wir diese Endpunkte bereits in einer Querschnittsstudie genutzt, um Exazerbationen sowie das Therapieansprechen zu untersuchen. Darauf aufbauend sammeln wir aktuell Daten, um den Verlauf der frühen CF-Lungenerkrankungen über mehrere Jahre zu untersuchen, auch hinsichtlich des Einflusses von Exazerbationen. Da Exazerbationen im frühen Kindesalter selten sind (durchschnittliche Rate in PRESIS-Studie: 1 Exazerbation/Patient und Jahr), wird ein längerer Beobachtungszeitraum benötigt, um eine ausreichende Anzahl von Ereignissen zu beobachten. Die longitudinalen MRT-Daten von 97 Patienten der TRACK-CF-Kohorte über die ersten vier Lebensjahre wurden bereits ausgewertet, womit nicht nur longitudinale MRT-Verläufe von CF-Patienten erstmals abgebildet wurden, sondern auch die weltweit ersten engmaschigen schnittbildgebenden Ergebnisse einer sehr jungen CF-Kohorte vorliegen. Hierbei war es möglich, die Erkenntnisse aus Querschnittsstudien zu bestätigen, welche eine Progression der CF-Lungenerkrankung durch höhere MRT-scores bei älteren Patienten im Vergleich zu jüngeren Patienten nahelegten. Dieses Voranschreiten hielt in der Gesamtkohorte über die ersten 4 Lebensjahre an und zwar sowohl seitens der morphologischen Auffälligkeiten als auch seitens der Funktionseinschränkungen, gemessen an den Perfusionsdefiziten. Die Gesamtkohorte umfasste drei gleich starke Gruppen von Kindern: 1) Kinder, die präsymptomatisch nur aufgrund des CF-Neugeborenencreenings (NBS) diagnostiziert wurden, 2) Kinder, die ebenfalls früh (während der ersten 4 Lebensmonate) aufgrund einer CF-typischen Klinik diagnostiziert wurden und 3) Kinder, die aufgrund klinischer Auffälligkeiten später im Leben diagnostiziert wurden. Ein Vergleich dieser

Gruppen zeigte, dass die Kinder aus der CF-NBS-Gruppe nicht nur zum Zeitpunkt der Diagnosestellung kurz nach Geburt, sondern auch über die folgenden ersten Lebensjahre signifikant niedrigere MRT-scores aufwiesen als die klinisch diagnostizierten Kinder. Jedoch war die Progressionsrate in allen 3 Gruppen vergleichbar. Dies deutet daraufhin, dass zwar eindeutig einen Vorteil des CF-NBS gibt, da es die Diagnose der Kinder zu einem Zeitpunkt erlaubt, zu dem die CF-Lungenerkrankung noch weniger weit fortgeschritten ist. Hierdurch öffnet sich ein „window of opportunity“ für frühe Interventionen. Dabei scheinen die bislang eingesetzten (und bei allen teilnehmenden Kindern umgesetzten) symptomatischen Therapieansätze jedoch nicht ausreichend zu sein, um das Voranschreiten der CF-Lungenerkrankung aufzuhalten. Dies unterstreicht die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen, die die Progressionsrate reduzieren können. Die Datenauswertung konnte 2020 finalisiert werden. Die Einreichung des Manuskripts zur Veröffentlichung dieser Daten ist im Februar 2021 beim *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Impact Factor: 17.425) erfolgt.

Die Untersuchungsprotokolle für MBW und MRT in Sedierung bei pädiatrischen CF-Patienten wurden aus dem TLRC an die anderen DZL-Zentren weitergegeben und im Rahmen von Machbarkeitsstudien standardisiert. Für beide Verfahren wurden die Ergebnisse bereits publiziert (Stahl M et al, J Cyst Fibros 2018; Wielpütz MO et al., J Cyst Fibros 2018). Zusätzlich wurde die Durchführung des MBW bei wachen Vorschulkindern anhand eines Untersuchungsprotokolls des TLRC an den übrigen DZL-Zentren etabliert und hinsichtlich der Machbarkeit validiert. Hierbei konnte eine hohe Erfolgsrate erzielt werden. Das Ergebnis dieser Validierungsstudie konnte 2020 veröffentlicht werden (Stahl M et al. ERJOR 2020). Auf Basis dieser Arbeiten ist eine Kooperation mit dem Pharmaunternehmen Vertex zustande gekommen, das ab 2018 eine klinische Studie sponsert, an der die DZL Standorte TLRC, ARCN, BREATH, UGMLC sowie der assoziierte Partner Charité -Universitätsmedizin Berlin beteiligt sind. Bei der Untersuchung der Sicherheit und Wirksamkeit eines CFTR-Modulators bei Vorschulkindern mit CF ist das MRT der Lunge erstmals der primäre Endpunkt in einer solchen Interventionsstudie im Vorschulalter. Das MBW dient zur Erhebung sekundärer Endpunkte. Im Rahmen dieser Studie werden weitere DZL-finanzierte Substudien mit explorativen Endpunkten (z.B. Entzündungsmarker in Abstrichen) durchgeführt, die zum DZL CF-Forschungsprogramms beitragen.

Im Bereich der MBW-Forschung gibt es noch Unklarheit/Uneinigkeit über das vorzugsweise einzusetzende Tracergas, insbesondere bei älteren Säuglingen und Kleinkindern am Übergang von der (aktuellen) „SF6-Pflichtigkeit“ (in den ersten Lebensmonaten, da zu diesem Zeitpunkt reiner Sauerstoff, wie er für das N2-MBW verwendet wird, zu einer Störung des Atemmusters mit dem Risiko einer Hypoxämie führen kann) zur Möglichkeit, ein N2-MBW durchzuführen. Es erfolgte daher eine Studie am TLRC, in der lungengesunde Vorschulkinder und

Vorschulkinder mit CF nacheinander ein MBW mit beiden Tracergasen erhielten und dann die Ergebnisse beider Messungen verglichen wurden. Hierbei zeigte sich im Einklang mit Daten von älteren Menschen, dass der N2-LCI bei Kontrollen höher ist als der SF6-LCI. Diese Differenz ist bei CF-Patienten noch größer und ist umso stärker ausgeprägt, je lungenkränker die Kinder sind. Bei den CF-Kindern wurde zudem zum selben Zeitpunkt ein MRT der Lunge gemacht. Beim Vergleich der Übereinstimmung zwischen Lungenfunktion mittels MBW und MRT zur Erfassung einer CF-Lungenbeteiligung zeigte sich, dass die Konkordanz zwischen N2-LCI und MRT höher war als die Konkordanz zwischen SF6-LCI und MRT (Stahl M et al. *J Cyst Fibros* 2019). Zur weiteren Verbreitung des N2-MBW im Vorschulalter zur Nutzung in klinischen Studien wurde an 4 Standorten im DZL (ARCN, BREATH, TLRC, UGMLC) und einem assoziierten Partner (Charité Berlin) eine Validierungs- und Durchführbarkeitsstudie zum N2-MBW bei wachen Vorschulkindern durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine gute Erfolgsrate von 82% erfolgreichen Messungen über alle Zentren nach Training am DZL-Standort TLRC. Hiermit wurden die Voraussetzungen für die Durchführbarkeit der weltweit ersten, randomisiert-Placebo-kontrollierten Studie mit einer CFTR-Modulatorkombination bei CF-Patienten im Vorschulalter geschaffen. Zudem wurden 2020 erste Ergebnisse aus einer nicht-randomisierten Anwendungsstudie am TLRC zu CFTR-Modulatoren bei insgesamt 30 Patienten über einen Beobachtungszeitraum von drei Monaten mit wiederholten MBW- und MRT-Messungen durchgeführt und zur Publikation angenommen (Kooperation mit der Charité Universitätsmedizin) (Gräber SY [...] Wielpütz MO et al. *AJRCCM* 2021).

Die weitere Standardisierung und Validierung des MRT-Scores wurde ebenfalls durch das TLRC weiter beforscht. In einer industriegesponserten Studie wurden in 2016 und 2017 insgesamt 15 Patienten mit CF und 20 Patienten mit COPD in klinisch stabilem Zustand im Abstand von einem Monat klinisch, mittels Spirometrie sowie standardisiertem MRT-Protokoll untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die MRT-Scores in dieser Zeitspanne nicht signifikant ändern, und dass die Schwankungsbreite ca. ± 4 Punkte des MRT-Scores liegt. Für zukünftige klinische Studien bedeutet dieses Ergebnis, dass eine potentielle Therapie den Score um 4 Punkte verbessern sollte, um sicher mittel MRT detektiert werden zu können. Die Ergebnisse wurden 2019 publiziert (Wielpütz MO et al. *AJRCCM* 2019).

Die CF ist nicht nur geprägt durch eine chronische Obstruktion und Inflammation der unteren – pulmonalen – Atemwege, sondern auch durch eine chronische Inflammation der paranasalen Sinus. Es wird zudem vermutet, dass die oberen Atemwege eine Art Reservoir für wiederholte Infektionen der unteren Atemwege darstellen und daher eine modifizierende Rolle auch für die pulmonale Beteiligung spielen könnten. Daher haben Mitarbeiter der JRG-SFI (Wielpütz et al.) zusammen mit der Abteilung für pädiatrische Pneumologie und Mukoviszidosezentrum am TLRC die Nasennebenhöhlen von 67 pädiatrischen CF Patienten im Alter von 0 – 6 Jahren und 30 gesunden Kontrollen mittels MRT untersucht, um die frühe Manifestation der chronischen Sinusitis bei CF zu charakterisieren. Die MRT fand dabei im

Rahmen der am TLRC jährlichen durchgeführten Lungen-MRT statt. Die Gruppe konnte erstmals in dieser Studie belegen, dass sich bereits im Säuglingsalter CF-typische Nasennebenhöhlenveränderungen finden, und im Vorschulalter bereits pathognomonische und ausgeprägte Veränderungen der Nasennebenhöhlen vorliegen. Die Publikation hierzu wurde bereits angenommen (Sommerburg & Wielpütz et al. *MRI Detects Chronic Rhinosinusitis in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis*. Annals ATS 2020). Weitere Arbeiten zur longitudinalen Entwicklung der Nasennebenhöhlenerkrankung bei CF parallel zur Lungenerkrankung sowie der Vergleich mit Patienten mit primärer Ziliendyskinesie PCD sind bereits in Vorbereitung.

CF-4.2: Entwicklung und Standardisierung von kontrastmittelfreier Fourier-Dekomposition (FD) MRT, hochauflösender 3D MRT mit ultrakurzen Echozeiten (UTE), Na+MRT, Gasverstärkter MRT, automatischer Bildanalyse

Um die vorhandenen, im Rahmen von DZL1.0 etablierten MRT-Protokolle als Endpunkte für die CF-Lungenerkrankung weiter zu verbessern, hat das TLRC verschiedene Ansätze verfolgt: Mittels Fourier Dekompositions-Magnetresonanztomographie (FD-MRT) konnten Wissenschaftler in Kooperation mit dem DKFZ in der Vergangenheit belegen, dass eine kombinierte Lungen ventilations- und –perfusionsmessung auch ohne i.v.-Applikation von Kontrastmittel möglich ist. Wir konnten nun bei 70 Patienten im Alter von 0-6 Jahren über 150 FD-MRT-Untersuchungen durchführen und mittels Software quantitativ auswerten. Erstmals wurden auch Neugeborene mit dieser Technik untersucht. Hierbei korrelierte die Schwere der funktionellen Störungen gut mit der Krankheitsschwere, gemessen durch den etablierten MRT-Score. Die Ergebnisse werden auf den entsprechenden internationalen Kongressen präsentiert, eine Publikation ist derzeit in Vorbereitung und wird in 2021 eingereicht. In Kooperation mit der Universität Basel konnte der Sequenztyp weiterentwickelt werden, und die Ergebnisse dieser Kooperation wurden bereits publiziert (Pusterla et al. *Magn Reson Med* 2017). Eine weitere Arbeit aus der JRG-SFI verwendet eine andere, technisch einfacherere kontrastmittelfreie Sequenz, um Zeichen einer Lungenminderperfusion und Überblähung in der MRT nachzuweisen. Hierfür wurden die Daten von 51 CF-Patienten zwischen 0 und 6 Jahren ausgewertet und zur Publikation in 2017 eingereicht; in 2018 wurde die Arbeit bereits zur Publikation angenommen (Leutz et al. *Eur J Radiol* 2018). Die Ergebnisse dieser Studie können dazu beitragen, die Belastungen durch Diagnostik weiter zu reduzieren, und die MRT als Endpunkt gleichzeitig um eine Ventilationsmessung erweitern. Die Arbeit zur kontrastfreien MRT wurde zusätzlich durch die Christiane-Herzog-Stiftung sowie den Mukoviszidose e.V. mit 50.000 Euro über 3 Jahre gefördert, welche in 2017 abgeschlossen wurde.

Forscher am TLRC konnten im Rahmen des DZL1.0 belegen, dass die quantitative Bildgebung mittels ultra-kurzer Echozeiten im MRT (UTE-MRT) eine differenzierte Beurteilung von Veränderungen des Lungenparenchyms und des regionären Blutvolumens ermöglicht (Triphan SMF et al. *J Magn Reson Imag* 2015). In 2016 wurden Arbeiten zur Reproduzierbarkeit dieser Methode ausgeführt, welche eine gute Stabilität der Messungen belegen. Die Publikation hierzu wurde mittlerweile veröffentlicht (Triphan SMF et al. *PLoS One* 2017). Die MRT-Sequenzen wurden seitdem in das Protokoll für CF-Patienten implementiert. In 2020 hat die Gruppe am TLRC Daten von über 75 Patienten im Alter von 0-23 Jahren zusammengetragen, und eine gute Korrelation der gemessenen T1-Relaxationszeit mit klinischen Parametern (MBW, FEV1) und der KM-gestützten MRT gezeigt (Triphan SMF [...] Wielpütz MO *J Magn Reson Imaging* 2020). Sowohl die FD-MRT als auch die quantitative UTE-MRT stellen nicht-invasive Verfahren dar, die benutzerunabhängige nicht-invasiv und strahlungsfrei Messwerte als „bildgebende Biomarker“ liefern. Die gewonnenen Ergebnisse werden gegenwärtig in Folgestudien auf die COPD übertragen, Ergebnisse sind für 2021 zu erwarten.

In einem Kooperationsprojekt der JRG-SFI mit der Abteilung für Medizinische Physik am Deutschen Krebsforschungszentrum DKFZ Heidelberg wurde mit finanzieller Unterstützung durch das DZL (50.000€; Investition 2014) eine neuartige experimentelle Spule entwickelt, mit welcher in der Magnetresonanztomographie nicht das Signal von Protonen, sondern von ^{23}Na bei sehr hohen Feldstärken am 7T MRT gemessen werden kann. Da Na entsprechend viel seltener im Körper vorkommt, ist die Spule nicht für eine strukturelle Bildgebung entwickelt worden, sondern für die selektive Darstellung von Stoffwechselprozessen. Insbesondere die Mukoviszidose geht mit einer erhöhten Na-Resorption aus dem oberflächlichen Flüssigkeitsfilm auf den Atemwegen einher, und einige therapeutische Maßnahmen greifen genau in diesen Prozess ein und versuchen die Na-Balance wiederherzustellen. Somit könnte die Na-Spule genutzt werden, um unmittelbare Therapieeffekte sichtbar zu machen. Erste Untersuchungen an Probanden wurden in 2017 abgeschlossen. Ein Manuskript zu den technischen Aspekten des Spulenbaus und der Sequenzprogrammierung wurde bereits publiziert (Platt et al. *Magn Reson Med* 2018). Weitere Patientenmessungen sind in Planung.

Im Rahmen eines durch die Universität Heidelberg mit 5.000 € geförderten Forschungsaufenthaltes an der Universität Kobe in Japan konnte ein PI des TLRC (PD Dr. M. Wielpütz) eine Studie zur UTE-MRT zur morphologischen Charakterisierung von Bronchialkarzinomen in 2016 durchführen. Die Arbeit wurde auch in Kooperation mit der Universität Seoul, Südkorea durchgeführt. Die Datenanalyse wurde in 2017 abgeschlossen und die Arbeit zur Publikation angenommen (Wielpütz MO et al. *Am J Roentgenol* 2018). Die Ergebnisse zeigen, dass die UTE-MRT die spezifischen bildgebenden Eigenheiten von Bronchialkarzinomen und Lungenrundherden nahezu genauso gut repräsentiert wie die CT als Goldstandard. Die Ergebnisse tragen zu der wachsenden Erfahrung mit diesem Sequenztyp

bei. Im Rahmen des DZL-Forschungsprogramms sollen die Erkenntnisse nun am TLRC auf die CF und COPD Lungenerkrankungen angewendet werden. Ein entsprechender Sequenztyp wurde Ende 2017 bereits auf mehreren MRT-Scannern des TLRC implementiert und soll für die CF und COPD-Kohorten eingesetzt werden.

Um eine objektivere Messung der kontrastmittelgestützten Lungenperfusionsmessung unabhängig vom visuellen MRT-Score zu erreichen arbeiten die Forscher des TLRC in Kooperation mit einem Industriesponsor seit 2017 an der automatischen Quantifizierung der Perfusionsstörungen in % vom gesamten Lungenvolumen, welches umfangreiche Registrierungs- und Segmentierungsschritte voraussetzt. Eine Vorstudie hatte eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit der „klassischen“ quantitativen Marker (pulmonales Blutvolumen, pulmonaler Blutfluss) (Ter-Karapetyan A, Triphan SMF [...] Wielpütz MO *PLoS One* 2018), so dass ein neuer potentiell technisch stabilerer Parameter gefunden wurde. Gegenwärtig werden die gewonnenen Daten auf Basis der Bilddaten aus der COSYCONET-Studie für insgesamt drei Publikationen aufbereitet, eine wurde in 2020 bereits eingereicht. Parallel zu den klassischen Ansätzen von Registrierung und Segmentierung arbeitet das TLRC auch an der Nachbildung des MRT-Scores mittels maschinellem Lernen. Hierfür werden die Bilddaten sowie der zugehörige MRT-Score von insgesamt über 800 MRT-Untersuchungen des TLRC bei pädiatrischen Patienten zum Training und zur Validierung der künstlichen Intelligenz herangezogen. Erste Ergebnisse sind erst für 2021 zu erwarten. Dieses Projekt wird als Anschubfinanzierung vom Mukoviszidose e.V. mit 20.000 € gefördert, weitere Projektanträge werden in 2021 vorbereitet.

Die Prozesse im Rahmen einer automatisierten Bildanalyse von CT-Daten wurden durch die JRG-SFI 2016-2020 fortgesetzt untersucht. Aus der Kooperation mit der Stanford University in Palo Alto Kalifornien sowie der University of Michigan in Ann Arbor ging 2019 eine weitere Arbeit hervor, in der das internationale Forscherteam belegen konnte, dass die zusätzliche Anwendung neuer Bildregistrierungsverfahren die oben beschriebene Segmentierung nochmals verbessert (Weinheimer et al. *Acad Radiol* 2019). Geplant ist nun, in diesem Konsortium in einem größeren Kollektiv Atemwegs- und Parenchymveränderungen in einer longitudinalen Studie quantitativ zu untersuchen. Diese Arbeiten haben bereits 2018 begonnen, eine Publikation soll in 2021 fertiggestellt werden.

Zudem wurden im Rahmen dieser Kooperation die Möglichkeiten zur Standardisierung der quantitativen CT mittels kalibrierter Phantome untersucht. Die Stanford University stellte hierfür eine Serie von Atemwegs- und Lungendichte-Phantomen mittels 3D-Druck her, wobei die Qualität und Kalibrierung der Dimensionen an verschiedenen CT-Scannern (Stanford University Palo Alto, Universität Heidelberg, Michigan University Ann Arbor) gemessen und mittels der YACTA-Software der Juniorgruppe JRG-SFI vermessen. Eine Publikation ist bereits

in Vorbereitung. In 2021 sind erste Messungen mit Patienten geplant, bei der das sog. Miniphantom mitgeführt werden soll.

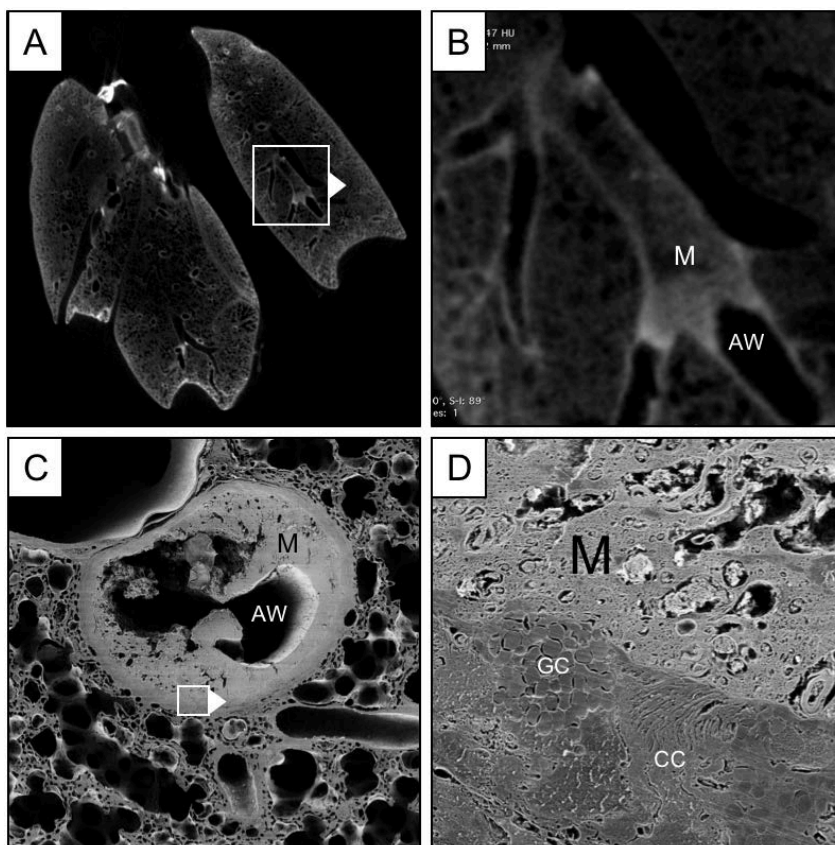
In einer Kooperation mit der Stanford University, Michigan University und Mayo Clinic (alle USA) wurden diese Ansätze zur standardisierten quantitativen CT weiterverfolgt. Dr. Bartholmai aus der Radiologie der Mayo Clinic stellte der Gruppe in 2019 einen Datensatz mit fast 200 CTs von erwachsenen Patienten mit interstitiellen Lungenkrankheiten, welche mit einem ultralow-dose Protokoll und im selben Atemstopp mit einem low-dose Protokoll gescannt wurden, zur Verfügung. Dieser einmalige Datensatz ermöglichte der JRG-SFI, den Einfluss der Dosisreduktion (um ca. 90%) auf die quantitativen Parameter wie Segmentierungsqualität, Lungendichte, Atemwegsdimensionen etc. zu untersuchen. Es zeigte sich wie in früheren Arbeiten beim Vergleich von Standard-Dosis zu Low-Dose ein systematischer Trend zu einer Erhöhung der Lungendichte und eine Zunahme der Atemwegswanddicke durch Dosisreduktion. Aktuell befindet sich ein Manuskript in Vorbereitung zur Einreichung in 2021.

Dieses Konsortium wurde zudem in 2019 noch durch das Westmead Hospital, Lehrkrankenhaus der University Sydney (PI Katie Bayfield), erweitert. An diesem wurden in Kooperation im Jahr 2019 bereits über 50 pädiatrischen CF-Patienten mit der neuartigen ultra-Niedrigdosis CT untersucht und mit dem gewöhnlichen Niedrigdosis-Regime in selber Sitzung gescannt. Die Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass eine dramatische Dosisreduktion sich nicht wesentlich negativ und beherrschbar auf die quantitativen Bildinformationen auswirkt, und dass die Korrelation mit MBW und klinischen Parametern erhalten bleibt. Die Publikation wurde 2020 fertiggestellt zur Einreichung in 2021.

Des Weiteren wurde in 2017 ein Pilotprojekt zur Etablierung der Serial Section Scanning Electron Microscopy (SSEM) bei Mäusen mit einer CF-ähnlichen Lungenerkrankung mit Unterstützung von flexiblen Mitteln des UKHD finanziert (Umwidmung 4, 2018). Ziel dieses Pilotprojekts ist es unter anderem mit Hilfe der Serial Section Scanning Electron Microscopy (SSEM) die Mukusobstruktion bei Mäusen mit einer CF-ähnlichen Lungenerkrankung und die damit zusammenhängenden strukturellen Veränderungen der Atemwege und der Alveolen zu untersuchen. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg wurde ein spezielles Verfahren zur Imprägnierung von fixierten Mauslungen mit Osmiumtetroxid entwickelt. Ein Hauptziel der Untersuchungen ist zunächst die Darstellung der globalen Verteilung von Atemwegs-Mukus über das Tracheobronchealsystem der gesamten Lunge (unter Verwendung hochauflösender Micro-CT Bildgebung) und im Anschluss eine elektronenmikroskopische Untersuchung vorselektierter Regionen von besonderem Interesse. Für die ultrahochauflösende elektronenmikroskopische Untersuchung wird ein neues Verfahren angewendet, welches die Vorzüge der klassischen Trans- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) verbindet. Basierend auf der

angepassten Osmiumimprägnierung ist eine Beschichtung der Probenoberfläche mit Goldstaub (Sputtering) nicht mehr notwendig. Die Proben werden im Rasterelektronenmikroskop untersucht, offenbaren jedoch wegen der fehlenden Goldstaubbeschichtung ultrastrukturelle Merkmale auf zellulärer Ebene, wie sie sonst nur aus der Transelektronenmikroskopie bekannt sind (siehe Abbildung). Hierdurch kann der dreidimensionale Aspekt aus der REM und der ultrastrukturelle Aspekt aus der TEM in einer Untersuchungstechnik kombiniert werden.

Die Analyse der im Kleintier μ CT (lfd. Nr. 61; DZL 2015) generierten Datensätze hinsichtlich der Verteilung von Schleimpfropfen entlang des Tracheobronchialbaumes und das Detektieren von Bronchiektasen, Air-Trapping und Emphysem durch Mitarbeiter der Abteilung Diagnostische und Interventionelle Radiologie werden durch die Serial Block Face Scanning Electron Microscopy -Untersuchungen komplementiert und auf eine ultrastrukturelle Ebene erweitert, die in dieser Form in ihrer topographischen Abhängigkeit noch nicht untersucht wurde.



(A) zeigt eine Micro-CT Übersichtsaufnahme nach Osmiumimprägnierung. (B) durch einen Mukus-Pfropfen verlegter Atemweg des linken Lungenlappens. (C) und (D) veranschaulichen die Vorzüge der neuen Hybridtechnik mit dreidimensionalem Eindruck durch Aufnahme im Rasterelektronenmikroskop und der Darstellung ultrastruktureller Details auf zellulärer Ebene.

M=Mukus; AW=Atemweg; GC=Goblet Cell (Becherzelle); CC=Ciliated Cell (Flimmerepithelzelle).

Die Publikation der Daten befindet sich gegenwärtig im internen Revisionsprozess (Wagner WL [...] Wielpütz MO et al.). Parallel zu diesen Arbeiten wurden explantierte und fixierte Lungen auch mittels hochaufgelöster Micro-CT bei 9 µm Auflösung untersucht. Durch quantitative Vermessung des Lungenvolumens, der Alveolargröße und der Dimensionen der präterminalen Bronchien konnten Nachverarbeitungsschritte aus der Computertomographie beim CF Patienten auf das Tiermodell der beta-ENaC transgenen Maus übertragen werden. Somit konnten Effekte der beta-ENaC-Überexpression im Vergleich zum Wildtyp sowie die therapeutischen Effekte des Knockout der Neutrophilen Elastase quantitativ nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden zur Publikation vorbereitet, eine Einreichung ist für 2021 zu erwarten (Lin Z [...] Wielpütz MO).

CF-4.4: Messung der CFTR Funktion mittels Bioassays (ICM, Schweiß-Sekretionsassay, Schweißtest) für die funktionelle *in vivo* Charakterisierung seltener CFTR-Mutationen

In den Jahren 2016 bis 2019 wurden CF Patienten mit zum Teil seltenen CFTR-Mutationen (n=54) sowie gesunde Kontrollen (n=70) mit Hilfe der hier etablierten Biomarker ICM, nasaler PD und Schweißtest funktionell charakterisiert. Im Jahr 2020 wurden zusätzlich 5 CF-Patienten mit seltenen CFTR-Mutationen, sowie 10 gesunde Kontrollen untersucht. Außerdem wurden Lungenfunktion einschließlich Spirometrie, Bodyplethysmographie und Gasauswaschverfahren zur Bestimmung des Lung Clearance Index, sowie bildgebende Verfahren wie MRT-Thorax durchgeführt. In Zukunft ist die Korrelation der funktionellen Charakterisierung und den klinischen Parametern in einer Publikation geplant. Die Erfahrungen der CFTR-Funktionsmessung der CF-Patienten mit seltenen Mutationen fließen aktuell in eine Leitlinie zur Diagnostik von Cystic Fibrosis related disease (CF-RD) ein. Die an Gesunden erhobenen Befunde für ICM und NPD wurden als Referenzwerte für die CFTR-Funktion und die Beurteilung der therapeutischen Effekte der CFTR-Modulatortherapien zum Beispiel in der OrkambiFacts Studie (FKZ 82DZLE14A1) verwendet.

Die multizentrische (BREATH, TLRC, UGMLC) OrkambiFacts-Studie wurde im Berichtszeitraum geplant, vorbereitet und erfolgreich durchgeführt. Gemäß Bewilligung ist die Studie am 01.07.2016 angelaufen. Im TLRC wurden 49 p.Phe508del homozygote CF Patienten in die Studie eingeschlossen und neben den funktionellen Untersuchungen auch klinische und diagnostische Befunde einschließlich der Lungenfunktion und teilweise Gasauswaschverfahren und MRT der Lunge durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung konnten zeigen, dass die CFTR-Modulatorkombination Lumacaftor-Ivacaftor die CFTR-Funktion um 10-20% der normalen CFTR-Aktivität verbessert (Graeber et al, AJRCCM 2018).

Die klinischen Untersuchungen konnten zeigen, dass diese Verbesserung der CFTR-Funktion durch Lumacaftor-Ivacaftor zu einer Verbesserung der Lungenventilation, der Morphologie im MRT der Lunge und die Diversität im Sputum von p.Phe508del homozygoten CF Patienten (Graeber et al, AnnalsATS 2021/provisionally accepted). Außerdem konnte gezeigt werden, dass kein Zusammenhang der Effekte der Therapie mit Lumacaftor-Ivacaftor auf die funktionellen Untersuchungen *in vivo* sowie die klinischen Parameter mit *in vitro* Untersuchungen an patienten-basierten Darmorganoiden besteht (Graeber et al, AJRCCM 2020).

Durch die erfolgreiche Durchführung der OrkambiFacts Studie (FKZ 82DZLE14A1) konnte für Folgestudien zur Untersuchung der Effekte von neuen CFTR-Modulatorkombinationen wie Tezacaftor-Ivacaftor und Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor (BIH, BREATH, TLRC, UGMLC) eine externe Förderung eingeworben werden.

CF-5. Multizentrische CF-Kinder und Erwachsenenkohorten, Biobanken und observative Studien

CF-5.1: Ausbau und Nachverfolgung der TRACK-CF Säuglingskohorte mit Tiefenphänotypisierung einschließlich longitudinalem Monitoring mit quantitativen Ergebnismessungen MRT, MBW und PFT.

CF-5.2: Fortsetzen der longitudinalen Sammlung von Biomaterialien (DNA, RNA, Serum, Atemwegsproben, Atemwegs- und Darmgewebe) gemäß der für Alter und weiteren Krankheitsbereichen (AA, COPD, DPLD) harmonisierten SOPs

CF-5.3: Nutzung der TRACK-CF Säuglingskohorte um Risikofaktoren eines frühen Beginns und Fortschreitens der Lungenerkrankung zu bestimmen.

CF-5.4: Durchführung von Exazerbations-Substudien zur Bestimmung der Rolle von Exazerbationen auf den Verlauf von CF und anderen Lungenkrankheiten (AA, COPD, DPLD)

CF-5.5: Beitrag von klinischen Phänotyp-Daten und Biomaterialien zu CF-Mikrobiom und Modifikator-Studien

In diesem Kohorten-basierten klinischen Forschungsprogramm haben wir die TRACK-CF-Kohorte (u.a. Kinder, die über das CF-Neugeborenenenscreening früh diagnostiziert wurden) durch Rekrutierung weiterer Patienten auf n=150 ausgebaut und inzwischen bereits 90% der eingeschlossenen Kinder über mind. 3 Jahre verfolgt (Rekrutierung in 2020: n=20 Kinder). Alle Patienten werden longitudinal kontrolliert mit einer tiefgehenden Phänotypisierung, welche klinische Parameter, Mikrobiologie (einschließlich Mikrobiomanalysen) und den Einsatz quantitativer Endpunkte der CF-Lungenerkrankung wie MRT, MBW und Spirometrie einschließt (CF-5.1). Zudem konnten bereits über 360 CF-Patienten jeden Alters in die Registerstudie eingeschlossen werden, bei denen zusätzlich Biomaterialien wie Blut (DNA, RNA, Serum), Atemwegssekretproben für Mikrobiomstudien und ggf. Gewebeproben

(Restmaterial aus z.B. Nasennebenhöhlen-OPs) mind. 1x jährlich gewonnen werden (im stabilen Zustand, z.B. im Rahmen des jährlichen Check-ups) sowie zudem im Rahmen von Exazerbationen. Hierbei kommen über die DZL-Standorte hinweg harmonisierte SOPs zum Einsatz, die für verschiedene Altersgruppen und Disease Areas angewendet werden (auch AA, COPD, DPLD). Hierdurch werden DA-übergreifende Forschungsprojekte möglich (CF-5.2). Die klinischen Daten sowie die Daten zur quantitativen Phänotypisierung und die gesammelten Biomaterialien dieser Kohorte werden genutzt, um Risikofaktoren für den Beginn und Verlauf insbesondere der frühen CF-Lungenerkrankung zu identifizieren (CF-5.3 – seit 2018). Mit der unter COPD-2.6 beschriebenen Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Proteaseaktivität auf der Oberfläche inflammatorischer Atemwegszellen werden auch erste Proben von CF-Patienten analysiert. Außerdem werden in der TRACK-CF-Kohorte Substudien zu Exazerbationen durchgeführt, um deren Rolle für den Verlauf der CF- und anderer Lungenerkrankungen (AA, COPD, DPLD) zu untersuchen (CF-5.4). In der oben beschriebenen longitudinalen MRT-Studie (Stahl M et al., Manuscript in preparation) wurde in 2020 auch der Einfluss von Exazerbationen auf den MRT-score untersucht, wobei sich zeigte, dass in der Gesamtkohorte eine hohe Exazerbationsrate von 5 oder mehr Exazerbationen im Jahr vor dem MRT mit einem signifikant höheren MRT-score assoziiert war. Insgesamt war die Exazerbationsrate in der Gesamtkohorte über die gesamte Studiendauer von 4 Jahren stabil, jedoch zeigte sich eine signifikant niedrigere Rate in der CF-NBS-Gruppe im Vergleich zu den klinisch diagnostizierten Patienten. Von der gesamten CF-Kohorte werden außerdem klinische Phänotypisierungsdaten und Biomaterialien gesammelt, aufbewahrt und genutzt für CF-Mikrobiomstudien (CF-FP2) und CF-Modifier-Studien (CF-1), siehe oben (CF-5.5). In 2017 wurde eine in dieser Kohorte durchgeführte Studie zum Vergleich des Lung Clearance Index und der MRT-Bildgebung zur Untersuchung der frühen CF-Lungenerkrankung bei Kindern und Jugendlichen mit CF in klinisch stabilem Zustand sowie im Rahmen von pulmonalen Exazerbationen in dem renommierten *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Stahl M et al., Amer J Respir Crit Care Med 2017; Impact Factor: 17.425) veröffentlicht. Ein wesentlicher Aufwand des Ausbaus der Kohorte besteht in der umfangreichen Datenerfassung, welche durch die über DZL finanzierten medizinischen DokumentarInnen ermöglicht wird. Hierzu gibt es monatliche CF-Datenbanktreffen mit Beteiligung des Datenmanager, der Studienkoordinatorin und Studienärzte. In diesen Datenbanktreffen wird die Dateneingabe, aber auch das Design der Datenbank besprochen und optimiert und damit die Leistungsfähigkeit der Access Datenbank verbessert z.B. optimierte Erfassung der CFTR-Modulatoren, Erfassung der CFTR-Funktionsdiagnostik (wie Ergebnisse der Untersuchung an Rektumschleimhautbiopsien, nasaler Potenzialdifferenzmessung und Schweißtest) im Therapieverlauf sowie Verbesserung der Abfragefunktion. Hierdurch werden DA-übergreifende Forschungsprojekte möglich (CF-5.2). Zu jedem Patienten muss monatlich das Telefoninterview, vierteljährlich die Lebensqualität und jährlich die ausführliche Visite mit MRT und MBW dokumentiert werden. Zusätzlich fallen

bei einem Teil der Patienten Visiten im Rahmen von Exazerbationen an. Dies erfordert bei zunehmender Patientenzahl die kontinuierliche Arbeit eines/einer medizinischen Dokumentationsassistentin (MDA), sodass aktuell alle Visiten von Einschluss bis zum letzten Besuch sehr gut gepflegt sind, um Abfragen für auch interdisziplinäre Projekte (z.B. mit der Radiologie (M. Wielpütz et al.) oder der Mikrobiologie (S. Boutin et al.; CF-F2) zu ermöglichen. Besonders hervorzuheben ist bei der TRACK-CF-Kohorte die engmaschige Erfassung von Symptomen und Therapie, wodurch eine bessere Beurteilung des Verlaufs erst möglich wird. Hierzu erfolgen monatlich standardisierte Telefoninterviews durch eine study nurse. Aufgrund der begrenzten personellen Kapazitäten für diesen Teil des Projektes können die Telefoninterviews aktuell nur bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres durchgeführt werden (laut Studienprotokoll sollten sie bis zum Ausscheiden des Patienten aus der Studie in jedem Lebensalter erfolgen). Auch die Telefoninterviews werden regelmäßig von der MDA in der Access Datenbank erfasst.

Stand der Evaluierung des mit DZL1.0 Finanzierung unterstützte eingeführte CF-Neugeborenenenscreening (CF-NBS) bezüglich A) der Performance des aktuellen CF-NBS-Protokolls und B) der Prozessqualität der diagnostischen Konfirmation positiv gescreenter Neugeborenen.

A) Hierzu wurden die Resultate der Heidelberger CF-NBS-Pilotstudie (2008–2016), in der 480.151 Neugeborene auf CF gescreent wurden, und das Follow-up zur Studie (2016–2020) evaluiert (Meilenstein CF-5). Während des Follow-up konnte das Outcome von drei gescreenten Neugeborenen korrigiert werden. Somit konnten die beiden verglichenen CF-NBS-Protokolle auf einer verlässlichen Datenbasis abschließend beurteilt werden. Dabei zeigte sich, dass das zur Beurteilung stehende rein biochemische Protokoll (IRT/PAP) der Pilotstudie weniger sensitiv ist als das damit verglichene Protokoll mit Suche nach vier *CFTR*-Mutationen. Das biochemische IRT/PAP-Protokoll erreichte die nach den Europäischen (ECSF) „standards of care“ geforderte Sensitivität (95 %) nur unter bestimmten Bedingungen. Das seit 2016 in Deutschland im Routinescreening verwendete CF-NBS-Protokoll gleicht in der ersten und zweiten Stufe dem IRT/PAP-Protokoll. In einer post-hoc Analyse konnte mit dem Datensatz aus der Pilotstudie gezeigt werden, dass auch das aktuell geltende Protokoll nur eine befriedigende Sensitivität erreicht und dass es einer einfacheren genetisch-basierten Strategie mit einem populationsspezifischen Panel an 31 *CFTR*-Mutationen unterlegen ist. Ein Manuskript mit den Ergebnissen wurde 01/2021 zur Publikation eingereicht.

Die Ergebnisse zu den Real-life-Daten als auch Einflussfaktoren wie Temperatur, Abnahmezeitpunkt und Frühgeburtlichkeit für die verwendeten biochemischen Parameter (IRT, PAP) wurden weiter ergänzt und evaluiert (Manuskript in Bearbeitung).

B) Die Ergebnisse des CF-NBS am Screeningzentrum Heidelberg und die berichteten Ergebnisse von Bestätigungstests wurden 24 Monate nach der Einführung des CF-NBS in Deutschland ausgewertet (Meilenstein CF-5). Aufgrund einer sehr schlechten Rückmelderate nach Konfirmationsdiagnostik der positiv auf CF gescreenten Neugeborenen wurde drei Monate nach Beginn des CF-NBS-Programms in Deutschland ein Tracking-System eingeführt, bei dem schriftliche Abfragen verschickt wurden. Nachdem auch dieses noch nicht zu einer verlässlichen Rückmelderate führte, wurde 14 Monate später ein zusätzliches Telefon-Tracking eingeführt. Über den Betrachtungszeitraum von 24 Monaten wurden 281.907 Kinder in Heidelberg auf CF gescreent. Vor Einführung des aktiven Trackings lag der Prozentsatz der Fälle mit zurückgemeldeten Bestätigungsergebnissen nur bei 43 %. Das konsequente Tracking-Verfahren führte zu einer kontinuierlichen Verbesserung dieser Rate auf 84 %. Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Implementierung des Tracking-Systems eine deutliche Qualitätsverbesserung im deutschen CF-NBS-System erreicht wird. Die Kosten für das Tracking für das aktuelle deutsche CF-NBS betragen 1,20 € pro gescreentes Neugeborenes. Das Manuskript mit den Ergebnissen wurde 2020 veröffentlicht (Gramer G et al. Eur J Pediatr 2020).

Im Weiteren wurden seit 2017 Daten generiert, mit denen geklärt werden soll, ob das vom Gemeinsamen Bundesausschuss vorgegebenen Zeitfensters zur Durchführung des CF-NBS (36. Lebensstunde bis 28. Lebenstag) überhaupt mit dem derzeit verwendeten CF-NBS Protokoll sicher durchgeführt werden kann. Aufgrund der *per se* geringen Inzidenz der Mukoviszidose (seltene Erkrankung) dauerte die Kollektion der Daten von CF-Patienten im Rahmen des für die Studie erforderlichen Zeitfensters (21.–35. Lebenstag) auch über 2020 an, kann aber im ersten Quartal 2021 abgeschlossen werden. Das Manuskript für die aus diesem Projekt resultierenden Ergebnisse befindet sich in Vorbereitung.

Krankheitsbereich Pneumonie und Akutes Lungenversagen (ALI)

ALI-1 Role of cell-intrinsic pattern (microbes, damage) recognition receptor (PRR) signaling cross talk in shaping lung immune responses (Die Rolle des zellintrinsischen (Mikroben, Schaden) Recognition Rezeptoren (PRR) Crosstalk Pattern in der Gestaltung der Immunantwort der Lunge).

(1) Abschwächung der Lungenentzündungsreaktion in einem Mausmodell der hereditären Hämochromatose Typ 4.

Die Atemwege sind ständig Krankheitserregern ausgesetzt, die für ihre Proliferation und Virulenz Eisen benötigen. Die pulmonalen Eisenspiegel sind bei mehreren Lungenerkrankungen erhöht und mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen verbunden. Die Regulation der Eisenhomöostase in der Lunge und ihre Auswirkung auf pulmonale Immunantworten sind jedoch weitgehend unerforscht. Für diesen Meilenstein haben wir

untersucht, wie sich erhöhte Lungeneisenspiegel auf die frühe Lungenentzündungsreaktion auswirken. Wir induzierten eine akute lokale Lungenentzündung über aerosolisiertes LPS in einem Mausmodell der hereditären Hämochromatose Typ 4 (Slc40a1C326S / C326S), das durch systemische und pulmonale Eisenakkumulation, insbesondere in Alveolarmakrophagen, gekennzeichnet ist. Wir zeigen, dass sich Slc40a1 (C326S/C326S) Mäuse durch eine leichte Abschwächung der LPS-induzierten Lungenentzündungsreaktion mit einer verringerten Hochregulation einiger proinflammatorischer Zytokine und Chemokine auszeichnen. Trotz leicht reduzierter Zytokinspiegel gibt es keine kurzfristige Beeinträchtigung bei der Rekrutierung von Neutrophilen in den bronchoalveolären Raum. Diese Daten legen nahe, dass erhöhte Eisenwerte in der Lunge die akute Entzündungsreaktion der Lunge nicht stark verändern.

Im Jahr 2020 haben wir hauptsächlich an Überarbeitungen dieses Manuskripts gearbeitet, um die Kritik der Gutachter zu beantworten.

Marques O, Neves, J, Horvat, NK, Altamura, S. and **Muckenthaler, MU**. Mild Attenuation of the Pulmonary Inflammatory Response in a Mouse Model of Hereditary Hemochromatosis Type 4. *Front. Physiol.*, 13 January 2021.

(2) Hypoferrämie sagt Dauer des Krankenhausaufenthalts und Sauerstoffbedarf bei COVID-19-Patienten voraus

Hintergrund: Der Eisenstoffwechsel könnte bei COVID-19-Patienten eine entscheidende Rolle beim Zytokinfreisetzungssyndrom spielen. Daher untersuchten wir die Eisenstoffwechselmarker bei COVID-19-Patienten auf ihre Fähigkeit, die Schwere der Erkrankung vorherzusagen. **Methoden:** COVID-19-Patienten, die an das Universitätsklinikum Heidelberg überwiesen wurden, wurden retrospektiv analysiert. Die Patienten wurden in ambulante Patienten (Kohorte A, n = 204), stationäre Patienten (Kohorte B, n = 81) und ambulante Patienten, die später wegen einer Verschlechterung des Gesundheitszustands ins Krankenhaus eingeliefert wurden (Kohorte C, n = 23), eingeteilt.

Ergebnisse: Die Eisenstoffwechselparameter waren bei Patienten der Kohorte B und C im Vergleich zu Kohorte A stark verändert. In der multivariaten Regressionsanalyse, einschließlich Alter, Geschlecht, CRP und eisenbezogenen Parametern, waren nur Serumeisen und Ferritin signifikant mit dem Krankenhausaufenthalt assoziiert. Die ROC-Analyse ergab eine AUC für Serumeisen von 0,894 und eine Eisenkonzentration <6 µmol / l als besten Grenzwert für die Vorhersage eines Krankenhausaufenthaltes mit einer Sensitivität von 94,7% und einer Spezifität von 67,9%. Bei der Aufteilung der stationären Patienten in eine Gruppe mit niedrigem und hohem Sauerstoffbedarf unterschieden sich die Serum-Eisenspiegel zwischen diesen beiden Gruppen signifikant und zeigten eine hohe negative Korrelation mit den Entzündungsparametern IL-6, Procalcitonin und CRP. Unerwarteterweise korrelieren die Eisenwerte im Serum schlecht mit Hepcidin.

Fazit: Wir schließen daraus, dass die Messung von Serumeisen dazu beitragen kann, den Schweregrad von COVID-19 vorherzusagen. Die Unterschiede in der Verfügbarkeit von Serumeisen, die zwischen der Gruppe mit niedrigem und hohem Sauerstoffbedarf beobachtet wurden, legen nahe, dass ein gestörter Eisenstoffwechsel wahrscheinlich eine kausale Rolle in der Pathophysiologie spielt, die zu einer Lungenschädigung führt (Hippchen et al 2020).

ALI-1.1 Pre-clinical evaluation of targeted and spatial/temporarily restricted interventions to attenuate alveolar injury and protect lung barrier function while preserving host defense and repair capacity*

(1) Eine Störung des Hepcidin / Ferroportin-Regulationssystems führt zu einer pulmonalen Eisenüberladung und einer restriktiven Lungenerkrankung

Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die pulmonale Eisenakkumulation mit einem Spektrum chronischer Lungenerkrankungen zusammenhängt. Die Mechanismen, die an der Eisenablagerung in der Lunge beteiligt sind, und ihre Rolle bei der In-vivo-Pathogenese von Lungenerkrankungen sind jedoch weitgehend unbekannt. Hier zeigen wir, dass eine Punktmutation im Ferroportin-Gen der Maus, die eine erbliche Hämochromatose Typ 4 (Slc40a1C326S) verursacht, den Eisenspiegel in Alveolarmakrophagen, Epithelzellen, die die leitenden Atemwege und das Lungenparenchym auskleiden, sowie in glatten Gefäßmuskelzellen erhöht. Eine pulmonale Eisenüberladung ist bei homozygoten Slc40a1 (C326S / C326S)-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen mit oxidativem Stress, restriktiver Lungenerkrankung, mit verminderter Gesamtlungenkapazität und verminderter Blutsauerstoffsättigung verbunden. Diese Befunde implizieren Eisen in der Lungenpathologie, die bislang nicht als klassische eisenbedingte Störung angesehen wird (Neves et al, 2017; Neves et al, 2019).

(2) Verdickung der Luft-Blut-Schranke und Veränderungen von Alveolarepithel-Typ-2-Zellen in der Lunge von Mäusen mit gestörtem Hepcidin / Ferroportin-Regulationssystem.

Eisen reichert sich in der Lunge von Patienten mit häufigen Atemwegserkrankungen oder transfusionsabhängiger Beta-Thalassämie an. Basierend auf unserer vorherigen Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass eine systemische Eisenüberladung die Alveolarregion der Lunge und insbesondere die Produktion von Alveolarepithelzellen vom Typ II (AE2) beeinflusst. Mäuse mit einer Punktmutation im Eisenexporter Ferroportin, einem Modell für humane Hämochromatose Typ 4, wurden mit Wildtyp-Mäusen verglichen (jeweils n = 5). Die Lungen wurden fixiert und für die Licht- und Elektronenmikroskopie (EM) vorbereitet, um die subzelluläre Eisenlokalisierung durch Scannen von EM / EDX zu erfassen und eine designbasierte Stereologie durchzuführen. Eisen wurde als elektronendichte Partikel in

membrangebundenen Organellen, wahrscheinlich Lysosomen, in AE1-Zellen nachgewiesen. Die Anzahl der AE2-Zellen war höher, sie hatten jedoch bei mutierten Mäusen ein geringeres mittleres Volumen. Das Lamellenkörpervolumen pro AE2-Zelle war geringer, aber das Gesamtvolumen der Lamellenkörper in der Lunge war vergleichbar mit Wildtyp-Mäusen. Während das Volumen der Alveolen bei mutierten Mäusen geringer war, waren das Volumen der Alveolarkanäle sowie die Oberfläche, das Volumen und die mittlere Dicke und Zusammensetzung der Septen in beiden Genotypen ähnlich. Die Dicke der Luft-Blut-Schranke war bei den mutierten Mäusen größer als bei den WT-Mäusen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Störung der systemischen Eisenhomöostase die Ultrastruktur der interalveolären Septa beeinflusst, die durch eine membrangebundene Eisenspeicherung in AE1-Zellen, eine Verdickung der Luft-Blut-Schranke sowie eine Hyperplasie und Hypotrophie der AE2-Zellen trotz normaler intrazellulärer Tensidpools gekennzeichnet ist. Die funktionelle Relevanz dieser Ergebnisse erfordert weitere Analysen, um den Einfluss von Eisen auf die intraalveoläre Tensidfunktion besser zu verstehen.

ALI-3.2

Hemmung der alveolären Resorption durch Hypoxie und bakterielles Endotoxin.

Wir konnten zeigen, dass Hypoxie die alveoläre Flüssigkeitsresorption durch eine Hemmung von ENaC und Na/K-ATPase verringert, und dass eine durch bakterielles Endotoxin ausgelöste Entzündung diese Hemmung verstärkt.

a) Rolle von HIFs. Auf der Suche nach Hypoxie-induzierten Signalen konnten wir zeigen, dass die Hypoxie-induzierte Hemmung der ENaC-vermittelten Na-Resorption von HIF-2alpha aber nur wenig von HIF-1alpha abhängt. Durch Unterdrücken der Expression von HIFs konnten wir nachweisen, dass HIF-2alpha die Menge der alpha-ENaC Untereinheit in der apikalen Plasmamembran und die intrazelluläre Menge, das ist der internalisierte Anteil, kontrolliert, während HIF-silencing nicht die Mengen der beta- und gamma Untereinheiten beeinflusst. Dies weist auf eine unabhängige Regelung der ENaC-Untereinheiten hin. Außerdem fanden wir eine HIF-unabhängige Verminderung der ENaC-Transkription gekennzeichnet dadurch, dass HIF-silencing keinen Einfluss auf die in Hypoxie verminderte ENaC-mRNA hat. Allerdings konnte das Silencing von HIF-2alpha zwar die Menge an alpha-ENaC in der Plasmamembran wieder herstellen, nicht aber die ENaC-Aktivität (Baloglu et al. 2020). Ähnliches zeigte sich beim in vivo Silencing von HIF-2alpha durch intra-tracheale/alveoläre von siRNA-haltigen Vektoren: Auch in vivo konnte die durch Hypoxie verminderte Flüssigkeitsresorption nur teilweise wieder hergestellt werden (Baloglu et al. 2020). Dieses Fehlen der vollständigen Normalisierung des Na-Transports kann möglicherweise durch weiterhin verminderte Mengen der ENaC-beta und -gamma Untereinheiten erklärt werden, welche für eine vollständige Aktivierung des Na-Transports erforderlich sind. Das Überprüfen dieser

Hypothese mittels Patch-clamp scheiterte an der sehr niedrigen Dichte von ENaC in hypoxischen Alveolarepithelzellen.

b) *Inflammation*. Wir konnten zeigen, dass die Hemmung des alveolären Na-Transports durch LPS-stimulierte alveoläre Makrophagen auf der Freisetzung löslicher Faktoren beruht. Diese scheinen in den Alveolarepithelzellen eine NO-Produktion auszulösen, welche dann den Transport hemmt, denn Hemmung der NO-Synthase in Alveolarepithelzellen verhindert auch die Transporthemmung durch LPS-stimulierte Makrophagen. Die Hemmung durch LPS scheint auf einer Nitrierung des ENaC zu beruhen. Zwischen Hypoxie- und Inflammations-abhängiger Signaltransduktion durch HIF gibt es möglicherweise einen Zusammenhang über die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (ROS). Es wäre daher möglich, dass HIF auch an der LPS-induzierten Hemmung des Na-Transports beteiligt ist. Vorläufige Experimente scheinen diese Hypothese allerdings nicht zu unterstützen und auf eine HIF-unabhängige Hemmung des Transports durch LPS-stimulierte Makrophagen hinzuweisen. Das bedeutet, dass die Hemmung des Transports durch Hypoxie und Inflammation durch unabhängige, aber additive Mechanismen erfolgen. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass der Na-Transport über das Alveolarepithel nicht nur die alveoläre Flüssigkeitsbilanz beeinflusst. Hemmung des Na-Transports durch inhaliertes Amilorid beeinträchtigt auch die Sauerstoffdiffusion beatmeter Laborratten, was zu einer Erhöhung pulmonal-arteriellen Druckes führt. Ähnliches trat auch in Hypoxie und nach Gabe von LPS auf (Davieds et al. 2016).

c) *In vivo Effekte alveolärer Inflammation und der Funktion der alveolären Barriere*. Die Hypoxie-induzierte Dysfunktion der alveolären Barriere zeigt sich durch eine Vergrößerung der alveolär-arteriellen Sauerstoff-Differenz und einer verminderten arteriellen Sauerstoffsättigung in Personen, welche unter der akuten Bergkrankheit leiden. Da orale Steroide die Bergkrankheit verhindern, und da diese auch starke Stimulatoren der alveolären Resorption darstellen, testeten wir, ob inhalativ verabreichtes Budesonid die akute Bergkrankheit verhindert und die Sauerstoffdiffusion verbessert (der alveoläre Ionentransport kann beim Menschen nicht direkt gemessen werden). Entgegen der Hypothese fanden wir keine Verbesserung der arteriellen Sauerstoffsättigung und keinen Einfluss auf die Bergkrankheit von zwei Dosen von Budesonid (2x200 and 2x800µg) in einer Placebo-kontrollierten Studie, in der Probanden sich in großer Höhe (4559m) aufhielten (Berger et al. 2017, Berger et al. 2017). Als indirekten Indikator des Ausbleibens der verbesserten Barrierefunktion fanden wir auch, dass inhalativ verabreichtes Budesonid auch keinen Einfluss auf die mittels Doppler-Echokardiographie gemessenen Hämodynamik der Lunge in Hypoxie hatte (Berger et al., 2018, Sareban et al. 2017, Sareban et al. 2018, Sareban et al. 2020).

Mit der Pensionierung von Prof. Mairbäurl (2018) wurden die Arbeiten zum Meilenstein ALI-3.2 nicht fortgeführt.

Krankheitsbereich Interstitielle (Diffuse Parenchymatöse) Lungenerkrankung (DPLD)

DPLD-7.2. Identifizierung von löslichen Mediatoren und Zelltypen in Tiermodellen, die maßgeblich für den Schweregrad der Lungenfibrose verantwortlich sind

Erste Untersuchungen der Lungen von Mäusen mit dem von uns entwickelten Mausmodell mit IPF-ähnlicher Lungenerkrankung (Nedd4-2^{-/-} Mäusen) zeigten eine deutliche Erhöhung von latentem und aktivem TGFβ, wie es auch für Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen beschrieben wird. In einer Kollaboration mit der AG Klingmüller (Partner DKFZ) zur Rolle von TGFβ zeigten wir, dass die Zellen aus Nedd4-2^{-/-} Mäusen eine gesteigerte Sensitivität und eine stärkere Aktivierung des TGFβ-Signalwegs nach Stimulation mit TGFβ aufweisen. Die Aktivierung dieses Signalwegs kann dabei durch Untersuchung von wichtigen intrazellulären Signalmolekülen, wie beispielsweise phosphoryliertem Smad2 und Smad3 nachgewiesen werden. Ebenso können Änderungen in der Expression bekannter nachgeschalteter Zielgene sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene sehr gut bestimmt werden. Um die molekularen Mechanismen von Entstehung und Verlauf besser zu verstehen und andere wichtige Faktoren zu identifizieren wurde Lungengewebe von Nedd4.2^{-/-} und Kontrollmäusen isoliert und RNA extrahiert, um Änderungen im Expressionsprofil zu untersuchen. Die mRNA Untersuchungen werden mit Unterstützung der Genomics Core Facility Gene Core am EMBL durchgeführt. Die erhobenen Daten zeigen eine spontan auftretende Lungenerkrankung mit kontinuierlichem Fortschreiten der Erkrankung, die im Erscheinungsbild einer idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) im Patienten am ähnlichsten ist. Des Weiteren konnten wir in ersten Untersuchungen in Zusammenarbeit mit PD Dr. Mark Wielpütz (NWG-SFI) zeigen, dass die Lokalisation und CT-morphologischen Muster der Veränderungen in den Lungen von Nedd4-2^{-/-} Mäusen denen einer IPF im Patienten sehr ähnlich sind. Zu dem in Nature Communications eingereichte Manuskript wurden in 2019 zusätzliche Experimente im Rahmen der Revision durchgeführt. Finale Änderungen wurden an dem Manuskript zur Charakterisierung des Nedd4-2^{-/-}—Models als IPF vorgenommen und erfolgreich im April 2020 in Nature Communications publiziert (Duerr et al, 2020).

Die hierauf aufbauende semiquantitative visuelle Auswertung der mikroradiologischen Verlaufsuntersuchungen zu der fibrotischen Lungenerkrankung in Nedd4-2^{-/-} Mäusen wurde durch zwei unabhängige Reader abgeschlossen. Eine komplementierende kurze Versuchsreihe zur Abschätzung der applizierten Strahlendosis wurde durchgeführt und wird aktuell noch durch Phantommessungen ergänzt. Eine softwaregestützte Bestimmung der Lungenvolumina wurde etabliert und auf alle Versuchszeitpunkte/Bilddaten angewendet. Die Einreichung der Ergebnisse in Form eines weiteren Manuskriptes ist für 2021 geplant.

Krankheitsbereich Lungenhochdruck (PH; Pulmonale Hypertonie)

PH-1.1. RNAseq und DNA Methylo-Analyse in vaskulären Lungenzellen und Blutproben von PAH Patienten um krankheitsspezifische Informationen zu erhalten

Zusammenhang zwischen BMPR2-Mutationen und Eisenstoffwechsel bei Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie

Eisenmangel tritt häufig bei Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) auf und führt zu einer signifikant verringerten Gehstrecke von 6 Minuten (6MWD), einer höheren Funktionsklasse der WHO und einer höheren Mortalität. Der Eisenstoffwechsel wird über das Hormon Hepcidin reguliert, welches durch die Bindung von BMP Proteinen an den BMP-Rezeptor 2 (BMPR2) hochreguliert wird. Hepcidin ist bei Patienten mit Eisenmangel, idiopathischer und erblicher PAH (I / HPAH) erhöht, was fälschlicherweise auf Eisenüberschuss hinweist. Gleichzeitig tragen 25% der IPAH- und 85% der HPAH-Patienten pathogene Varianten im BMPR2-Gen. In Zusammenarbeit mit DZL-Kollegen von BREATH und der Thoraxklinik Heidelberg konzentrieren wir uns auf die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen BMPR2-Mutationen und Eisenstoffwechsel bei Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie. In einer explorativen Querschnittsstudie wird die BMPR2-Expression durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) und enzymgebundenen Immunosorbens-Assay (ELISA) bei 20 HPAH, 40 IPAH-Patienten und 20 gesunden Kontrollen gemessen. Der primäre Endpunkt wird die Beziehung zwischen Hepcidin- und BMPR2-Expression in Mutationsträgern und Nichtträgern sein. Sekundäre Endpunkte umfassen eisenbezogene Parameter, das Expressionsniveau von BMP6 sowie klinische Parameter, einschließlich 6MWD, echokardiographische und hämodynamische Werte. Zusätzlich wird die Eisenfärbung von Lungengewebe von HPAH-, IPAH-Patienten und Kontrollen Informationen über intrazelluläre Eisenkonzentrationen liefern. Bisher wurden 53 Studienteilnehmer erfolgreich eingeschrieben. Die Expressionsniveaus müssen nach Abschluss der Rekrutierung noch gemeinsam analysiert werden.

Krankheitsbereich Lungenkrebs (LC)

Arbeitsgruppe Professor Muckenthaler

LC-1.1 Etablierung von fortgeschrittenen Zellkulturmodellen einschließlich Standardarbeitsanweisungen für die Kultivierung von primären Tumorzellen, Co-Kultivierung mit Zellen der Tumormikroumgebung, 3D-Kultursysteme, Organ-Co-Kultur, primäre Tumorgewebe-fragmente eingebettet in 3D-Kollagen-Co-Kultur und präklinische Mausmodelle für Lungenkrebs und Entzündung

Core Cross-Linked Polymeric Micelles für eine spezifische Eisenabgabe: Induzierung einer sterilen Inflammation in Makrophagen

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) formen die Tumormikroumgebung (TME) und können die Tumormetastasierung fördern. TAMs können auch einen Antitumor-Phänotyp annehmen. Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIONs) wurden als biokompatible und sichere Eisenquelle für diagnostische und therapeutische Zwecke entwickelt. Bei Anwendung in der TME aktivieren SPIONs spezifisch TAMs und induzieren einen Antitumor-Phänotyp (proinflammatorisch). SPION-beladene TAMs weisen eine Antitumoraktivität auf, die auf ein potenzielles Fenster für die therapeutische Entwicklung und Anwendung hinweist (Costa da Silva et al. 2017 Frontiers Immunology). Wir haben eine neuartige Form von Nanopartikeln mit und ohne Eisenkern entwickelt und getestet. Diese Nanopartikel werden schnell und effizient von aus Knochenmark stammenden Makrophagen (BMDMs) aufgenommen. Wichtig ist, dass unsere Nanopartikel, die einen Eisenkern enthalten, die TAM-Polarisation zu einem Antitumor-Phänotyp signifikant stärker induzieren als Nanopartikel, denen der Eisenoxiddkern fehlt. Sowohl im menschlichen als auch im Maussystem ist der durch Nanopartikel induzierte Phänotyp durch eine erhöhte Expression von Zytokinen und Chemokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6 und iNOS sowie von Zelloberflächenproteinen wie CD80, CD86 und MHC II gekennzeichnet. Das Translationspotential von SPION für die weitere klinische Anwendung ist hoch. Wichtig ist, dass in Kokulturen von Makrophagen und Lewis-Lungenkarzinom (LLC) -Zellen SPIONs zu einem früheren Zeitpunkt eine erhöhte Rate an Tumorzelltod auslösen (im Vergleich zu den Kontrollnanopartikeln oder zu Kulturen von Makrophagen oder LLC-Zellen allein). Wir testeten diese SPIONs derzeit an Mäusen, welche intratracheal mit LLC-Zellen instilliert wurde. Darüber hinaus werden wir in Zusammenarbeit mit Rocio Sotillo (DKFZ) SPIONs an einem gentechnisch veränderten Mausmodell für den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs verabreichen, welcher die chromosomale EML4-ALK-Umlagerung exprimiert.

Im Jahr 2020 konzentrierten wir uns auf die Tieranwendung, die Etablierung der Tumormodelle sowie die SPION-Anwendung über den intravenösen und intratrachealen Weg. Es werden Experimente durchgeführt, um SPIONs in den oben genannten Lungentumor-Modellen zu testen.

Zusammenfassend schlagen wir vor, dass das Targeting von TAMs im TME mit SPIONs Lungentumore anfälliger für eine Behandlung machen kann, was zu einem neuen Weg für die Entwicklung von adjuvanten Arzneimitteln führt.

Tobias A. Bauer, Natalie K. Horvat, Oriana Marques, Christina Mertens, Silvia Colucci, Sascha Schmitt, Luca M. Carrella, Svenja Morsbach¹ Kaloian Koynov, Federico Fenaroli, Peter Blümmler, Michaela Jung, Matthias W. Hentze, **Martina U. Muckenthaler**, Matthias Barz (equal contribution). Core Cross-Linked Polymeric Micelles for Specific Iron Delivery: Inducing Sterile Inflammation in Macrophages (submitted)

Arbeitsgruppe Professor Albrecht Stenzinger

Über die Laufzeit der vergangen 5 Jahren haben sich die Forschungsschwerpunkte unserer Arbeitsgruppe auf immunonkologische Analysen verlagert, ein Trend der für das gesamte DZL LC Forschungsprogramm zutrifft. Die für LC-3.6 Mittel wurden daher zweckgemäß für ein umfassendes Programm zu immunonkologischen Analysen verwendet, die in den kommenden Jahren fortgeführt und erweitert werden sollen (DZL3.0). Ziel der Untersuchungen ist es das Tumormikromilieu qualitativ und quantitativ zu analysieren und mit spezifischen Eigenschaften des Tumors und dem Therapieansprechen integriert zu betrachten. Entsprechende Forschungsprojekte sind mit LC-IO markiert.

Intratumorale Heterogenität (ITH)

Die Untersuchung der morphologischen und molekularen intratumoralen Heterogenität (ITH) in pulmonalen Adenokarzinomen war ein Schwerpunkt unserer Untersuchungen. Ziel dieser Multilateralen Untersuchung ist es Rückschlüsse über die Entwicklung und Progression dieser Tumoren abzuleiten sowie die Reliabilität klinisch relevanter Biomarker, durch die Untersuchung der räumlichen Verteilung innerhalb eines Tumors dar zu stellen. Anhand der eigens hierfür aufgebauten Kohorte (**LC-3.1**), bestehend aus segmentierten zentralen Lamellen von 38 pulmonalen Adenokarzinomen (insgesamt 1132 Segmente/Einzelproben; 12-80 Segmente pro Tumor), wurden in den vergangenen Jahren verschieden Aspekte der intratumoralen Heterogenität erfolgreich untersucht:

❖ ITH onkogener genomischer Varianten

- In ausgewählten Fällen des Kollektivs (19 EGFR- oder KRAS-mutierte Tumore, 614 Segmente) wurde in Kooperation mit der AG Sültmann (DKFZ) die Verteilung der Treibermutation über alle Segmente mittels digitaler PCR in Bezug auf die Tumorzellzahl bestimmt. Wir konnten zeigen, dass die jeweilige Treibermutation in 99% aller tumorhaltigen Segmente detektierbar war, die Allelfrequenz dabei aber stark innerhalb als auch zwischen den unterschiedlichen Tumoren variieren kann. Darüber hinaus zeigten prädominant solide Segmente höhere Allelfrequenzen. Diese Ergebnisse wurde mittlerweile im International Journal of Cancer veröffentlicht (**Dietz et al., 2017; PMID: 28699162**). (**LC-1.5**)

- Aufbauend auf den vorherigen Studienergebnissen, wurde in einem weiteren Projekt der räumliche Einfluss auf die Tumormutationslast (engl.: tumor mutational burden, TMB) sowie die daraus resultierenden Implikationen auf eine Prädiktion der Ansprechwahrscheinlichkeit auf Immuncheck Point Inhibitoren untersucht. Dazu wurden 3-4 räumlich getrennte Segmente von 24 EGFR-negativen Tumoren der Kohorte sowie loko-regionale Lymphknoten mit einem 523 Gene umfassenden Panel analysiert. In einem Drittel der analysierten Fälle wurde eine erhebliche intratumorale Varianz (± 5 mut/Mbp) des TMB festgestellt. Hauptsächlich konnten hierfür biologische Parameter wie unterschiedlich hoher Tumorzellgehalt oder eine subklonale Entwicklung des Tumors identifiziert werden. Diese Varianz würde, bei definierten Schwellenwerten, in 17% der untersuchten Fälle zu jeweils unterschiedlicher klinischer Bewertung der Ansprechwahrscheinlichkeit auf Immuncheck Point Inhibitoren führen. Darüber hinaus zeigte die Studie weitere Störgrößen der TMB Bestimmung, wie ein rein auf Software basierendes Filtern von Keimbahnmutationen, auf. Diese Studienergebnisse konnten bereits erfolgreich publiziert werden (Kazdal et al. 2019, PMID: 31349062; Journal of Thoracic Oncology). **(LC-1.5/LC-3.1/LC-IO)**
- Neben der Tumormutationslast werden zurzeit auch andere Biomarker auf ihr Vorhersagepotential bezüglich des Ansprechens auf Immuncheck Point Inhibitoren untersucht. Vielversprechend erscheinen in diesem Zusammenhang vor allem Genexpressionsprofile (GEP). Daher wurde in einem weiteren Ansatz die intra- und intertumorale Heterogenität von Immuncheck Point relevanten GEP untersucht, um so das immunologische Micromilieu eines Tumors zu charakterisieren. Drei bis vier Segmente ausgewählte Fälle des Kollektivs wurden mit einem 770 Gene-umfassenden Panel untersucht. In einer ersten ungerichteten Analyse zeigten 752 von 770 Genen eine größere Varianz zwischen unterschiedlichen Tumoren als innerhalb eines Tumors. Die Betrachtung spezifischer Gensignaturen, die mit der Anzahl unterschiedlicher Immunzelltypen korrelieren (Danaher et al. 2017) konnten wenig und stark Immunzellinfiltrierte Proben unterschieden werden. Während 74 % der Tumore homogen hoch oder niedrig infiltrierte waren war eine heterogene Infiltration in 26 % zu erkennen. **In 2020** wurde zusätzlich eine Validierung der Immunzellinfiltrate durch Immunhistochemische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse werden zurzeit zur Publikation vorbereitet. **(LC-3.1/LC-IO)**

❖ ITH mitochondrialer Alterationen

- In einem parallelen Ansatz wurde der Fokus auf Alterationen des mitochondrialen Genoms gelegt. Hierzu wurden zunächst Unterschiede in der Kopienzahl des mitochondrialen Genoms zwischen den einzelnen Segmenten eines Tumors (16 Tumore, 381 Segmente) bestimmt (real-time PCR) und in Korrelation zum gesamt DNA Gehalt

sowie zum jeweils prädominanten histologischen Wuchsmuster gesetzt. Dabei zeigte sich eine stark ausgeprägte inter- und intratumorale Heterogenität. Prädominant lepidische Segmente hatten einen signifikant erhöhten und prädominant solide Segmente einen erniedrigten relativen mitochondrialen DNA Gehalt. Darüber hinaus wurde eine Übersicht zur Prävalenz somatischer Mutationen des mitochondrialen Genoms in pulmonalen Adenokarzinomen erarbeitet. Unsere Ergebnisse geben Hinweise für eine passive Rolle und Verteilung dieser Mutationen und konnten keine Anzeichen für eine tumortreibende Funktion aufdecken. Als Passagiermutation könnten sie als potentielle Progressionsmarker dienen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden im British Journal of Cancer veröffentlicht (Kazdal et al. 2017; PMID: 28557978). **(LC-1.5)**

- Die in den Vorarbeiten dargestellte intratumorale Heterogenität genetischer CNV-Alterationen der Mitochondrien wurde nun durch die vollständige Sequenzierung des mitochondrialen Genoms (whole mtDNA sequencing) weiter analysiert. Dazu wurden alle Segmente von 19 Tumoren (395 Einzelproben) sowie Lymphknotenmetastasen und nicht neo-plastisches Gewebes sequenziert. Es zeigte sich, dass somatische mtDNA Mutationen innerhalb eines Tumors entweder ubiquitär in allen Segmenten oder begrenzt auf bestimmte Areale auftraten. Auf Grundlage diese Mutationsmuster konnte in phylogenetischen Analysen die relativen Distanzen der einzelnen Tumorregionen zueinander und in Abgrenzung zum nicht-neoplastischen Gewebe dargestellt werden, was in mehreren Fällen auf eine subklonale Evolution hindeutete. Darüber hinaus könnte eine klinische Bedeutung in der Anzahl der ubiquitären Mutationen liegen. In der untersuchten Kohorte hatten Patienten mit mehr als zwei ubiquitären mtDNA Mutationen ein signifikant kürzeres „krankheitsfreies Überleben“. Die Ergebnisse dieser Studie wurde in 2018 publiziert (Kazdal et al. 2018, PMID: 30527196; Lung Cancer). **(LC-1.5/LC-2.2)**
- Aufbauend auf diesen Erkenntnissen, wurde nun in einem Pilotprojekt (n=3) der mtDNA-Mutationsstatus des Rezidivs mit dem des entsprechenden Primärtumors verglichen. Dabei konnten die Rezidive, vor allem aufgrund der ubiquitär verteilten mtDNA-Mutationen eindeutig dem entsprechenden Primarius zugeordnet werden. Im nächsten Schritt soll nun untersucht werden ob diese persistenten Mutationen auch im Blut (Liquidbiopsy; nachweisbar sind und so einen potentiellen Marker für das frühzeitige Erkennen eines Rezidivs dienen könnten. Hierzu wurde ein Sequenzierpanel speziell für die Analyse mitochondrialer Mutationen in zellfreier DNA designed um Blutproben analysieren zu können. Die Validierung des Panels konnte als Folge der COVID19 Restriktion noch nicht abgeschlossen werden. Im Anschluss and die Validierung ist geplant gepaarte Proben aus Resektat und einer Blutprobe vor Resektion auf das Vorliegen von mtDNA Mutation zu vergleichend zu untersuchen. **(LC-2.2)**

- Darüber hinaus wurde ein Genexpressions Panel (NanoString) designed, das sowohl die 13 proteinkodierenden Gene der mtDNA sowie weitere 180 Mitochondrien assoziierte nukleär kodierten Genen abdeckt. Durch eine Untersuchung der zuvor sequenzierten Proben soll eine mögliche Funktionalität der identifizierten Mutationen untersucht werden. Hierfür wurden bereits RNA-Proben extrahiert und erste Testreihen gestartet. Diese Versuchsreihe konnte aufgrund der COVID19 Restriktionen noch nicht abgeschlossen werden.

❖ ITH des Methylierungsstatus

In einer parallelen Versuchsreihe wurden intratumorale Unterschiede des Methylierungsstatus anhand derselben Kohorte untersucht (Kooperation mit der AG Sültmann, DKFZ). Es zeigte sich dabei, dass die Methylierungsprofile innerhalb eines Tumors nicht zwangsläufig ähnlich untereinander sind als zu Proben anderer Tumore, es also eine stark ausgeprägte intratumorale Heterogenität auf Methylierungs-Ebene in einigen Tumoren gibt. Weiter ergaben sich Hinweise darauf, dass Lymphknotenmetastasen einem relativ frühen Punkt in der Tumورprogression zuzuordnen sind. Die Ergebnisse dieser Studie wurde ebenfalls im letzten Jahr publiziert (Dietz et al. 2018; PMID: 3035086;7 International Journal of Cancer).

❖ ITH Immunhistologischer Marker

Zusätzlich zu den molekulargenetischen Aspekten wurde an dieser Kohorte die räumliche Verteilung und intratumorale Heterogenität weitere Biomarker (TTF-1; CD146, Kollagen 4, KI67, CD8, CD45) immunhistologisch untersucht. Die Präparate werden zurzeit digitalpathologisch ausgewertet und sollen mit den Daten der übrigen Arbeiten an dieser Kohorte korreliert werden. Die abschließende Analyse der Daten konnte auf Grund der COVID19-Restriktionen noch nicht vollendet werden (**LC-3.1**)

Untersuchungen zu klinisch relevanten Biomarker

❖ Untersuchungen zur panel-basierten Bestimmung der Tumormutationslast

Die Tumormutationslast wurde initial als die Anzahl der somatischen missense Mutationen beschrieben und durch Whole-Exome sequencing bestimmt. Da diese Methode mit relativ langen Analysezeiten und hohen Kosten verbunden ist, wurde für den breiten Einsatz in der klinischen Routinediagnostik nach alternativen Ansätzen gesucht. Mittlerweile sind mehrere kommerzielle Gen-Panel erhältlich, die anhand der Sequenzierung weniger hundert Gene eine Abschätzung der Mutationslast erlauben. Allerdings fehlte bisher eine detaillierte Bewertung der Gesamtleistung dieser Tests.

- **In 2020** wurde in einer Multizentrischen Studie die Leistung und Qualität von sechs verschiedenen Gentests an 20 Tumorproben überprüft und mit der Analysegenauigkeit

des WES-Verfahrens verglichen. Die Gewebeproben stammten von zehn Patienten mit Lungenkrebs, sieben Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und drei Patienten mit einer Darmkrebserkrankung. Jede Tumorseite wurde mit den sechs Gen-Panels und an 15 pathologischen Instituten mehr als 20 Mal getestet, was zu über 450 Datensätzen führte. Mit einer Übereinstimmung von 87,7 Prozent waren die Ergebnisse zwischen den Tests und den Zentren identisch. In 74,9 Prozent stimmten die Untersuchungsdaten aus den Mutli-Panel-Test mit den Analysen der WES überein. Die Studie hat gezeigt, dass man mit den untersuchten Gen-Panels die Tumormutationslast näherungsweise bestimmen kann und ein verlässliches Ergebnis erhält, um Patienten gezielt auswählen zu können, die von einer Immuntherapie profitieren könnten. Darüber hinaus konnten aber auch Störfaktoren identifiziert werden, die die Ergebnisse dieser Analysen in der täglichen Praxis beeinflussen. Hierzu gehören beispielsweise die Anzahl der Tumorzellen im Gewebeschnitt oder auch die Qualität der enthaltenen DNA. Die Studienergebnisse wurden im Journal of Thoracic Oncology publiziert (**Stenzinger et al. 2020; PMID: 32119917**). (LC-1.5/LC-IO)

- In einem weiteren Ansatz wurde ebenfalls **in 2020** der Einfluss potentieller Störgrößen auf die panel-basierte Bestimmung der Tumormutationslast quantifiziert. Wir betrachtete dabei unter anderem die "Panelgröße", "Keimbahnmutationsfilterung", "biologische Varianz" und "technische Varianz" und entwickelten für jeden dieser Faktoren ein spezifisches Fehlermodell. Veröffentlichte experimentelle TMB-Daten wurden an die Fehlermodelle angepasst, um den Beitrag der einzelnen Störfaktoren zu quantifizieren. Die gesamte TMB-Varianz wurde als Summe über die Varianzbeiträge der einzelnen Störfaktoren ermittelt. Es zeigte sich, dass selbst bei der Verwendung von "großen Panels" mit einer Größe von 1-1,5 Mbp die mit der Panelgröße verbundene stochastische Ungenauigkeit ein wichtiger Faktor für den gesamten TMB-Fehler, insbesondere bei Tumoren mit kleinen bis mittleren TMB, bleibt. Andere Fehlerquellen der TMB-Variabilität können durch strenge Qualitätskontrollen, Best-Practice-Labor-Workflows und optimierte Bioinformatik-Pipelines eingeschränkt werden. Diese Ergebnisse dieser Untersuchung wurden im letzten Jahr im Journal Lung Cancer publiziert (**Budczies et al. 2020, PMID: 32143116**). (LC-1.5/LC-IO)

❖ **Bedeutung spezifischer Genexpressionsprofile für das Ansprechen der Immun-Checkpoint-Blockade**

Die Immun-Checkpoint-Blockade erweitert heute die therapeutischen Optionen bei metastasiertem Lungenkrebs eine Standard-Frontline-Strategie als Mono- oder Kombinationstherapie, sowie eine Option bei treibermutierten NSCLC nach Ausschöpfung der zielgerichteten Therapien. Prädiktive Marker werden dringend benötigt, da nur eine

Minderheit der Patienten von der ICB profitiert, während schwerwiegende unerwünschte Wirkungen der Immunotoxizität auftreten können.

In 2020 untersuchten wir in einer Studie eine Kohorte bestehend aus 43 ICB behandelten metastasierten Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge, die ein langfristiges Ansprechen (n = 16), eine schnelle Progression (n = 21) oder ein intermediäres Ansprechen (n = 6) zeigten. Lungenbiopsien, die vor Beginn der ICB-Behandlung gewonnen wurden, wurden durch gezieltes mRNA-Expressionsprofilierung von 770 Genen analysiert. Wir konnten zeigen, dass gezielte mRNA Expressionsprofilierung in diagnostischen Routinebiopsien von metastasierten Lungenadenokarzinomen durchführbar ist. Wir bestätigen die Hypothese, dass Gensignaturen, die mit bestimmten Immunzelltypen - insbesondere B-Zellen und Makrophagen - in Verbindung stehen, zur Vorhersage des langfristigen ICB-Nutzens beitragen können. Die Ergebnisse wurden bereits in *Oncolmunology* publiziert (**Budczies et al. 2020; PMID: 33520406**). (LC-IO)

❖ Computergestützte Bestimmung des Tumorzellgehalts

Die exakte Bestimmung des Tumorzellgehalts in dem zu untersuchendem Probenmaterial ist für viele molekularbiologische Analysen (z. B. NGS) essentiell um aussagekräftige Ergebnisse ableiten und Fehlinterpretationen vermeiden zu können. Mittlerweile stehen verschiedene computergestützte Analysemethoden zur Verfügung („digitale Pathologie“; LC-3.1), die immun-/ histopathologische Auswertungen unterstützen und erweitern können. Diesbezüglich evaluierten wir in einer Studie **in 2020** die Konkordanz zwischen einer semi-automatisierten und der konventionellen Quantifizierung des Tumorzellgehalts in pulmonalen Adenokarzinomen anhand von jeweils 60 H&E- und TTF-1 gefärbten digitalisierten Schnittpräparaten. Für die digitalpathologische Auswertung wurden zwei Softwarelösungen eingesetzt: Das kommerziell erhältliche HALO (Indica Labs, Corrales, NM, USA) und das Opensource Programm QuPath (Bankhead et al. 2017). Die konventionelle Evaluation wurde über ein Web-Interface von 19 Teilnehmern aus 9 verschiedenen pathologischen Instituten durchgeführt. Die Berechnung der Intra-Klassen-Korrelation zeigte eine gute bzw. exzellente Konkordanz zwischen der semi-automatisierten digitalen Tumorzellquantifizierung und den Mittelwerten der konventionellen Abschätzungen für H&E- bzw. TTF1-gefärbte Schnittpräparate. Dabei waren die Abweichungen zwischen den beiden digitalpathologischen Programmen gering und signifikant kleiner als innerhalb der Gruppe der Teilnehmer. Hier kam es besonders bei H&E gefärbten Schnitten gehäuft zu einer Überschätzung des Tumorzellgehalts. Auch wurde mit der computer-gestützten Auswertung eine signifikant höhere Konsistenz mit einer mittleren Differenz von 1 % gegenüber 9 % für die konventionelle Evaluation erreicht. Die Ergebnisse werden derzeit zur Publikation vorbereitet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurden zur Publikation im *Journal Translational Lung Cancer Research* angenommen (Kazdal et al. 2021, accepted). (LC-3.1)

❖ Prognostische Bedeutung EML4-ALK Varianten

Circa 5% der metastasierten Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) sind auf das Vorliegen einer aktivierenden Genfusion der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) zurückzuführen. In der Routinediagnostik erfolgt die Identifizierung ALK-positiver Tumoren meist mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bzw. einer immunhistochemischen Färbung. Diese Methodik gewährt allerdings, im Gegensatz zu einem auf „Next-generation sequencing“ basierenden Nachweis, keinen Einblick in die große genetische Heterogenität dieser NSCLC-Subgruppe, die sich aus verschiedenen Fusionsvarianten und einer Vielzahl unterschiedlicher Co-Mutationen zusammensetzt. Dieser Heterogenität führt zu extrem komplexen und mehrstufigen Behandlungsstrategien für Patienten mit ALK-positiven NSCLC.

Ziel dieser Arbeitsreihe ist es, durch die Korrelation klinischer Daten und einer umfassenden molekulargenetischen Analyse therapeutisch relevante molekulare Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren, um so eine optimierte und individualisierte Behandlung von Patienten mit ALK-positiven NSCLC zu ermöglichen.

In Kooperation mit der Thoraxklinik Heidelberg (u.a. P. Christopoulos und M. Thomas) untersuchten wir eine große Kohorte Patienten mit ALK-positivem NSCLC, die sich aus allen routinemäßigen angewandten Therapie-Formen zusammensetzte und über die klinische Daten verfügbar waren, die Aussagen zum Gesamtüberleben zuließen. Die molekulargenetische Analyse der Tumoren erfolgte dabei auf RNA- und DNA-Ebene durch den Einsatz proprietärer „Next-generation sequencing“ Ansätze. Dies ermöglichte die Identifizierung der jeweiligen EML4-ALK Fusionsvariante (Begrenzung auf V1-3) sowie des Vorhandenseins von Co-Mutationen in 39 tumorassoziierten Markergenen.

Folgende Erkenntnisse konnten erarbeitet werden:

- Tumoren mit der *EML4-ALK* Fusionsvariante V3 zeigten eine verstärkte Metastasierung und eine verringerte Gesamtüberlebenszeit der betroffenen Patienten. Dabei war die Responsivität gegenüber ALK-TKIs, sowie allen anderen untersuchten Therapien verkürzt.
- Mutationen im Tumorsuppressor-Gen *TP53* traten in 15-20 % der ALK-positiven Tumore unabhängig von der ALK Fusionsvariante auf und konnten mit einem verkürzten TKI-Ansprechen und verkürzter Gesamtüberlebenszeit assoziiert werden. Es zeigte sich allerdings kein Einfluss auf das Ansprechen auf eine Chemotherapie. Bei Tumoren mit einer *EML4-ALK* Fusionsvariante V3 führte das Auftreten einer *TP53* Co-Mutation synergetisch zu einer weiteren Reduzierung der TKI-Responsivität und der Gesamtüberlebenszeit, so dass diese Patienten-Gruppe als Hochrisiko Gruppe einzustufen ist.

- Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer *TP53*-Mutation unter Therapie mit vergleichbar negativen Auswirkungen auf die Prognose des Gesamtüberlebens assoziiert ist, wie eine bereits vor Therapie vorhandene *TP53*-Mutation.

Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert (4x Christopoulos et al. 2018 PMID: 29363116; PMID: 30023099; PMID: 30255938; PMID: 30669647) (**LC-F3**).

❖ Untersuchung von Flüssigbiopsien zur Erkennung von Therapieversagen Resistenzmechanismen bei ALK-verändertem Lungenkrebs

- In einem Case Report berichteten wir über den Fall eines KLC1-ALK-rearrangierten NSCLC-Patienten, der auf eine Crizotinib-Behandlung ansprach, und zeigen, wie die Analyse von Plasma- und Serum-Biomarkern zur Identifizierung des ALK-Fusionspartners und zur Überwachung der Therapie im Zeitverlauf eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der ctDNA-Sequenzierung und des Copy-Number-Alteration-Profilings sowie die Serumproteinkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Therapie spiegelten den aktuellen Remissionsstatus wider und konnten den weiteren klinischen Verlauf vorhersagen. Zum Zeitpunkt der Krankheitsprogression identifizierten wir in der ctDNA vier verschiedene sekundäre Mutationen im ALK-Gen, die möglicherweise zu einem Therapieversagen führten, begleitet von steigenden CEA- und CYFRA 21-1-Konzentrationen. Darüber hinaus wurden am Ende der Behandlung mehrere Kopienzahl-Variationen festgestellt, darunter eine Amplifikation einer Region auf Chromosom 12, die den TP53-Regulator MDM2 umfasst. Zusammenfassend veranschaulichen unsere Ergebnisse den Nutzen der nicht-invasiven longitudinalen molekularen Profilerstellung für die Beurteilung des Remissionsstatus, die Erforschung von Mechanismen des Behandlungsversagens, die Vorhersage des nachfolgenden klinischen Verlaufs und die Entschlüsselung der Dynamik von medikamentenresistenten Klonen bei ALK+-Lungenkrebs. Diese Daten wurden in Spring Harbor Molecular Case Studies publiziert (Dietz et al. 2019; PMID: 31753813). (**LC-2.2**)
- Zielgerichtete Therapien (TKI) haben die Prognose des ALK-rearrangierten Lungenkarzinoms (ALK+ NSCLC) verbessert, aber die klinischen Verläufe sind sehr unterschiedlich. Die frühzeitige Identifizierung und molekulare Charakterisierung eines Therapieversagens ist für nachfolgende Therapien von zentraler Bedeutung. In dieser Versuchsreihe wurden **in 2020** Copy Number Variation (CNV)-Profiling und gezielte Panel-Sequenzierung aus zellfreier DNA (cfDNA) zur Überwachung von ALK+ NSCLC in 271 longitudinale Plasma-DNA-Proben von 73 Patienten TKI-behandeltem metastasiertem ALK+ NSCLC durchgeführt. cfDNA-Mutationen wurden bei 58 % der Patienten identifiziert. Darunter befanden sich mehrere potenziell verwertbare Veränderungen, z. B. in den Genen BRAF, ERBB2 und KIT. sWGS wies CNVs in 18 % der Proben nach, verglichen mit 6

% bei der gezielten Sequenzierung. Mehrere der CNVs beinhalteten potenziell medikamentöse Targets, wie z. B. Regionen, die EGFR, ERBB2 und MET beherbergen. Mutationen der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA) und t-MAD-Scores stiegen während der Behandlung an, korrelierten mit Markern eines höheren molekularen Risikos, wie der EML4-ALK-Variante 3 und/oder TP53-Mutationen, und waren mit einem kürzeren Überleben der Patienten verbunden. Das kombinierte Kopienzahl- und gezielte Mutationsprofiling könnte also die Überwachung von ALK+ NSCLC verbessern. Zu den potenziellen Vorteilen gehören die Identifizierung von Therapieversagen, insbesondere bei Patienten ohne nachweisbare Mutationen, und eine breitere Erkennung von genomischen Veränderungen, die während der Therapie erworben wurden, insbesondere in späteren Behandlungslinien und bei Hochrisikopatienten. Die Ergebnisse wurden in EBioMedicine publiziert (Dietz et al. 2020, PMID: 33161228). (LC-2.2)

❖ Immunhistologische Untersuchung der Expression von Glycodelin

In Kooperation mit dem Sektionstranslationale Forschung der Thoraxklinik wurden 2018 Tumorsegmente verschiedener Tumore mit Glycodelin und Immunzellen angefärbt. Die Segmente sind Teil großer Tumore, die systematisch in kleinere Segmente unterteilt wurden. Leider führte die grundsätzlich starke Autofluoreszenz des Lungengewebes dazu, dass die Untersuchung der Koexpression von Glycodelin und Immunzellen mittels Immunfluoreszenz kaum möglich war. Auch unter Verwendung verschiedener "Quenching"-Kits konnte die Autofluoreszenz nicht vermindert werden, ohne die Färbung sehr stark abzuschwächen. Daher wird aktuell ein Ko-Färbekit für die Immunhistochemie getestet. Ziel soll es sein, die gesamten Tumore mit Glycodelin und Immunzellen zu färben, um zu untersuchen, wie und ob die Verteilung von Glycodelin die Immunzellzusammensetzung beeinflusst. Die Auswertung der Schnitte erfolgt dabei mit der Software QuPath. Es wurden verschiedene weitere IHC-Kofärbekits getestet, um die Glycodelin-Expression gemeinsam mit CD4+ und CD8+-Zellen in NSCLC-Patienten zu untersuchen und auszuwerten. Aktuell läuft noch die Austestung und Validierung verschiedener Antikörper und Konzentrationen. Wenn diese abgeschlossen sind, werden NSCLC-TMAs gefärbt und mittels QuPath ausgewertet. In 2020 zeigte sich, dass leider keins der verwendeten Kits geeignet war, um in der IHC Kofärbungen mit Glycodelin und Immunzellen ausreichend gut darzustellen, um diese Färbungen mittels digitaler Pathologie auszuwerten. (LC-3.1).

❖ Regulation der Extrazellulären Matrix durch TGF-β

TGF-β1 reguliert die Architektur und den Abbau der extrazellulären Matrix, indem es die Expression vieler Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen reguliert. In Kooperation mit der AG Klingmüller (DKFZ, TLRC) wurde versucht, in diesem Zusammenhang die Rolle der Fibroblasten und der extrazellulären Matrix in der Tumorentstehung und

Proliferation zu untersuchen. Hierfür wurden der AG immunhistologische Schnittpräparate eines Kollektivs pulmonaler Adenokarzinome, die gegen Kollagen IV angefärbt worden waren zur Verfügung gestellt. Nach umfangreicher Aufarbeitung und Beurteilung, wurden die Gewebestücke so ausgewählt, dass jeweils vergleichbare Areale eines jeweiligen Tumors und korrespondierendem Normalgewebe auf einem Schnittpräparate vorhanden waren, um so den direkten Vergleich in einer Färbung zu ermöglichen. In ersten Analysen zeigten sich hier deutlich stärkere Kollagen IV Färbungs-Intensitäten im nicht-neoplastischen Bereich verglichen zum tumortragenden Gewebe. Eine detaillierte abschließende Analyse der Ergebnisse wird der Zeit durchgeführt. (LC-F1)

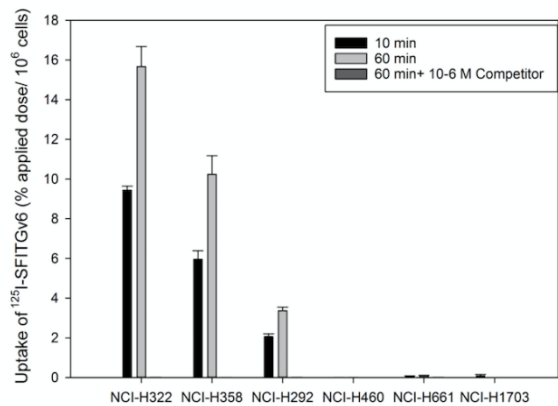
Arbeitsgruppe Professor Uwe Haberkorn

LC-3.1 Weiterentwicklung der digitalen Pathologie und neuartige Bildgebungsverfahren zur Überwachung des Tumorzellkompartiments und der entsprechenden Immunzellzusammensetzung

Identifizierung eines peptidischen Liganden für $\alpha\beta6$ Integrin

Mittels Phagen Display konnten wir ein Peptid identifizieren, das $\alpha\beta6$ Integrin erkennt. Die verwendete Phagen Display Bibliothek basiert auf SFTI (sunflower trypsin inhibitor), einem Trypsin-Inhibitor, der im Sonnenblumenkern vorkommt und für die Bibliothek mit 6 bzw. 8 randomisierten Aminosäuren versehen wurde. Das identifizierte Peptid wurde zunächst mit I-125 markiert, anschließend nach Kopplung von Chelatoren wie HBEDCC und DOTA mit Ga-68 markiert. Eine nähere Charakterisierung dieses Peptids zeigte eine sehr gute Bindung und Internalisierung (bis 37% der gebundenen Aktivität) an HNO-Tumorzellen, Lungentumorzellen und Blasenkarzinomzellen. Der mittels Plasmonen-Oberflächenresonanz gemessene KD-Wert lag bei 10 nM. Weiterhin weist das Peptid eine exzellente Plasmastabilität auf: kein Abbau nach 24 Stunden. Dies konnte in der Kleintierbildgebung und der anschließenden Bioverteilung an tumortragenden Tieren weiter verifiziert werden.

Für das Integrin Projekt wurden 11 Lungenkarzinom-Linien mittels FACS auf eine Expression von $\alpha\beta6$ Integrin untersucht. Ferner erfolgten in vitro Experimente, die die Bindung des $\alpha\beta6$ Peptids quantitativ erfassten. Dabei zeigten drei der untersuchten Zell-Linien eine sehr gute Bindung des Liganden. Diese wurden dann in weiteren Experimenten an tumortragenden Tieren untersucht.



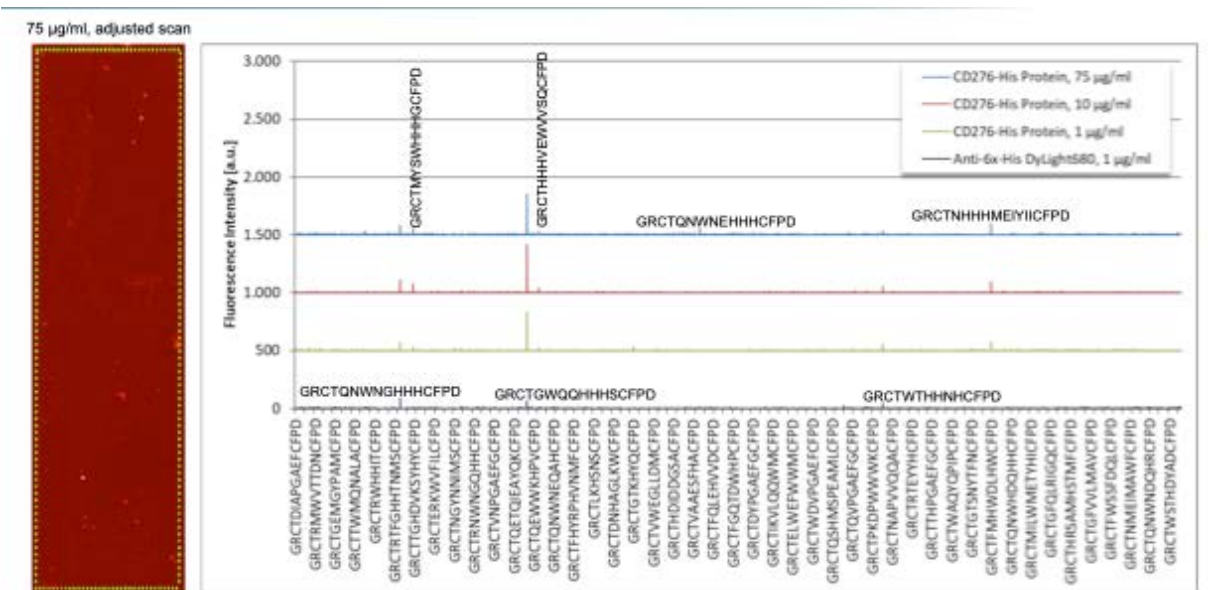
Bindung des radioaktiv markierten Peptids an Lungenkarzinom-Zellen: das Peptid bindet sehr gut an $\alpha\beta6$ Integrin-positive Zellen, aber nicht oder nur sehr schwach an $\alpha\beta6$ Integrin-negative Zellen.

CD276/B7-H3 als Zielstruktur für die Identifizierung von Peptiden

Weiterhin konnte mittels Ribosomen Display ein peptidischer Ligand gegen CD276/B7-H3 identifiziert werden. Dieser Ligand musste zunächst einer Affinitätsreifung unterzogen werden. Dies geschah durch den Aufbau einer Affinitätsbibliothek, welche die Aminosäuren, die für die Bindung an die Zielstruktur verantwortlich sind, randomisiert. Dabei wurde der Sequenzraum der Bibliothek so definiert, dass jedes 10000ste Peptid die Originalsequenz aufweist. Damit konnte in Zellkulturversuchen IC₅₀-Werte zwischen 75 und 185 nM erreicht werden. Das Peptid muss somit noch weiter bezüglich seiner Affinität optimiert werden. Parallel wurden Klonierungsarbeiten für die Herstellung der rekombinanten extrazellulären Domäne von B7-H3 vorgenommen und das rekombinante Protein produziert und aufgereinigt. Damit sollen nun weitere Bio-Panning Runden mit Phagen und Ribosomen Display für die Identifizierung weiterer Peptide erfolgen.

Mittels Phagen Display wurde ein erneutes Biopanning gegen rekombinantes B7-H3 durchgeführt. Dabei konnten 27 Peptide auf der Basis der Gerüststruktur Min23 aus Ecballium Elaterium identifiziert werden. Nach Synthese und Radioaktivmarkierung erfolgte ein Screening bezüglich der Bindungseigenschaften in der Zellkultur. Dieses Screening ergab leider keine Bindung für die neu identifizierten Peptide.

Um weitere Liganden in einem Hochdurchsatzverfahren zu testen, wurden 5200 Aminosäure-Sequenzen auf einen Peptidarray gedruckt und mit dem zuvor rekombinant hergestellten Zielprotein (extrazelluläre Domäne von CD276 mit His-tag) hybridisiert. Anschließend erfolgte die quantitative Analyse mit einem PepSlide Analyzer der Firma Pepperprint.



Spot Family	Row	Column	Peptide	CD276-His Protein, 1 µg/ml	CD276-His Protein, 10 µg/ml	CD276-His Protein, 75 µg/ml	Anti-6x-His DyLight580, 1 µg/ml
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	43	22	GRCTGQQHHHSCFPD	334.5	417.0	354.0	65.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	126	8	GRCTNHHHMEIYICFPD	99.0	98.5	98.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	21	27	GRCTQNWNEHHHCFPD	71.0	112.5	84.0	88.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	73	14	GRCTQNWNEHHHCFPD	0.0	0.0	59.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	24	6	GRCTMYSWHHHGCFPD	30.0	78.0	52.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	106	13	GRCTNHHHMEIYICFPD	60.0	56.0	36.0	44.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	15	18	GRCTSHGGFEYRICFPD	0.0	0.0	32.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	45	31	GRCTNHHHMEIYICFPD	24.0	42.0	30.0	7.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	134	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	24.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	160	7	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	23.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	83	9	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	22.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	70	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	1.5	21.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	79	18	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	21.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	6	19	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	12.0	20.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	129	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	20.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	3	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	19.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	19	7	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	9.0	19.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	72	27	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	1.5	19.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	64	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	17.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	69	58	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	17.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	5	22	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	4.0	16.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	34	13	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	15.5	16.5	1.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	60	24	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	16.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	80	56	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	16.5	7.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	33	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	10.0	17.0	16.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	39	25	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	16.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	46	15	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	16.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	91	10	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	14.0	16.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	152	12	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	16.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	155	10	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	16.0	4.5
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	48	7	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	15.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	69	4	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	15.5	6.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	90	8	GRCTNHHHMEIYICFPD	8.5	13.5	15.5	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	19	9	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	15.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	31	4	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	15.0	3.5
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	99	52	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	15.0	7.5
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	100	9	GRCTNHHHMEIYICFPD	7.0	7.0	15.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	142	9	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	6.0	15.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	142	13	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	0.0	15.0	0.0
CD276, 14-18 aa Disulfide Cyclized Peptides (PEP20185101050)	23	10	GRCTNHHHMEIYICFPD	0.0	4.5	14.5	0.0

Danach wurden die Interaktionen des rekombinanten CD276-His unter Verwendung verschiedener Konzentrationen (1 µg/ml, 10 µg/ml und 75 µg/ml) nach absteigender Intensität geordnet und mit dem Untergrundsignal verglichen. Die intensivsten Interaktionen wurden dabei den folgenden Peptiden zugeordnet: GRCTNHHHMEIYICFPD, GRCTQNWNEHHHCFPD, GRCTMYSWHHHGCFPD und GRCTSHGGFEYRICFPD. Da alle Peptide eine hohe Anzahl von Histidinen aufwiesen, wurden diese nicht getestet.

Peptide gegen GDF-15

Da das Projekt mit CD276 nicht zu dem gewünschten Erfolg führte, wurde an der Identifizierung eines Liganden gegen den growth differentiation factor 15 (GDF15)/macrophage inhibitory cytokine 1 (Mic-1) gearbeitet. Der Precursor des Proteins reichert sich im Interzellulärraum von Tumoren an und könnte als Zielstruktur für die Tumorbildgebung dienen. Dazu wurde zunächst rekombinantes Protein für GDF15 und den Precursor für GDF15 durch Transfektion von HEK-flipin Zellen hergestellt. Ferner wurden rekombinante Zell-Linien mit Expression von GDF-15 etabliert. Diese wurden für Phage und Ribosome Display genutzt. Herstellung von rekombinanten Zell-Linien: es wurden CHO, HEK, MH3924A (Morrishepatom der Ratte) und NIH3T3 Linien transfiziert.

In 2020 erhaltene Ergebnisse

Peptid array Pepperprint: Ein PEPperMAP® Peptid Screening gegen das humane GDF15-PP-His Protein wurde gegen 8290 zyklisierte Peptide durchgeführt, die als Doppel Spots auf zwei Peptid-Microarrays gedruckt wurden. Dies Microarrays wurden dann mit dem rekombinanten GDF15 inkubiert und die Bindung mit einem PepSlide® Analyzer gemessen.

Eine Färbung mit Kontrolle und Sekundärantikörpern ergab einen niedrigen Untergrund mit Histidine-reichen Peptiden wie GRCTMRVHHHMTCFPD, GRCTRANKHHHECFPD oder GRCTHGHHHQCYPD, dies wahrscheinlich aufgrund Sequenzähnlichkeiten mit dem verwendeten 6xHis tag. Die Positivmessung mit dem **humanen GDF15-PP-His** Protein zeigte ein komplexes Interaktionsmuster mit mehreren zyklisierten Peptiden mit eher moderaten Spot-Intensitäten und auch moderatem Signal-zu-Rauschen Verhältnis. Die besten Interaktionen waren für die Peptide GRCTQEDEEECFPD, GRCTSEWYEEDQCFPD, GRCTDNTEEYIECFPD, GRCTSQEEDYTDCYPD, GRCTQSDRYEECFPD und GRCTDNTEEYTDYPD zu beobachten. Alle Toppeptide im Mikroarray wiesen eine hohe Häufigkeit an sauren Aminosäuren wie D, E und Y auf.

Eine MEME Analyse der Top 50 Interaktionen ergab zwei verschiedene gemeinsame Motive: das Top DNTEEYI Motiv wies eine sehr hohe statistische Signifikanz von $E = 1.1e-023$ mit 12 Treffern unter den 50 Toppeptiden und eine Länge von 7 Aminosäuren auf. Das zweite ¹VDEEVY⁶ Motiv hatte ebenfalls eine hohe statistische Signifikanz von $E = 2.9e-008$ mit 18 Treffern unter den Top 50 Peptiden, jedoch auch einen niedrigen Grad an Sequenzkonservierung an den meisten Aminosäurepositionen. Daher wurde angenommen, daß es sich hier nur um Variationen des DNTEEYI Motiv handelt.

DISCOVERED MOTIFS

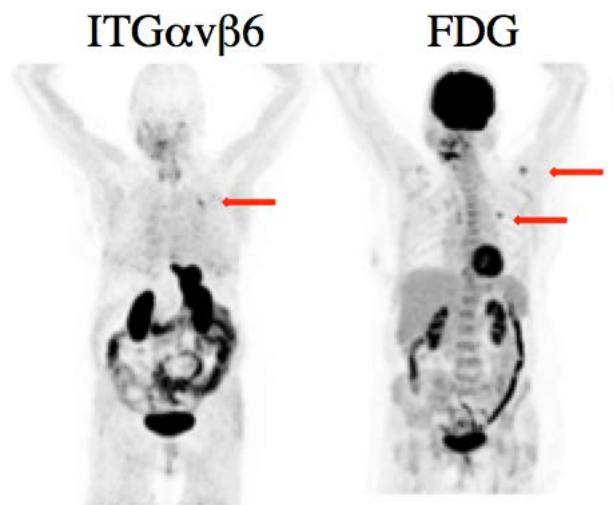
	Logo	E-value ?	Sites ?	Width ?	More ?	Submit/Download ?
1.		1.1e-023	12	7	↓	...→
2.		2.9e-008	18	6	↓	...→
3.		9.1e+000	2	4	↓	...→
4.		7.0e+001	2	5	↓	...→
5.		1.9e+002	2	4	↓	...→
Stopped because requested number of motifs (5) found.						

Es ist jedoch zu bemerken, dass die TOP-Peptide in der Liste GRCTQEEDEEECFPD, GRCTSEWYEEDQCFPD, GRCTSQEEDYTDCFPD und GRCTQSDRYEECFPD das DNTEEYI Motiv nicht enthielten. Dabei kann die hohe Frequenz der sauren Aminosäuren D und E im Toppeptid GRCTQEEDEEECFPD als Hinweis dafür gesehen werden, dass ionische Interaktionen zur Proteinbindung beitragen.

LC-3.6 Erforschung neuartiger funktioneller Bildgebung (PET-basiert) in präklinischen Modellen und klinischen Demonstratorfällen zur Charakterisierung von Tumorkompartimenten und Nachverfolgung von Veränderungen zur Vorhersage der Wirksamkeit/Nicht-Wirksamkeit innovativer Therapien

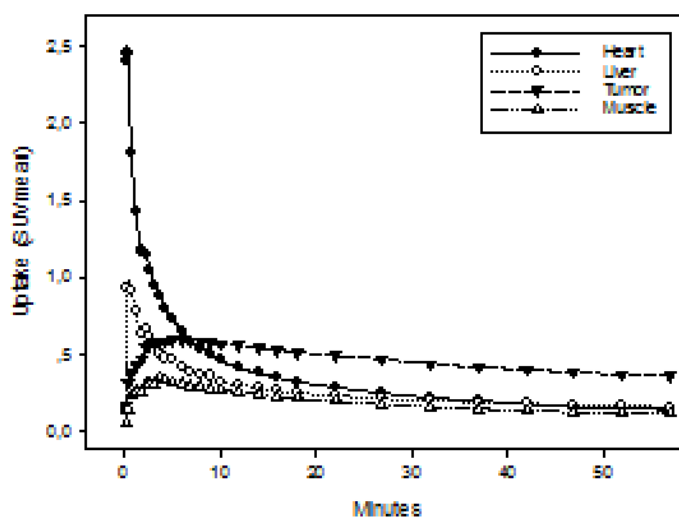
Identifizierung eines peptidischen Liganden für $\alpha v \beta 6$ Integrin

Wie unter LC-3.1 dargestellt wurden die $\alpha v \beta 6$ Integrin Peptide bereits im Tier evaluiert. Ebenso fand bereits eine erste Anwendung an Patienten statt. Hier erhielten zunächst 8 Patienten mit Lungentumoren sowohl eine PET/CT mit FDG, dem Standardtracer für Primärdiagnostik und Staging, als auch mit dem $\alpha v \beta 6$ Integrin bindenden Peptid: mit beiden Tracern konnte der Primärtumor dargestellt werden. Unterschiede gab es bei mediastinalen Lymphknoten und Entzündungsherden. FDG zeigte eine Anreicherung in Entzündungsherden, das $\alpha v \beta 6$ Integrin bindende Peptid dagegen nicht. Dies zeigt, dass das Peptid spezifischer ist als FDG. Bei einigen mediastinalen Lymphknoten war das FDG PET/CT positiv, während das Integrin PET/CT negativ war.

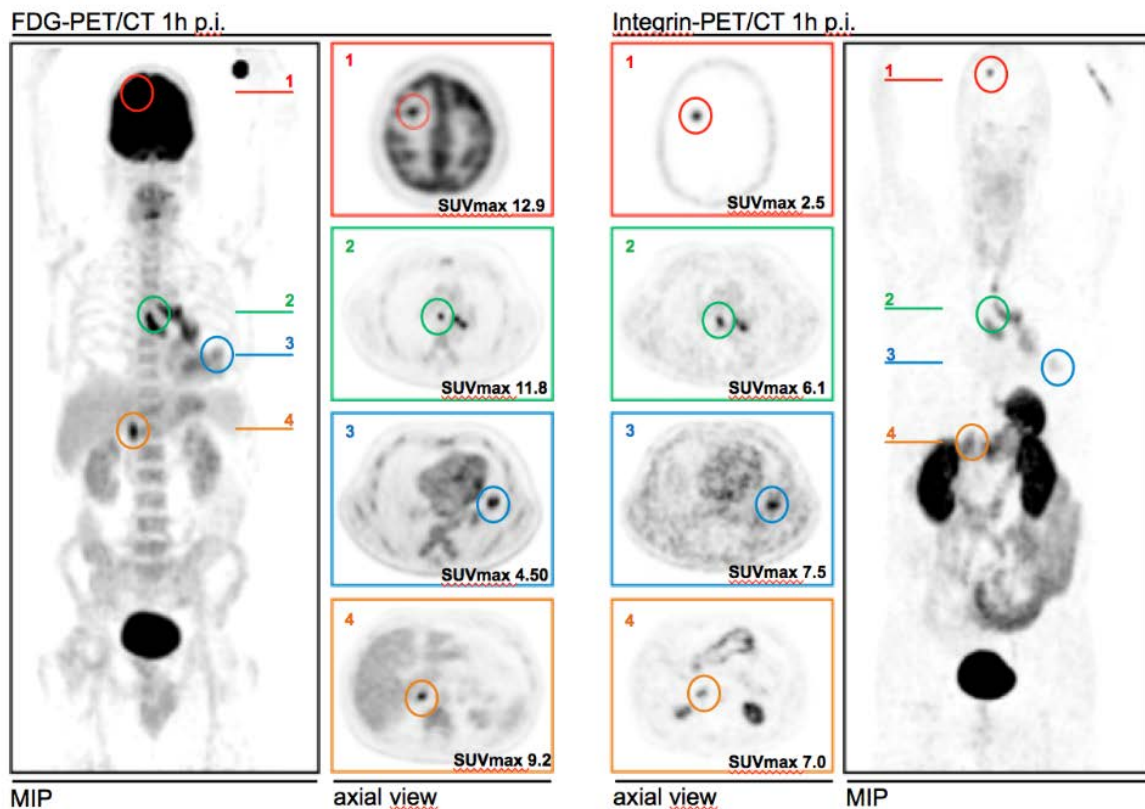


Patient mit Lungentumor: links Integrin PET/CT, rechts FDG PET/CT. Die roten Pfeile markieren den Tumor, sichtbar bei beiden Scans, und die Entzündung in der linken Schulter, sichtbar nur im FDG PET/CT.

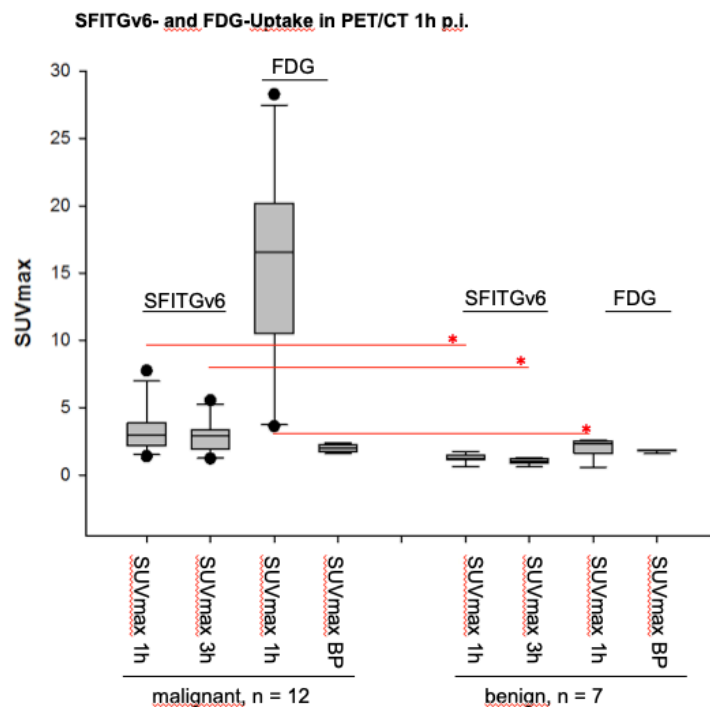
Ferner wurden die unter LC1.3 beschriebenen Lungenkarzinom-Zell-Linien in Nacktmäuse transplantiert und danach Kleintier PET Aufnahmen mit ^{68}Ga -markiertem Peptide gegen das $\alpha v \beta 6$ Integrin angefertigt. Die Abbildung zeigt eine typische Zeit-Aktivitätskurve in Herz, Leber, Muskel und Tumor. Diese tierexperimentellen Analysen machen einen ausreichend hohen Kontrast zwischen Tumor und Normalgewebe beim Patienten wahrscheinlich.



Ein weiteres Beispiel für die Vorteile der $\alpha\beta6$ Integrin PET gegenüber der FDG PET ist in der folgenden Abbildung gezeigt.



Das Peptid mit hoher Affinität zu $\alpha\beta6$ Integrin wurde in einer Reihe von Patienten eingesetzt, um zwischen benignen und malignen Läsionen zu unterscheiden. [^{68}Ga]SFITGv6 wurde bei NSCLC Patienten mit unklarer Diagnose zusätzlich zu der routinemäßig durchgeführten PET mit [^{18}F]FDG durchgeführt. Ferner wurde eine Bioverteilung des SFITGv6-Liganden in unterschiedlichen Organen und Tumorerläsionen nach 1 h und 3 h p.i. vorgenommen.



Bioverteilung des SFITGv6-Liganden 1h und 3h p.i.. Eine hohe Anreicherung des Radiopharmakons wurde in den Nieren und dem Darm gefunden, bei nur geringer Aufnahme in den anderen parenchymalen Organen, insbesondere in der Leber und dem Hirn. Dies kann sich bei der Suche nach Leber- oder Hirnmetastasen als nützlich erweisen.

Im Allgemeinen zeigten die [^{18}F] FDG und [^{68}Ga]SFITGv6 PET/CT Aufnahmen jedoch korrespondierende Bilder. Ein Vergleich der Tracer Aufnahme bei [^{68}Ga]SFITGv6 versus [^{18}F] FDG ergab eine deutlich erhöhte Anreicherung für beide Radiopharmaka in histologisch gesicherten NSCLC Läsionen mit höheren Werten für [^{18}F] FDG. Ein klarer Vorteil für SFITGv6 konnte trotz exzellenter Affinität und Spezifität des des Liganden in $\alpha_v\beta_6$ Integrin-exprimierenden NSCLC Zell-linien und NSCLC xenograft Modellen nicht gezeigt werden. Diese Daten wurden von Molecular Imaging and Biology zur Publikation angenommen (Flehsig P, Lindner T, Loktev A, Roesch S, Mier W, Sauter M, Meister M, Herold-Mende C, Haberkorn U, Altmann A. PET/CT Imaging of NSCLC with a $\alpha_v\beta_6$ Integrin-Targeting Peptide. Mol Imaging Biol. 2019;21:973-983).

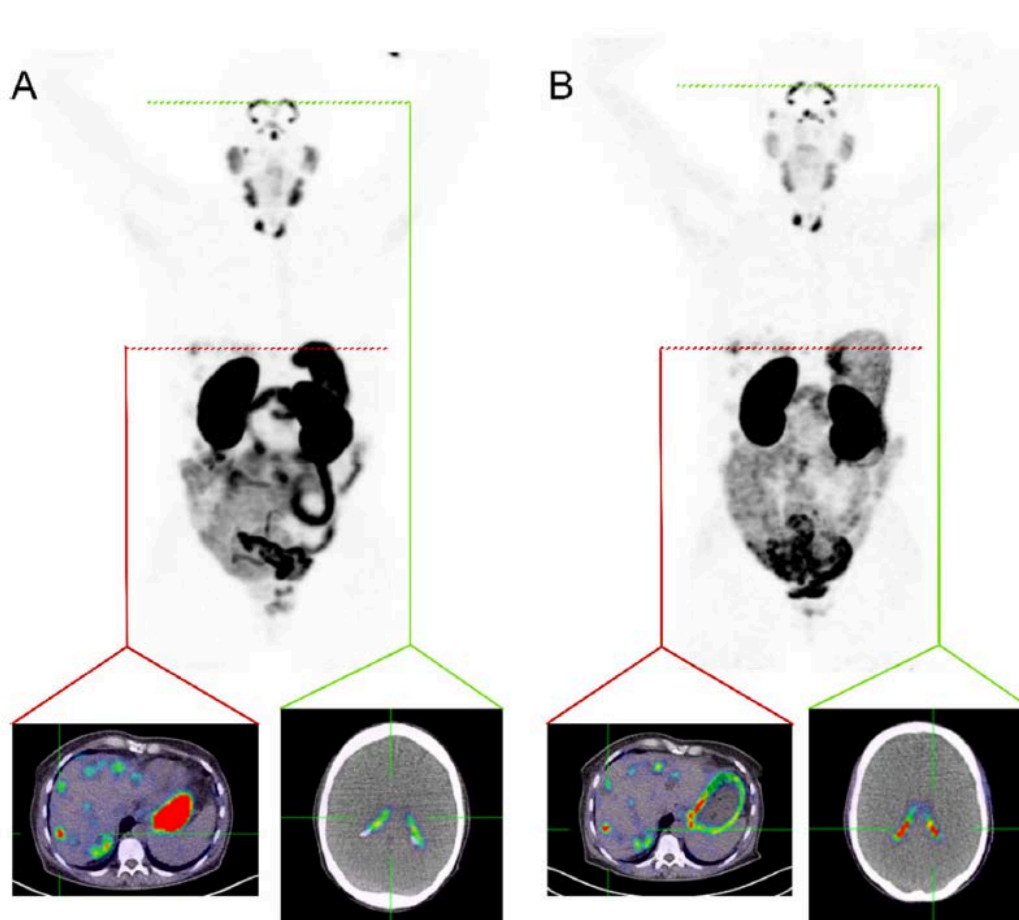
Modifikation des Integrin $\alpha_v\beta_6$ Liganden

SFLAP3, ein zuvor modifiziertes und gegen HNO-Tumore charakterisiertes Integrin $\alpha_v\beta_6$ -Integrin bindendes Peptid, wurde auf seine Bindungseigenschaften gegen viele verschiedene Zelllinien getestet. Die höchsten Zellbindungsraten konnten an Pankreaskarzinom-Zelllinien erzielt werden. In Kleintier-PET-Aufnahmen konnte eine starke Akkumulation des DOTA-Derivats des SFLAP3-Peptids im Capan-2-Tumor beobachtet werden. In einem Pankreaskarzinom-Patienten und in drei Ovarialkarzinom-Patientinnen, welche sich im

Endstadium ihrer Erkrankung befanden, konnte mithilfe der PET eine Akkumulation von DOTA-SFLAP3 in den Metastasen detektiert werden. Diese Akkumulationen wiesen auf einen möglichen Einsatz von SFLAP3 in der Endoradiotherapie hin. Therapieversuche mit therapeutischen Mengen des ¹⁷⁷Lu-markierten DOTA-SFLAP3 zeigten jedoch keine klinische Wirksamkeit.

Um die Affinität von DOTA-SFLAP3 zu verbessern, wurden Änderungen der Bindesequenz und eine Trimerisierung des Peptids vorgenommen. Die Peptidvarianten DOTA-SFLAP3K und das DOTA-SFLAP3-Trimer zeigten – im Vergleich zu DOTA-SFLAP3 – in vitro verbesserte Bindungseigenschaften. In Kleintier-PET-Aufnahmen wurde durch DOTA-SFLAP3K eine leicht erhöhte Tumorakkumulation, welche mit einer erhöhten Nierenanreicherung korrelierte, beobachtet. Trotz einer 10-fachgesteigerten Affinität konnte mit dem Trimer weder im Tumor-Tiermodell noch in einer Ovarialkarzinom-Patientin eine verbesserte Anreicherung erzielt werden.

Das Peptid SFLAP3 diente als Vorlage für weitere Modifikationen. Weder Veränderungen der terminalen Enden noch der Position des Chelators (Kopplung über die Seitenkette eines Lysins), erbrachten die erhofften positiven Auswirkungen auf die Pharmakokinetik. Mit SFLAP3-NH₂-DOTA, einem Derivat, bei dem der Chelator über einen Linker C-terminal an das Peptid konjugiert wurde, konnte die höchste Tumorakkumulation aller SFLAP3-Varianten erzielt werden. Die zusätzliche N-terminale Konjugation der Albumin-bindenden (4-Iodphenyl)-Essigsäure verlängerte die Zirkulation von SFLAP3-NH₂-DOTA im Blut, was zugleich zu einer Reduktion der Nierenaufnahme führte. Diese Ergebnisse belegen, dass das Potenzial des SFLAP3-Motivs für mögliche diagnostische und therapeutische Einsätze durch weitere Modifikationen erhöht werden kann.

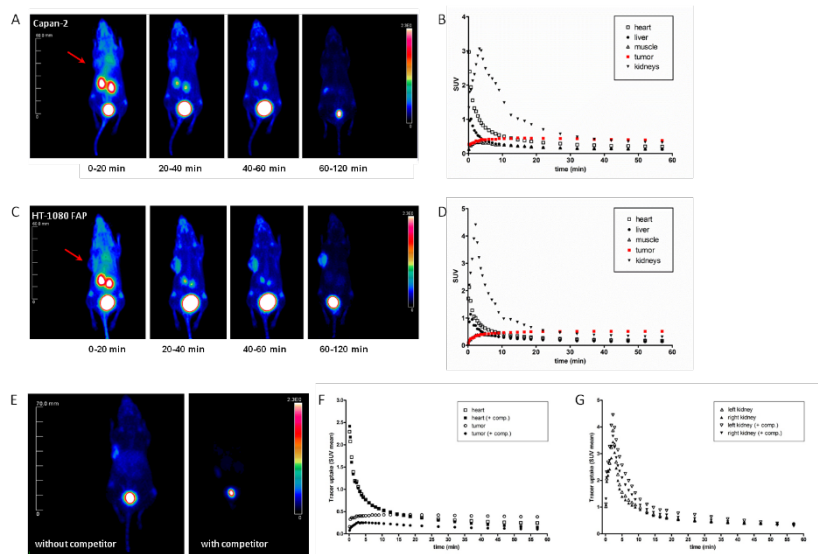


Ganzkörper-MIP (maximum intensity projection) und transaxiale Schnitte 1 Stunde (A) und 3 Stunden (B) nach Administration von ^{68}Ga -DOTA-SFLAP3-Trimer (Patientin mit Ovarialkarzinom). Der transaxiale Schnitt durch die Lebermetastase ist in Rot, die durch den Plexus choroideus in Grün gezeigt.

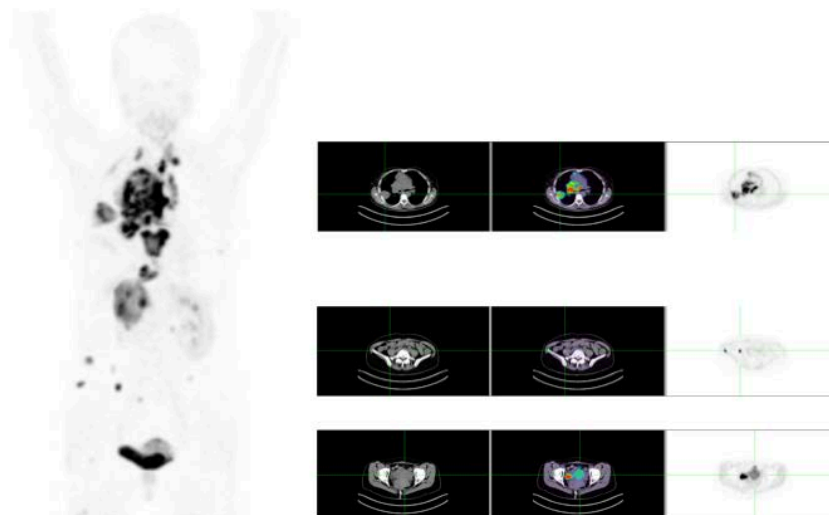
Müller M, Altmann A, Sauter M, Lindner T, Jäger D, Rathke H, Herold-Mende C, Marmé F, Babich J, Mier W, Haberkorn U. Preclinical evaluation of peptide-based radiotracers for integrin $\alpha\beta 6$ -positive pancreatic carcinoma. *Nuklearmedizin*. 2019;58:309-318.

Entwicklung eines radioaktiv markierten Inhibitors gegen das Fibroblast activation protein (FAPI)

Ein weiteres Projekt befasste sich mit der Darstellung von aktivierten Fibroblasten in Tumoren. Diese weisen oft eine hohe Expression des fibroblast activation Protein (FAP) auf, ein membranständiges Enzym mit Dipeptidyl Peptidase und Endopeptidase Aktivität. Daher wurden 'small molecule' Inhibitoren radioaktiv markiert und auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Die Moleküle zeigten eine rasche renale Elimination mit ebenso schneller Anreicherung in einer Vielzahl von Tumoren, darunter auch Lungentumoren (Lindner et al., 2018; Loktev et al., 2018).

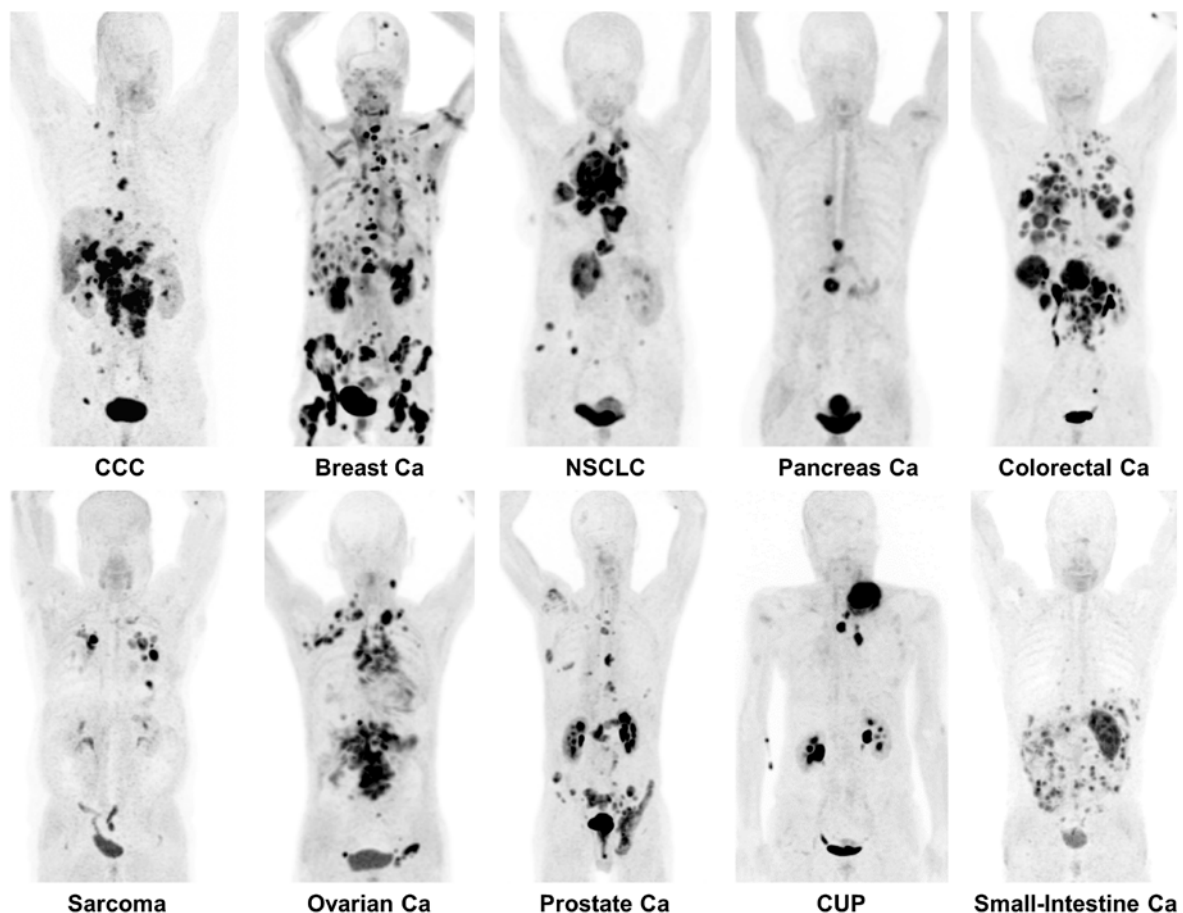


Aufnahmen im Tier-PET mit Zeit-Aktivitätskurven bei einem Pankreaskarzinommodell (A und B) und einem Gentechnisch veränderten Tumor mit hoher FAP-Expression (C und D). E bis G zeigen den Effekt einer Kompetition mit nicht-radioaktivem small molecule Inhibitor. Durch Zugabe von nicht-radioaktivem FAPI kann die Tumoraufnahme vollständig gehemmt werden. Dies belegt die Spezifität der Bindung und Aufnahme von FAPI. Ferner zeigen die Zeit-Aktivitätskurven der Nieren eine rasche Elimination des Tracers, was einen niedrigen Untergrund zur Folge hat.



Anwendung von FAPI bei einer Patientin mit NSCLC eine Stunde nach Applikation von FAPI04. Auf der MIP (Maximal Intensity Projection) sind Tumor und Metastasen mit sehr gutem Kontrast dargestellt. Physiologische Anreicherung ist im Uterus zu finden. Ferner sind noch das Nierenkelchsystem und die Harnblase zu sehen.

Bei 80 Patienten mit 28 verschiedenen Tumorentitäten (54 Primärtumoren und 229 Metastasen) wurden PET Messungen mit FAP Inhibitoren (FAPIs) vorgenommen und die Aufnahme des Radiopharmakons mittels SUV (standardized uptake value) quantifiziert. Der höchste mittlere SUVmax (>12) war bei Sarkomen, Ösophaguskarzinomen, Mammakarzinomen, Cholangio-zellulären Karzinomen und Lungentumoren zu finden. Der niedrigste FAPI uptake (mittlerer SUVmax <6) wurde bei Pheochromocytom, Nierenzellkarzinom, differenziertem Schilddrüsenkarzinom, adenoid-zystischem Karzinom und Magenkarzinom gefunden. Der mittlere SUVmax von hepatozellulären Karzinomen, kolorektalen Karzinomen, HNO Tumoren, Ovarialkarzinomen, Pankreas und Prostata Karzinom bildete eine intermediäre Gruppe (SUV 6-12). Der SUV variierte dabei zwischen als auch innerhalb der Tumorentitäten. Durch den niedrigen Untergrund bei Muskelgewebe und blood-pool (SUVmax < 2), lagen die Tumor-zu-Untergrund Verhältnisse bei > 3 -fach in der Intermediärgruppe und > 6 -fold in der Gruppe mit hoher Tumoraufnahme. Dieser hohe Kontrast und auch die hohen Anreicherungen in einer die Lungentumoren einschließenden Gruppe könnten als Grundlage eines therapeutischen Einsatzes von FAPIs z.B. im Rahmen einer Kombinationstherapie dienen.

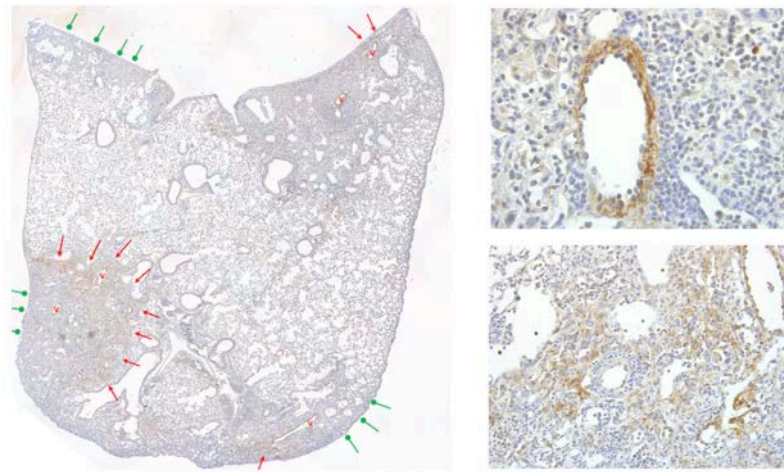
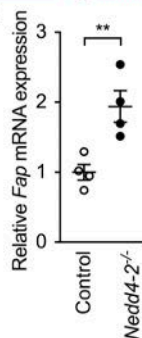


MIP bei verschiedenen Tumorentitäten 1h nach Tracer Applikation.

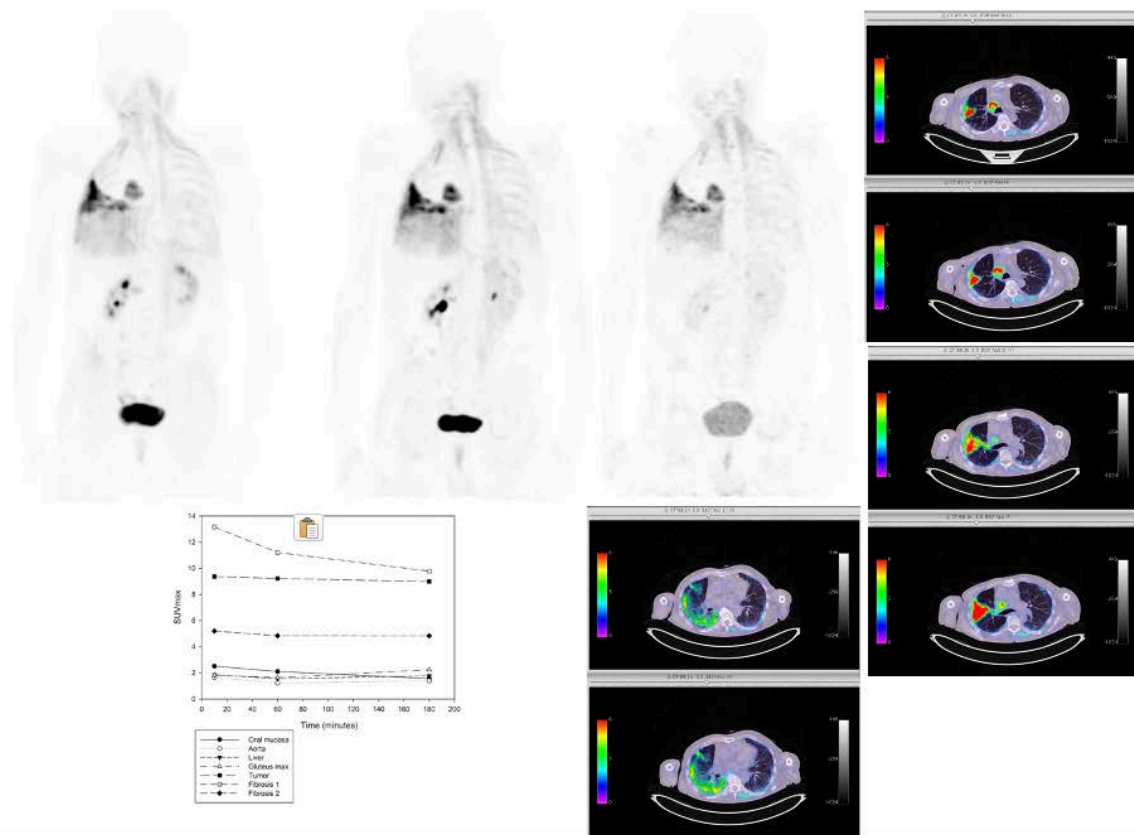
In 2020 erhaltene Ergebnisse

Da auch bei nicht-malignen Erkrankungen mit Remodelling mit einer Aktivierung von Fibroblasten zu rechnen ist, wurde ein Projekt zusammen mit Prof. Kreuter und Prof. Heussel (Partner Thoraxklinik; Disease Area DPLD) initiiert, das sich mit der Darstellung von Lungenfibrosen befasst. Hier wurden bisher 14 Patienten mit Lungenfibrose und und Lungentumor untersucht, davon 3 mittels dynamischer PET-Akquisition, die ein pharmakokinetisches Modelling erlaubt. Die gemeinsame Auswertung der PET und des hochauflösenden CTs bzw. des pharmakokintischen Modellings erfolgen gerade.

Syngeneic Mouse Model of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (Ned



Evaluation eines präklinischen Modells der idiopathischen Lungenfibrose bezüglich der FAP-Expression. Sowohl immunhistochemisch, als auch auf RNA-Ebene konnte eine gesteigerte FAP-Epression nachgewiesen werden.



Patient mit Lungenfibrose und Lungentumor 10, 60 und 180 Minuten nach Injektion von FAPI-46. In diesem Fall zeigt die aktivierte/exazerbierte Fibrose eine deutlich höhere Anreicherung als der Tumor und der Tumor eine deutlich höhere Anreicherung als die nicht-aktivierte Fibrose, die jedoch auch eine höhere Anreicherung als das normale Lungengewebe aufwies. Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß mittels FAPI-PET zwischen exazerbierter und nicht-exazerbierter Fibrose unterschieden werden könnte, mit den entsprechenden therapeutischen Konsequenzen.

LC4.3: Anwendung der DWI-MRT und Perfusionsanalyse zur Erfassung früher Anzeichen von Ansprechen und Resistenz zur Vorhersage der Wirksamkeit /Nicht-Wirksamkeit innovativer Therapien

Wir haben neue MRT-Methoden zur Messung der Perfusion und Zellularität von Lungentumoren entwickelt und etabliert. Diese Verfahren sind so sensitiv, so dass damit bereits kleine Änderungen direkt nach erstmaliger Gabe von chemo- bzw. immunotheapeutischen Medikamenten messbar werden. In einer Pilotstudie mit Patienten mit Lungenkrebs konnten wir damit nachweisen, dass das Therapieansprechen frühzeitig gemessen werden kann. Auf Basis dieser Daten wurde der Antrag zu einer prospektiven multizentrischen Studie („Sehr frühe Diffusions-MRT zum Therapie-monitoring beim BC“; ERT-

BC), vom DZL Clinical Trial Board genehmigt (FKZ 82DZLF14A2). Damit wurde dieser Meilenstein unter dem FKZ 82DZLF14A2 fortgeführt (Laufzeit: 2016 – 2020).

Plattform Imaging / Bildgebungsverfahren

PLI-1.1 Rahmenbedingungen/ kontinuierliche Betreuung aller Plattform Imaging Projekte durch das zentrale Koordinationsbüro

Die Aktivitäten der Plattform Imaging wurden bis Anfang 2019 von einer Projektkoordinatorin betreut. Nach ihrem Ausscheiden übernahm 2019 die TLRC Standortkoordinatorin die administrative Leitung. Zu den routinemäßigen Aufgaben zählten die folgenden Aktivitäten:

- Vorbereitung der Treffen der Plattform Imaging im Rahmen des DZL Jahrestreffens
- Organisation und Nachbereitung (Protokolle) der regelmäßig stattfindenden Telefonkonferenzen
- Koordination der zwei Mal jährlich fälligen Berichte für den DZL-Vorstand in Form einer Präsentation
- Koordination und Organisation (Flyer, Anmeldungen, Kurszuteilung, Angebote zur Unterbringung) der jährlichen Plattform Imaging Workshops (zwei halbe Tage mit i.d.R. bis zu 50 Teilnehmern)
- Verfassen der klinischen und präklinischen Forschungshighlights für den DZL Jahresbericht
- Unterstützung der Kommunikation zwischen Plattform Koordinatoren, Principal Investigators und der DZL-Geschäftsstelle

Des Weiteren koordinierten wir in 2017 die Überarbeitung und Harmonisierung der Geschäftsordnung der Bilddatenbank mit der dieser übergeordneten DZL-Geschäftsordnung zur Proben- und Datenverarbeitung.

Im Verlauf der DZL2.0 Förderperiode stellte sich heraus, dass die ursprünglich geplante zentrale Bilddatenbank und ein zentralisierter Image Auswertungsservice aus verschiedenen Gründen von den Partnern nicht unterstützt wird. Stattdessen fokussierte sich das Interesse auf Schaffung der Rahmenbedingungen für die Generierung von Metadaten für das DWH und KI/Radiomics (neu PLI-3). Im November 2019 haben wir einen Survey zum Thema Nutzung bzw. in Entwicklung befindlicher KI Methoden und Projekte in der Bildgebung durchgeführt, um die Kommunikation im Bereich KI zu fördern. Im November 2020 organisierten wir zu diesem Thema einen ersten digitalen Workshop mit 50 Teilnehmern.

Im Verlauf der Förderperiode zeigte sich, dass das Projekt "Wachstum und Altern von Atemwegen und Gefäßen" (GAVA; PLI-1.4) wenig Unterstützung fand. Stattdessen wurde in zwei Arbeitstreffen (2018/2019) das Konzept für Arbeiten an einem Atlas der humanen Lunge

auf Basis der neusten innovativen technologischen Entwicklungen als langfristiger Meilenstein mit Fortführung in DZL3.0 festgelegt. Im Dezember 2020 organisierten wir dazu einen ersten digitalen Workshop mit 20 Teilnehmern.

PLI-1.2 Entwicklung und Validierung von Imaging Biomarker / Definition standardisierter Readouts als Endpunkte oder Ersatzendpunkte / Einsatz der Imaging Biomarker in prospektiven klinischen Studien des DZL

Zu den Aufgaben der Plattform Imaging gehört die Unterstützung der Tätigkeiten und Aktivitäten im Bereich Entwicklung und Validierung von Imaging Biomarkern als Endpunkte in prospektiven klinischen Studien, die im Rahmen des DZL durchgeführt bzw. auf den Weg gebracht werden. Für den Berichtszeitraum 2016 – 2020 zählten dazu folgende Multi-Center Studien:

- 1) Disease Area PH: Change-MRI (2016 -2022; Studienleitung- und Koordination am Standort BREATH)
- 2) Disease Area DPLD: AIRR Studie (2016 - 2021; Studienleitung- und Koordination am Standort CPC-M)
- 3) Disease Area CF: PRESIS (2013-2016; Studienleitung- und Koordination am Standort TLRC)
- 4) Disease Area COPD: Cosyconet Substudie im Rahmen des Teilprojektes 7 (MR-COPD I), (2013 – 2016; Studienleitung- und Koordination am Standort TLRC)
- 5) Disease Area COPD: Cosyconet Substudie im Rahmen des Teilprojektes 7 (MR-COPD II), (2016 - 2020; Studienleitung- und Koordination am Standort TLRC)
- 6) Disease Area LC: ERT-BC Studie (2016 – 2020; Studienleitung- und Koordination am Standort TLRC)

Diese Multi-Center Studien wurden sowohl bei den Plattform-Treffen im Rahmen der DZL Jahrestreffen als auch in den Telefonkonferenzen und den Plattform-internen Meetings besprochen und vorangebracht. Ergebnisse der PRESIS Studie und COSYCONET sind bereits publiziert. Die Ergebnisse der ERT-BC Studie werden im Verlauf von 2021 publiziert. Der Antrag zur Förderung des Folgeprojekts der Cosyconet Substudie (MR-COPD II) wurde vom DZL Clinical Trial Board bewilligt und planmäßig im Berichtszeitraum abgeschlossen.

Aus der TLRC Image-Datenbank wurden fast 600 CT-Datensätzen von COPD-Patienten bzw. Teilnehmern an einer Lungenkrebs-Screening-Studie mit Verläufen von ca. 180 Patienten mittels YACTA und LUFIT (UKHD und Thoraxklinik) sowie mittels IMBIO am DZL-Standort München automatisiert ausgewertet. Die visuelle Analyse eines Teils dieser Datensätze am DZL-Standort München wurde begonnen. Die lungenfunktionellen und klinischen Parameter dieser Patienten wurden zusammengestellt und verglichen. Analysen zu technischen

Unterschieden der verschiedenen Softwares und zum Fortschreiten der COPD wurden erfolgreich publiziert:

Fully Automated Pulmonary Lobar Segmentation: Influence of Different Prototype Software Programs onto Quantitative Evaluation of Chronic Obstructive Lung Disease. Lim HJ, Weinheimer O, Wielpütz MO, Dinkel J, Hielscher T, Gompelmann D, Kauczor HU, Heussel CP. PLoS One. 2016 Mar 30;11(3):e0151498.

Quantitative CT detects progression in COPD patients with severe emphysema in a 3-month interval. Konietzke P, Wielpütz MO, Wagner WL, Wuennemann F, Kauczor HU, Heussel CP, Eichinger M, Eberhardt R, Gompelmann D, Weinheimer O. Eur Radiol. 2020 May;30(5):2502-2512.

Effect of smoking cessation on quantitative computed tomography in smokers at risk in a lung cancer screening population. Jobst BJ, Weinheimer O, Trauth M, Becker N, Motsch E, Groß ML, Tremper J, Delorme S, Eigentopf A, Eichinger M, Kauczor HU, Wielpütz MO. Eur Radiol. 2018 Feb;28(2):807-815.

Longitudinal airway remodeling in active and past smokers in a lung cancer screening population. Jobst BJ, Weinheimer O, Buschulte T, Trauth M, Tremper J, Delorme S, Becker N, Motsch E, Groß ML, Trotter A, Eichinger M, Kauczor HU, Wielpütz MO. Eur Radiol. 2019 Jun;29(6):2968-2980.

Des Weiteren war die PLI mit einem Antrag zum Thema "Characterisation of CT Radiomic Features in Lung Cancer Patients" zur Nutzung des DZL Data Warehouse im Jahr 2019 erfolgreich (Laufzeit bis 2021). Dies baut auf den Erfahrungen und Ergebnissen aus einem EU-Projekt (LUCINDA) zur datenbasierten Vorhersage der Dignität von Lungenrundherden auf.

Lung cancer prediction by Deep Learning to identify benign lung nodules. Heuvelmans MA, van Ooijen PMA, Ather S, Silva CF, Han D, Heussel CP, Hickes W, Kauczor HU, Novotny P, Peschl H, Rook M, Rubtsov R, von Stackelberg O, Tsakok MT, Arteta C, Declerck J, Kadir T, Pickup L, Gleeson F, Oudkerk M. Lung Cancer. 2021 Jan 31;154:1-4.

PLI-1.3 (2016 – 2018) Lehre / Webinars mit Zielgruppe DZL Standorte zum richtigen Einsatz der bildbasierten Biomarker

Die von der Plattform Imaging erstellten Webinare sollen vor allem dem wissenschaftlichen Nachwuchs des DZL zur Fortbildung zur Verfügung stehen. Beim DZL Jahrestreffen in 2017 als auch in dessen Folge über den zentralen E-Mail Verteiler rief die DZL-Geschäftsstelle alle Pls dazu auf, bereits bestehende Aufzeichnungen einzusenden, damit diese in der DZL Online Academy veröffentlicht werden können. Mit zunächst fünf Aufzeichnungen von Seminaren aus dem Bereich Mikroskopie ging die DZL Online Academy im Juni an den Start. Am Standort Heidelberg wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Jörg Rodrian (Fotograf und medizinischer Dokumentarfilmer) ein Webinar in zwei Testversionen zum Thema „Einführung zur konfokalen Mikroskopie“ gedreht und auf der DZL Homepage eingestellt. Die DZL Online Academy läuft nun unter der Bezeichnung GoToTraining Plattform. Das Konzept zu standortübergreifenden

Lehr- und Fortbildungsangeboten im Rahmen der DZL Online Academy wurde beim DZL Jahresmeeting 2018 in Bad Nauheim vorgestellt und zur weiteren Fortführung an die DZL Geschäftsstelle übergeben.

PLI-1.4 (2016 – 2018) Zusammenstellung von bildbasierten Ergebnissen zum Thema „Wachstum und Altern von Atemwegen und Gefäßen“ (GAVA) / Erfassen von GAVA relevanten Studien und Projekten / Übersichtsarbeit zu Bildgebungstechnologien und bildbasierten Biomarker / Organisation von GAVA Arbeitstreffen zur Diskussion und Erstellung von Manuskripten

Unter dem Acronym „GAVA“ (Growing and Ageing of Vessels and Airways) verfolgte die Plattform Imaging das Ziel, ein Konzept für eine eigene wissenschaftliche Auswertung zur Entwicklung und Alterung der Atemwege aufzustellen. Für alle Studien und Projekte, in denen Standort- und Disease Area übergreifend „Imaging“ (bildgebende Methoden) zu diesem Thema eingesetzt wird, sollte damit ein gemeinsamer Rahmen geschaffen werden. Aufgrund der mangelnden Förderung von Projekten mit Bezug zu GAVA kam daher beim Plattform Imaging Workshop im Oktober 2017 auf den Prüfstand und der Abbruch dieses Projekts zugunsten des „Atlas der menschlichen Lunge“ wurde in 2018 beschlossen und an das Fördermittelmanagement kommuniziert.

PLI-1.4 (2019 – 2020) Atlas der menschlichen Lunge

Im Rahmen der angestrebten umfassenden strukturellen Erfassung der menschlichen Lungenanatomie nutzt die Plattform Imaging innovative hochauflösende Bildgebungsmodalitäten und korreliert diese mit dem Stand der Technik entsprechenden klinischen Methoden. Für das Erstellen einer dreidimensionalen Detailkarte der humanen Lunge ist das bestehende Wissen zu Zelltypen und deren Funktion in den Kontext des Bindegewebsgerüsts und des Gefäßsystems zu setzen. Nichtdestruktive Schnittbildverfahren ermöglichen eine Erfassung der Lunge auf Organebene und überbrücken das Abbildungsspektrum von der Makro- auf die Mikroskala. Die Aktivitäten sollen in einer engen Kooperation zwischen allen Standorten weiter ausgebaut werden. Im Rahmen eines digitalen Human Lung Atlas Meeting im Dezember 2020 wurde ein Konzept zur weiteren Förderung der Kollaboration zwischen den Standorten und Arbeitsgruppen auf den Weg gebracht, welches die vergleichende Analyse von terminalen Bronchen, Bronchiolen und Alveolen zwischen den Krankheitsbereichen und die Nutzung der klinischen Datentiefe als ein wichtiges Ziel für das DZL in den Mittelpunkt stellt. Zudem soll an die schon bestehenden DZL-Projekte zu Single-Cell Analysen angeknüpft werden und deren Arbeiten durch die intensivere Nutzung der DZL Lungenbiobank gefördert werden. Für viele der geplanten Analysen mit neusten mikroskopischen Technologien ist der Zugriff auf geeignete Proben und standardisierte Verarbeitungsprotokolle der Biomaterialien eine erhebliche Herausforderung. Dazu soll sich

außerhalb des Workshops und durch Austausch von schon existierenden Protokollen noch weiter ausgetauscht werden. Der Meilenstein wird in DZL3.0 fortgeführt.

Es wurden bereits die folgenden DZL-standortübergreifenden Arbeiten zur skalenübergreifenden dreidimensionalen Lungenstrukturanalyse¹⁻⁶ publiziert:

¹Assessment of the Alveolar Capillary Network in the Postnatal Mouse Lung in 3D Using Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy. Buchacker T, Mühlfeld C, Wrede C, Wagner WL, Beare R, McCormick M, Grothausmann R. Front Physiol. 2019 Nov 21;10:1357. doi: 10.3389/fphys.2019.01357. eCollection 2019.

²Morphomolecular motifs of pulmonary neoangiogenesis in interstitial lung diseases. Ackermann M, Stark H, Neubert L, Schubert S, Borchert P, Linz F, Wagner WL, Stiller W, Wielpütz M, Hoefer A, Haverich A, Mentzer SJ, Shah HR, Welte T, Kuehnel M, Jonigk D. Eur Respir J. 2019 Dec 5. pii: 1900933. doi: 10.1183/13993003.00933-2019. [Epub ahead of print]

³Comprehensive three-dimensional morphology of neoangiogenesis in pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. Neubert L, Borchert P, Shin HO, Linz F, Wagner WL, Warnecke G, Laenger F, Haverich A, Stark H, Hoeper MM, Kuehnel M, Ackermann M, Jonigk D. J Pathol Clin Res. 2019 Apr;5(2):108-114. doi: 10.1002/cjp2.125.

⁴Intravital microscopic optical coherence tomography imaging to assess mucus-mobilizing interventions for muco-obstructive lung disease in mice. Pieper M, Schulz-Hildebrandt H, Mall MA, Hüttmann G, König P. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2020 Mar 1;318(3):L518-L524.

⁵Comparison of Organoid Swelling and *In Vivo* Biomarkers of CFTR Function to Determine Effects of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for the F508del Mutation. Graeber SY, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Hirtz S, van der Ent CK, Mall MA, Beekman JM. Am J Respir Crit Care Med. 2020 Dec 1;202(11):1589-1592.

⁶Disentangling inflammatory from fibrotic disease activity by fibroblast activation protein imaging. Schmidkonz C, Rauber S, Atzinger A, Agarwal R, Götz TI, Soare A, Cordes M, Prante O, Bergmann C, Kleyer A, Ritt P, Maschauer S, Hennig P, Toms J, Köhner M, Manger B, Stone JH, Haberkorn U, Baeuerle T, Distler JHW, Agaimy A, Kuwert T, Schett G, Ramming A. Ann Rheum Dis. 2020 Nov;79(11):1485-1491.

Experimente zu COVID-19 Pneumonie am Teilchenbeschleuniger (2020)

Synchrotron-Phasenkontrast-Lungenbildgebung auf humanem Maßstab (PLI-1.2, PLI-1.4)

Unsere Studien zum zukünftigen Einsatz der ultrahochauflösenden Synchronstrahlen-basierten Computertomographie (SRCT) zu diagnostischen Zwecken wurde durch eine weitere Versuchsreihe ergänzt. Technische Verbesserungen am Rotationstisch, die Erweiterung des Proben-zu-Detektor-Abstands und Anpassungen des Akquisitionsprotokolls haben zu einer weiteren signifikanten Verbesserung der Bildqualität und zu einer Dosisreduktion geführt. Die Ergebnisse werden im ersten Halbjahr 2021 unter dem Titel „*Propagation based lung imaging in a human chest phantom*“ an das Journal of Synchrotron Radiation gerichtet. Quantitative und Qualitative Auswertungen der Bildqualität zeigen die Überlegenheit der SRCT gegenüber der klinischen Computertomographie (CT) bei gleicher oder niedriger Dosis, die Ergebnisse sollen im ersten Halbjahr 2021 unter dem Titel „*Comparison of Image Quality between phase*

contrast Synchrotron Tomography and clinical CT using a Lung Phantom“ in einem klinisch-radiologischen Journal, wie z.B. European Radiology publiziert werde.

Mit dem Beginn der COVID-19 Pandemie haben wir kurzfristig den Fokus auf morphologische Charakterisierung der heterogenen pulmonalen Schädigungsmuster i.R. der COVID-19-Pneumonie gerichtet: Die COVID-19 Pneumonie erzeugt ein charakteristisches heterogenes Bildmuster in der klinischen Dünnschicht-Computertomographie. Ein skalenübergreifender korrelativer Bildgebungsansatz bis auf Gewebeebene soll zum genaueren Verständnis dieser Befunde beitragen. Erkenntnisse über zugrundeliegende mikrostrukturelle Veränderungen sollen Rückschlüsse auf die Pathophysiologie des akuten Lungenversagens ermöglichen.

Die CT kommt in der Diagnostik bei Patienten mit V.a. COVID-19 Pneumonie und in der Verlaufsbeurteilung bei Verschlechterung der respiratorischen Symptomatik bestätigter COVID-19 Pat. zum Einsatz. In diesem Rahmen lassen sich typische durch die SARS-CoV2 Infektion hervorgerufene radiologische Muster abgrenzen, deren exaktes Korrelat auf Gewebeebene bislang weitgehend unklar ist und in dieser Studie durch den Einsatz hochauflösender Schnittbildgebung rückskaliert wird. Den klinischen Verlauf der COVID-19 prägen unterschiedliche Ausprägungsformen des Lungenbefalls. So grenzten Gattinoni et al. einen von niedriger Elastance geprägten L-Typ von einem H-Typ ab, der eine hohe Elastance, eine niedrige Compliance und ein hohes Lungeneigengewicht aufweist. Letzterer Typus stellt die Beatmungsmediziner vor besondere Herausforderungen. Durch Untersuchungen von post mortal gewonnenem Gewebe konnten bereits erste histopathologische Schädigungsmuster identifiziert werden, die z.T. sowohl von bereits bekannten Viruspneumonien, als auch vom klassischen akuten Lungenversagen abweichen und erste Erklärungsansätze für die z.T. schweren respiratorischen Verläufe liefern^{1,2}.

Bisherige Studien waren allerdings noch nicht in der Lage die Schädigungsmuster auf Zell- und Gewebeebene direkt zu der ante-mortem verfügbaren CT in Korrelation zu setzen. Hierfür bedarf es einer hochauflösenden Bildgebungsmodalität die eine Brücke zwischen der Organ- und der Gewebeebene schlägt. Wir setzten Synchrotronstrahlen-basierte Phasenkontrastbildgebung von post mortem gewonnenen Lungenproben an COVID-19 Pneumonie verstorbener Patienten ein um eine gezielte Korrelation histopathologischer Schädigungsmuster mit klinischen CT-Befunden zu ermöglichen. Umfassende frühere und aktuelle experimentelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppen haben sich erfolgreich mit der hoch-auflösenden, nicht-destruktiven Bildgebung der Mikroarchitektur, verschiedener Organe, insbesondere der Lunge beschäftigt^{3,4}. In diesem Zusammenhang wurde bereits ein standardisiertes Vorgehen im Sinne einer Bildgebungskaskade etabliert. Das Projekt ist abgebildet im Ethikantrag S-242/2020/Änderung vom 11.05.2020. Die Studie zielt auf eine möglichst präzise Korrelation histopathologischer Schädigungsmuster zu klinischen CT-Befunden ab. Verschiedene pulmonale Gewebeschäden wie z.B. der akute diffuse alveoläre Schaden, die akute fibrinöse organisierende Pneumonie oder interstitielle Fibrosen können

ähnliche Muster in der klinischen Dünnschicht-CT hervorrufen, bedürfen aber unterschiedlichen Behandlungsmethoden. Durch eine Rückskalierung von histologischen Befunden auf die klinische CT ermöglicht unsere Bildgebungskaskade eine Zuordnung von histologisch bestätigten Gewebeschäden zu klinisch-radiologischen Bildbefunden und somit zukünftig eine gezieltere Behandlung. Darüber hinaus ermöglicht sie über eine lokale 3D Analyse der Lungenstruktur auf parenchymaler Größenskala ein umfassenderes Verständnis der Pathophysiologie der COVID-19 Pneumonie, hierfür wird die Analysesoftware VGSTUDIO MAX (Volume Graphics, Heidelberg) eingesetzt, welche hochspezialisiert auf die Quantifizierung besonders großer, hochaufgelöster CT-Datensätze ist. 48 Lungengewebeproben von 12 Patienten werden analysiert, die am UKHD an COVID-19 verstorben sind, im Verlauf klinische CT Untersuchungen erhielten (insg. 11) und post-mortem eine pathologische Obduktion erhielten. Standardisiert wird die Lunge i.R. der Obduktion transversal in ca. 2 cm dicke Lamellen präpariert. Gezielt werden anhand der klinischen CT Daten (mit Unterstützung durch strukturierte Befundungs- und AI-Algorithmen) sowie der makroskopischen Inspektion repräsentative Lungenlamellen gewählt, die die typischen Veränderungen der COVID-19 Pneumonie aufweisen. Für die Studie werden je Patienten eine Lamelle mit CT-morphologisch nachgewiesenen COVID-19-typischen Veränderungen sowie eine Lamelle aus einem Bereich mit möglichst geringen bis keine Veränderungen (interne Kontrolle) gewählt. Zudem werden aus jeweils direkt angrenzenden Lamellen kleine Gewebestücke* entnommen. Die Gewebelamellen werden über eine aufsteigende Ethanol-Reihe und Hexamethyldisilazane entwässert und getrocknet. Getrocknete Lamellen werden Luft- und flüssigkeitsdicht in speziell angefertigten Plexiglashaltern fixiert.

Die Proben wurden anschließend 1) am photonenzählenden CT am DKFZ (Radiologische Abteilung -E010-) mit einer Voxelkantenlänge von ~ 200 µm und 2) an der SYRMEP Beamline des Elettra Teilchenbeschleunigers (Triest, Italien) mit einer Voxelkantenlänge von 1,8 - 67,0 µm untersucht. Unter Markierung der Probenhalter werden nach Rehydrierung des Gewebes gezielt Teilstücke für eine gezielte histopathologische Analyse aufgearbeitet. Die initial gewonnen *Gewebestücke angrenzend an die untersuchten Lamellen werden direkt histopathologisch aufgearbeitet und dienen als Kontrolle zur Erfassung etwaiger Auswirkungen des Dehydrierungsprotokolls auf die Gewebequalität.

- 1) Ackermann et al., "Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19.," The New England Journal of Medicine, May 21, 2020, doi:10.1056/NEJMoa2015432.
- 2) Copin et al., "Time to Consider Histologic Pattern of Lung Injury to Treat Critically Ill Patients with COVID-19 Infection," Intensive Care Medicine 126, no. 9 (April 23, 2020): 1–3, doi:10.1007/s00134-020-06057-8.
- 3) Wagner et al., "Towards Synchrotron Phase-Contrast Lung Imaging in Patients - a Proof-of-Concept Study on Porcine Lungs in a Human-Scale Chest Phantom," J. Synchrotron Rad (2018). 25, no. 6 (October 24, 2018): 1–6, doi:10.1107/S1600577518013401.
- 4) Ackermann et al., "Morphomolecular Motifs of Pulmonary Neoangiogenesis in Interstitial Lung Diseases.," The European Respiratory Journal 55, no. 3 (December 5, 2019): 1900933, doi:10.1183/13993003.00933-2019.
- 5) Wagner WL, Hellbach K, Fiedler MO, Salg GA, Wehrse E, Ziener CH, et al. [Microvascular changes in COVID-19]. Radiologe. 2020 Oct;60(10):934–42.

PLI-2.1 (2016 – 2018) Implementierung und Betreiben einer Image Bank und Image Auswertungsservice

Die Erweiterung der bisherigen in einem Testbetrieb befindlichen Image Bank durch einen weiteren Dienst für die automatisierte Quantifizierung von Bilddaten lag 2016 im Fokus der PLI Image Bank. Der Image eVALuation service – IVA – wird dabei als zentraler Dienst in die Image Bank integriert. Über diesen Dienst erfolgte ein erster Test-Datenaustausch zwischen den DZL Standorten und der Image Bank, sowie die Analyse der Bilddaten und die Aufbereitung der Analysen, der Metadaten und der Bilddaten für die Image Bank. Die notwendige Erweiterung der Hardware für die Image Evaluation Plattform wurde gemäß den Spezifikationen im Antrag im November 2016 bestellt, wird aber durch Verzögerung beim Lieferanten erst im März 2017 geliefert. Zudem wurde aufgrund gestiegener Anforderungen an den Speicherbedarf, insb. durch die Inbetriebnahme des MicroCTs, die Erweiterung des für 2017 geplanten digitalen Archivs, ins Jahr 2016 vorgezogen.

Im Jahr 2017 wurde ein Datensicherungskonzept für die Image Bank etabliert. Der Hauptfokus der Image Bank und des Image eVALuation Service lag jedoch auf der Evaluierung von Lösungsansätzen, wie der Datentransfer am effizientesten an den einzelnen DZL Standorten zu realisieren ist. Auf Grundlage dieser Evaluation wurde dann das Konzept der Datenintegration entsprechend angepasst, in dem entgegen dem ursprünglichen Ansatz, einen eigenen Softwareclient für den Datentransfer zu verwenden, auf bereits etablierte und bewährte Lösungen für den Datentransfer zurückgegriffen wurde.

Von Seiten der Image Bank und des Image eVALuation Services wurden Vorbereitungen getroffen, um mögliche Synergieeffekte mit den Diensten der Initiative Medizininformatik im HiGHmed Konsortium (BMBF) und dem DKTK zu nutzen.

Im Rahmen der Telefonkonferenzen in 2018 stellte sich heraus, dass das Konzept einer zentralen Image-Datenbank für die Standorte nicht mehr tragbar ist. Durch den fortschreitenden Datenumfang, Anforderungen an Speicherkapazitäten und Datensicherheit ist man sich einig, dass die dezentrale Speicherung der Daten mit lokaler Generierung von harmonisierten Metadaten, die direkt in das DZL DWH importiert werden können die bessere Lösung ist. Dementsprechend wurde ein neuer Meilenstein definiert (siehe PLI-3).

PLI-2.2. Datenintegration (Cosyconet, DZL trials, Prognosis)

Einheitliche standortübergreifende Standards für die Datenakquisition bilden die Grundlage für eine systematische standardisierte vollautomatische Quantifizierung der Bilddaten. Die Resultate der automatischen Bilddatenanalyse stehen als Referenzwerte zur Verfügung. Ein Meilenstein für die Datenintegration war das auf den Weg gebrachte Konzept für den sicheren Datenaustausch zwischen den DZL Standorten und dem Image eVALuation Service der in 2017 nochmals vollständig überarbeitet wurde. Entgegen der ursprünglichen Verwendung eines Clients, der an den DZL Standorten den Datentransfer mit der Image Bank übernehmen sollte, sollen jetzt Standardprotokolle für den Datenaustausch verwendet werden. Hierfür bieten

sich für DZL Standorte FTP und sFTP an. Bei diesen Protokollen haben die lokalen Firewalladministratoren bereits Erfahrung und können, besser als bei einer selbstentwickelten Software, entsprechende Firewallregeln für den Datentransfer implementieren. Für die Jahre 2016 – 2020 wurden die Daten von MR-COPDII (82DZLS24A1), ERT-BC (82DZLF14A2) und PRESIS Follow-Up in eine zentrale Datenbank integriert. Für Prognose ist keine Datenintegration vorgesehen.

PLI-2.3 (2017) Sicherheitserweiterungen

Durch den Umzug der beiden Server der Image Bank und des Image eVALuation services in das Rechenzentrum des Universitätsklinikums Heidelberg wurden umfangreiche Umbaumaßnahmen in der Datensicherheit und des Datenschutzes notwendig, um den Anforderungen des Rechenzentrums des Universitätsklinikums Heidelberg gerecht zu werden. Dies beinhaltet unter anderem eine strikere Trennung der Kommunikationsverbindungen zwischen den DZL Standorten und den datenverarbeitenden Servern im Rechenzentrum. Dazu wurden die physikalischen Server der Image Bank und des Image eVALuation services komplett vom öffentlich zugänglichen Netz getrennt. Zugriff erfolgt jetzt nur noch über zwei virtuelle Server mit fest definierten Kommunikationswegen für den Datenupload und die Abfrage der Image Bank. Dadurch sind die Daten noch besser vor unbefugten Zugriffen im Rechenzentrum geschützt. Aufgrund der Änderung zur dezentralisierten allgemeinen Image Datenbank wurde dieser Meilenstein nach 2017 nicht weiterverfolgt.

PLI-3.0 (2019-2020) Schaffung der Rahmenbedingungen für die Generierung von Metadaten für das DWH und KI/Radiomics

Indem wir die Bilder bei lokalen Bilddatenbanken belassen, versprechen wir uns die Erfassung von mehr Bilddaten von Patienten am jeweiligen Standort, die den DZL broad consent unterschrieben haben. Auf der lokalen Bilddatenbank können verschiedene auf die lokalen Begebenheiten abgestimmte Software-Programme zur Bildsegmentierung und Berechnung von quantitativen Imaging Biomarkern laufen. Hierbei kann es sich um bereits verfügbare, traditionelle medizininformatische Werkzeuge handeln, aber auch neue Algorithmen, die selber lernen (künstliche Intelligenz/Radiomics). So werden lokal Metadaten generiert, die dann an das DataWarehouse übertragen werden. Darüber hinaus werden die Bilddaten referenziert, so dass sie für weitere bildbasierte Auswertungen an anderen Standorten zur Verfügung gestellt werden können. In 2020 wurde ein erster digitaler Workshop zu KI in der medizinischen Bildgebung mit über 50 Teilnehmern durchgeführt. In diesem Umfeld entstehen nun erste Publikationen.

Deep Learning for the Classification of Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Cancer. Kriegsmann M, Haag C, Weis CA, Steinbuss G, Warth A, Zgorzelski C, Muley T, Winter H, Eichhorn ME, Eichhorn F, Kriegsmann J, Christopoulos P, Thomas M, Witzens-Harig M, Sinn P, von Winterfeld M, Heussel CP, Herth FJF, Klauschen F, Stenzinger A, Kriegsmann K. Cancers (Basel). 2020 Jun 17;12(6):1604.

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms,

- Einbindung von über 240 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern, Ärzten und Ärztinnen in das DZL-Netzwerk
- Beschäftigung von 525 Personen (344 VZÄ) aus DZL-Mitteln; hiervon 69 % weiblich
- Finanzierung von 21 Professuren und Nachwuchsgruppenleitungen; hiervon 44 % weiblich
- Kooperation zwischen 29 führenden deutschen Forschungseinrichtungen an fünf Standorten
- Über 700 Publikationen mit Impact-Faktor >10 und über 50 Patente aus DZL-mitfinanzierten Projekten
- Anbindung weiterer Institutionen, Kohorten und Register als assoziierte DZL-Partner (RKI, NAKO, Berliner Institut für Gesundheitsforschung (BIH), PROGNOSIS, ped-CAPNETZ, PROGRESS, COSYCONET)
- Assoziierung großer Thorax-Kliniken (ARCN, TLRC, CPC-M)
- Rekrutierung von international ausgewiesenen Wissenschaftlern aus dem In- und Ausland
- Erweiterung des internationalen Beirats, bestehend aus renommierten Wissenschaftlern, um einen Vertreter der Industrie
- Durchführung von Jahrestreffen mit bis zu 500 Lungenforschern
- Fortführung der Förderung aus kompetitiven Mitteln für frühe klinische Studien (*investigator initiated*) und Etablierung der Förderlinie zur Erstellung von Anträgen für solche Studien beim DZL und weiteren öffentlichen Förderern (BMBF, DFG).
- Beteiligung an mehr als 250 klinischen Studien der Phasen I – IV
- Ausbau der zentralen Daten-, Gewebe-, und Bilddatenbanken mit einheitlichen SOPs
- Einverständniserklärungen von bis dato >37.000 Patienten für Daten- und Biomaterial-nutzung
- Integration erster Omics-Datensätze im Bereich Datenmanagement
- Etablierung periodischer Updates im DZL Data Warehouse
- Entwicklung eines *Broad Informed Consent* für pädiatrische Studien
- Aufbau der DZL Academy zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses mit entsprechenden Förder- und Fortbildungsveranstaltungen (in Präsenz und digital); Abschluss des Programms „Deutsch-Französische Lungenschule“; jährliche Munich International Autumn School for Respiratory Medicine (MIAS)
- Informationen für Patienten über den Lungeninformationsdienst des DZL (www.lungeninformationsdienst.de)
- Etablierung der stärkeren Vernetzung der Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung und Beginn erster gemeinsamer Projekte im Bereich Öffentlichkeitsarbeit (Zeitschrift Synergie, Patientenbeteiligung, etc.) und Forschung (Bereich Medizinalchemie)
- Empfehlung des Wissenschaftsrats zur Institutionalisierung der DZG

- Erhalt des renommierten Balzan-Preises im Jahr 2019

Im Bereich der **Translation** (vom Forschungsergebnis zum Patienten) wurden in der zweiten Förderperiode exemplarisch folgende Ergebnisse erzielt:

- Entwicklung neuer pharmakologischer Ansätze (GATA-3-DNAzym) zur Behandlung von Asthma, COPD und Akutem Lungenversagen
- Maßgebliche Fortschritte in der Früherkennung und Behandlung von Säuglingen mit Mukoviszidose (CF)
- Identifizierung von Troponin I als Biomarker für die Vorhersage der Sterblichkeit bei COPD
- Identifizierung genetischer Marker für die Entstehung von Fibrose und deren Krankheitsverlauf (DPLD)
- Abbauprodukt aus Kollagen 4/Tumstatin als neuer potenzieller diagnostischer Serum-Biomarker für die Atemwegsverlegung bei Asthmapatienten identifiziert (AA)
- Nachweis der Reduktion negativer klinischer Ereignisse bei CTEPH bei Kombinationstherapie mit Ambrisentan und Tadalafil von Beginn an im Vergleich zur Monotherapie (PH)
- Nachweis der Zunahme der Anfälligkeit für *P. aeruginosa*-Infektionen durch Verringerung der Mikrobiomdiversität nach Antibiotikabehandlung (ALI)
- Nachweis der EML4-ALK Fusionsvariante V3 als Hochrisiko-Faktor für ALK+NSCLC Patienten, der mit akzelerierter Metastasierung, frühem Therapie-versagen unter Tyrosinkinaseinhibitoren und Chemotherapie sowie kürzerem Gesamtüberleben einhergeht (LC).
- Wirkstoffe, die mTORC1 dauerhaft aktivieren und damit die Autophagie von therapieresistenten Tumorzellen hemmen, sind ein vielversprechender neuer Ansatz für Patienten mit Tumoren, deren Resistenz von mTOR abhängt (LC).
- Etablierung der Wach-ECMO (extrakorporale Membranoxygenierung) bei Lungen-erkrankungen im Endstadium (ELD)
- Entwicklung innovativer Wege zu einer implantierbaren Lunge (ELD)
- Anwendung neuer Bildgebungsverfahren am Menschen (PLI)
- Identifizierung neuer therapeutischer Targets in allen Krankheitsbereichen und Überführung in die vorklinische Testung
- Entwicklung neuer Zell- und Tiermodelle
- Etablierung neuer Patientenkohorten und -register
- Ausbau der Kooperationen mit der Industrie im Bereich der Plattform Imaging Durchführung verschiedener IITs mit Industriebeteiligung (z.B. GI Hope, Relief, GATA-3)

2. Kurzfassung der wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Krankheitsbereich COPD

- Nachweis im Mausmodell, dass Passivrauchexposition in der Neonatalperiode desaströse Effekte auf die Lungengesundheit hat und diese schädliche Wirkung durch eine Störung der mukoziliären Clearance verstärkt wird (COPD-1.6).
- Nachweis im Mausmodell, dass eine Störung der mukoziliären Clearance einen wesentlichen Risikofaktor in der *in vivo* Pathogenese Allergen-induzierter Atemwegserkrankungen darstellt (COPD-1.6).
- Nachweis im Mausmodell, dass die Mukusclearance durch Verbesserung der Befeuchtung der Atemwege, z.B. durch Inhalation mit hypertonem Kochsalz, bei COPD signifikant verbessert werden kann (COPD-1.6).
- Entwicklung eines neuen FRET-Reporters für die Messung von Cathepsin G und Etablierung eines verbesserten Messverfahrens basierend auf Durchfluss-zytometrie (COPD-2.6).
- Nachweis durch quantitative CT, dass ein Rauchstopp innerhalb von zwei Jahren zu einem Rückgang der Bronchialwanddicke und zu einem Rückgang der parenchymalen Inflammation auf das Niveau von langjährigen Exrauchern führt (COPD-4.2/6.1).
- Modellbasierte iterative Rekonstruktionsverfahren beeinflussen nicht die quantitative CT (COPD-4.2/6.1).
- Kontrastmittel beeinflusst die quantitative CT, und kann durch geeignete Algorithmen korrigiert werden (COPD-4.2/6.1).
- Das GOLD-Stadium ist ein unabhängiger Prediktor für atherosklerotische Veränderungen der thorakalen Aorta (COPD-4.2/6.1).
- Die Perfusion-MRT korreliert mit dem funktionellen Defizit in der quantitativen CT und Zusammenfassung von „Small airways disease“ und Emphysem (COPD-4.2/6.1).

Krankheitsbereich CF

- Nachweis, dass in *in vitro* Modellen der Chloridkanal SLC26A9 mit funktionell korrigierten CFTR interagiert und SLC26A9 nochmals den Chloridstrom erhöhen kann (CF-F1).
- Nachweis, dass der Chloridkanal SLC26A9 den neonatalen Lungenphänotyp signifikant beeinflusst (CF-F1).
- Nachweis, dass bei CF-Patienten eine mit kommensalen Bakterien einhergehende höhere Diversität in den unteren Atemwegen mit einer geringeren Entzündungsreaktion assoziiert sind (CF-F2).

- Ergebnisse zeigen, dass bei CF-Patienten zusätzlich zur Dominanz von Pathogeninfektionen die Häufigkeit und das Gleichgewicht der Phyla Bacteroidetes und Firmicutes eine Rolle bei der Störung des Lungenmikrobioms und der Lungenfunktion spielen (CF-F2).
- Nachweis, dass schon eine Kurzzeitbehandlung mit Orkambi® (Lumacaftor/ Ivacaftor) die Diversität des Mikrobioms in CF-Patienten signifikant erhöht (CF-F2).
- Erfolgreiche Durchführung der weltweit ersten präventiven, randomisiert-kontrollierten Interventionsstudie zur Sicherheit und Wirksamkeit von inhalativem NaCl 6% bei Säuglingen mit CF unter Verwendung der Endpunkte MRT und MBW (CF-F3).
- Nachweis, dass Makrophagen während bakteriellen Exazerbationen und in der Pathogenese von CF-Lungenerkrankungen proinflammatorische Prozesse bestärken (CF-1.2).
- Etablierung von MRT und MBW als nicht-invasive Endpunkte für multizentrische Studien ab dem Säuglingsalter (CF-4.1).
- Die kontrastmittelfreie MRT mit T1-Mapping bei ultrakurzen Echozeiten kann zwischen funktionellen Perfusionsveränderungen und parenchymalen Veränderungen differenzieren, und korreliert mit dem MRT-Score (CF-4.2).
- Die Struktur-Funktion-Korrelationen zwischen MBW und CT sind für „low dose“ und „ultra low dose“ Protokolle vergleichbar, was eine CT-Dosisreduktion um eine Größenordnung ermöglicht (CF-4.2).
- Die μ CT eignet sich zur Quantifizierung von Veränderungen des Lungenparenchyms und der Atemwege im beta-ENaC-überexprimierenden Mausmodell der CF/COPD, und zur Detektion von therapeutischen Interventionen (CF-4.2).
- Nachweis der therapeutischen Effekte von Lumacaftor-Ivacaftor bei p.Phe508del homozygoten CF Patienten auf die CFTR-Funktion sowie neue sensitive klinische Endpunkte wie das Gasauswaschverfahren und das MRT der Lunge (CF-4.4).
- Aufbau einer deutschen CF-Neugeborenenenscreeningkohorte mit Vergleichs-population (TRACK-CF; CF-5)
- Etablierung eines Tracking-Systems für das CF-NBS-System, dessen Implementierung eine deutliche Qualitätsverbesserung im CF-Neugeborenen-screening-System zur Folge hat (CF-5).
- Prüfung der Machbarkeit des CF-NBS hinsichtlich des Durchführungszeitpunktes unter Beobachtung verschiedener Einflussfaktoren (CF-5).
- Nachweis, dass das Heidelberger CF-NBS Pilotstudienprotokolls und das aktuell geltende CF-NBS Protokoll eine geringere Sensitivität aufweisen als der derzeit international geltende Goldstandard in Form eines genetisch basierten CF Screening-Protokoll (CF-5).

Krankheitsbereich ALI

- Eine Störung des Hepcidin / Ferroportin-Regulationssystems führt zu einer Eisenüberladung der Lunge und einer restriktiven Lungenerkrankung (ALI-1.1).
- Wir zeigen, dass die pulmonale Entzündungsreaktion in einem Mausmodell mit schwerer pulmonaler Eisenüberladung leicht abgeschwächt ist (ALI-1.1).
- Hypoferrämie sagt Krankenhausaufenthalt und Sauerstoffbedarf bei COVID-19-Patienten voraus (ALI-1.1)
- Die Hemmung der alveolären Resorption ist ein teilweise HIF-vermittelter Prozess (ALI-3.2)
- Bakteriell-ausgelöste Inflammation hemmt den alveolären Na-Transport durch NO-Freisetzung in den Alveolarepithelzellen (ALI-3.2)
- Hypoxie verstärkt die durch Inflammation ausgelöste Hemmung der Alveolären Resorption (ALI-3.2)
- Inhalativ verabreichte Steroide verhindern die in Hypoxie durch Bergkrankheit ausgelöste Störung der alveolären Barriere-Funktion nicht; sie beeinflussen auch nicht die Hämodynamik der Lunge in Hypoxie (ALI-3.2)

Krankheitsbereich DPLD

- Generierung und Charakterisierung eines neuen einzigartigen Mausmodells mit konditionaler Deletion der Ubiquitinligase Nedd4.2 im Lungenepithel zur Untersuchung von Krankheitsmechanismen der ideopathischen Lungenfibrose (COPD-F2; DPLD-7).

Krankheitsbericht Pulmonale Hypertonie

- Anpassung der Hämoglobin- und Eisenspiegel als Reaktion auf eine niedrige Sauerstoffkonzentration in den Atemwegen in großer Höhe in verschiedenen Ethnien
Analyse des Eisenstoffwechsels bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PH-1.1).

Krankheitsbereich Lungenkrebs

- Supraparamagnetische Eisennanopartikel (SPIONs) induzieren eine Antitumoraktivität in Tumor-assoziierten Makrophagen (LC-1.1)
- Multimodale umfassende Untersuchung der intratumoralen Heterogenität morphologischer und molekulare Biomarker (histologische Wachstums muster, genomische und mitochondriale Mutationen, Kopienzahlveränderungen, Methylierungsprofile, Genexpressionsprofile) im pulmonalen Adenokarzinom, durch die zum einen Rückschlüsse über die Entwicklung und Progression dieser Tumoren abgeleitet werden konnten und zum anderen klinische Implikationen als Folge der Heterogenität aufgezeigt werden konnten (LC-3.1).

- Leitung einer nationalen multizentrischen Studie zur Entwicklung und klinischen Implementierung von Gentests zur Bestimmung der Tumormutationslast (TMB; LC-1.5; LC-3.1).
- Identifizierung einer neuartigen Gensignatur, die mit bestimmten Immunzelltypen - insbesondere B-Zellen und Makrophagen - in Verbindung steht und zur Vorhersage von langfristigem Ansprechen der Immun-Checkpoint-Blockade beitragen kann (LC-IO).
- Leitung einer multizentrischen Studie zum Vergleich der Konkordanz zwischen einer semi-automatisierten und der konventionellen Quantifizierung des Tumorzellgehalts. Aufbau eines webbasierten Tools zum Trainieren der Tumorzellgehaltbestimmung: <http://hd-molpath.de/> (LC-3.1)
- Identifizierung der klinisch-prognostischen Bedeutung der unterschiedlichen EML4-ALK Varianten sowie des Einflusses von TP53 Co-Mutationen (LC-F3).
- Darstellung des Nutzens der nicht-invasiven longitudinalen molekularen Profilerstellung für die Beurteilung des Remissionsstatus, die Erforschung von Mechanismen des Behandlungsversagens, die Vorhersage des nachfolgenden klinischen Verlaufs und die Entschlüsselung der Dynamik von medikamentenresistenten Klonen bei ALK+-Lungenkrebs (LC-2.2).
- Identifikation eines Peptids mit hoher Affinität zum Integrin $\alpha v \beta 6$, das sich in mehreren Tumorentitäten anreichert, inklusive NSCLC und im Gegensatz zu dem Standardradiopharmakon FDG nicht in entzündlichen Herden aufgenommen wird. Damit wäre eine Unterscheidung zwischen entzündlichen und malignen Herden möglich (LC-3.1).
- Entwicklung von small molecules (FAPIs) gegen das fibroblast activation protein (FAP), die als Pantumor-Tracer eingesetzt werden können. Diese zeigten insbesondere bei Lungentumoren einen hervorragenden Kontrast (LC-3.6).

Plattform Imaging

- Etablierung eines DZL-weiten Netzwerks der high-end Verfahren zur Bild-Akquisition, -Rekonstruktion und quantitativen Auswertung.
- Entwicklung und Validierung bildbasierter Biomarker in Entwicklung sowie Machbarkeits- und klinischen Studien
- Etablierung einer Methodik für die mikroradiologischen Bildgebung zur Untersuchung der Mikrogefäßbeteiligung bei letaler COVID-19.
- Etablierung von Rahmenbedingungen für die Nutzbarkeit bildbasierter Metadaten für Algorithmen der künstlichen Intelligenz

3. Fortschreibung des Verwertungsplans. Diese soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse brauchen nicht offenbart zu werden):

- *Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte (eigene oder andere, die in Anspruch genommen wurden), sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten*

Patentnummer EP20210176.2 (27.11.2020): „Nanoparticles comprising iron oxide particles embedded in polymeric micelles“ (Gleichberechtigte Erfinder: Martina Muckenthaler, Matthias Hentze, Natalie Horvarth, Tobias Bauer, Matthias Barz; LC-1.1).

Patentantrag („IRF als Angriffspunkt für neue Medikamente in der Behandlung von muko-obstruktiven Erkrankungen“) wird zurzeit vom DKFZ Innovation Management vorbereitet (Erfinder: Plass, Hey, Paulsen, Mall; Meilenstein CF-1.2).

- *Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - z.B. auch funktionale Vorteile, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)*

Keine.

- *Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) - u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z.B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Forschungsstellen, Netzwerken oder Institutionen u.a. einzubeziehen*

Keine.

- *Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung und Verwertung der Ergebnisse*

Krankheitsbereich COPD

- Die erfolgreiche Entwicklung und Etablierung der FRET-Reporter Methode kann in zukünftigen Studien eingesetzt werden, um den Effekt von Medikamenten (z.B. Kaftrio oder Anakinra) auf die Aktivität der Neutrophilen Serin Proteasen zu untersuchen (COPD-2.6).

- Der Einsatz der Durchflusszytometer basierten FRET-Methode zur frühen Diagnose von beispielsweise COPD soll im Rahmen nachfolgender Projekte eingehender evaluiert werden (COPD-2.6).
- Exploration von möglichen Endpunkten für klinische Studien anhand MR-COPDI und II, Einwerbung von Drittmitteln und Kooperation mit Industrie (COPD-4./6.2).
- Weiterentwicklung des UTE-T1 Mapping zur nicht-invasiven Bildgebung des Lungenfunktionsdefizits bei COPD-Patienten, weitere Kohortenmessungen sind erforderlich (COPD-4./6.2).
- Entwicklung von Verfahren basierend auf künstlicher Intelligenz zur vollständig automatisierten Bestimmung des MRT-Scores, Daten aus MR-COPDI und II für Training und Validierung. Einwerbung von Drittmitteln basierend auf den bisherigen Ergebnissen zur Quantitativen MRT als Grundlage für die Projektförderung geplant (COPD-4./6.2).

Krankheitsbereich Zystische Fibrose (CF)

- Im Rahmen der Translation werden im nächsten Schritt die Erkenntnisse über die Interaktion von SLC26A9 mit CFTR im Tiermodell zur Untersuchung der Expression und Funktion von SLC26A9 an humanen primären Epithelzellen von CF-Patienten beitragen (CF-F1).
- Der erfolgte Ausbau der archivierten Atemwegsproben (Nase, Rachen, Sputum) von CF-Patienten zum Aufbau einer repräsentativen Biobank wird langfristig noch umfassendere Analysen zum Mikrobiom ermöglichen (CF-F2).
- Etablierung eines 16S-rDNA Sequenzierungsprotokolls das genaue und kostengünstige metataxonomische Analyse für zukünftige Studien ermöglicht und auch in den Krankheitsbereichen COPD und DPLD eingesetzt wird (CF-F2).
- Empfehlung zur Therapie mit NaCl 6% p.i. hat bereits Eingang in die deutschsprachige Leitlinie gefunden (CF-F3).
- Das PRESIS Studiendesign wurde für Interventionsstudie in Kooperation mit Pharmaunternehmen Vertex verwendet und kann als Blaupause für weitere Interventionsstudien im frühen Kindesalter dienen (CF-F3).
- Nachverfolgung der PRESIS-Kohorte kann es möglich machen, auch für ältere Vorschulkinder mit CF evidenzbasierte Therapieempfehlungen aussprechen zu können (CF-F3).
- Einsatz der Studienplattform mit etablierten Endpunkten für weitere innovative Projekte für Patienten mit CF, aber auch anderen Lungenerkrankungen (CF-4.1).

- Rekrutierung der Interventionsstudie mit dem Pharmaunternehmen Vertex Pharmaceuticals wurde durch diese gut charakterisierte Kohorte möglich und ist Option für weitere Studien in dieser Altersgruppe (CF-4.1).
- Weiterentwicklung des UTE-T1 Mapping zur nicht-invasiven Bildgebung des Lungenfunktionsdefizits bei Kleinkindern mit CF, weitere Kohortenmessungen sind erforderlich (CF-4.2).
- Einwerbung von zusätzlichen Drittmitteln für die Weiterentwicklung von Verfahren basierend auf künstlicher Intelligenz zur vollständig automatisierten Bestimmung des MRT-Scores sowie Fortsetzung der Arbeiten in der nächsten DZL Förderperiode (CF-4.2).
- Die stetig fortschreitende umfangreiche Daten- und Biomaterialiensammlung im Rahmen der DZL Projekte ist eine einmalige Ressource für verschiedenste zukünftige Forschungsprojekte im Bereich CF (CF-5).
- Die CF-Datenbank kann in Zukunft für Beobachtungsstudien, z.B. zur Therapiereduktion unter hocheffizienter CFTR-Modulatortherapie, genutzt werden, da sämtliche Aspekte, die hierfür relevant sind, dort abgebildet werden (CF-5).

Krankheitsbereich Lungenkrebs

- Anknüpfend an die erfolgreiche Etablierung von SPIONs in kultivierten Zellen planen wir diese an Mäusen zu testen, bei welchen intratracheal LLC-Zellen instilliert wurden. Langfristig werden wir die Wirksamkeit von SPIONs zusammen mit bereits in der klinischen Anwendung befindenden Therapien untersuchen (LC-1.1).
- Anknüpfend an die erfolgreich etablierten Techniken und Methoden zur Analyse des Tumors und seines TMEs verlagern sich die Schwerpunkte der nächsten Förderperiode auf die Untersuchung wie sich immunologisch und zielgerichtet angreifbare von nicht angreifbaren Tumoren unterscheiden, wie sich diese Mechanismen im Verlauf der Erkrankung verändern und beeinflussen lassen und welche Biomarker in der Lage sind, die Komplexität in diagnostisch angemessener Weise, abzubilden (LC-IO).
- Ausbau der immunonkologischen Datenplattform für Kooperationspartner im DZL so dass die Ergebnisse aus den klinisch-molekularen Studien in grundlagenwissenschaftlichen Projekten anderer Partner weiter genutzt werden können.
- Da FAP generell bei dem Umbau von Gewebe hochreguliert ist werden die FAP-spezifischen small molecules in Zukunft zur Quantifizierung der Umbauprozesse bei Erkrankungen, die zu fibrotischen Veränderungen führen eingesetzt (LC-3.6).
- Eine weitere Einsatzmöglichkeit der FAPis liegt in der Strahlentherapieplanung und der Verlaufsbeobachtung nach Therapie bei Lungentumoren (LC-3.6).

Plattform Imaging

- Entwicklung und Validierung neuartiger Bildgebungsverfahren für die Lunge, z.B. Phasenkontrastbildgebung
- Integration bildbasierter Biomarker für Multiskalenansätze für neuartige Ansätze zur Behandlung von Lungenkrankheiten
- Nutzung von Algorithmen der künstlichen Intelligenz für Bild-Akquisition, -Rekonstruktion und quantitative Auswertung.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben (Kurzdarstellung einschließlich Konsequenzen für die Zielerreichung),

Anpassungen in der Zielsetzung bzw. des Arbeitsplans einzelner Meilensteine wurden vorgenommen. Diese sind unter den jeweiligen Meilensteinen erläutert.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer - z.B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)

Die Forschungsergebnisse des DZL haben zu zahlreichen hochrangigen Publikationen geführt und Eingang in Leitlinien gefunden (siehe Abschnitt „Inhalt und Ergebnisse“). Um die Nutzung unserer Forschungsergebnisse zu fördern, wurden sie auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt. Ein DZL International Symposium wurde im Jahr 2016 eigens dafür organisiert. Zahlreiche angemeldete Patente und Ergebnisse klinischer Studien bieten Anwendungsmöglichkeiten unserer Forschung zur Verbesserung von Prävention, Diagnostik und Therapie von Lungenerkrankungen. Einen konkreten Nutzer hatten auch Patienten, die an unseren, größtenteils gemeinsam mit dem Lungeninformationsdienst durchgeführten Informationsveranstaltungen entweder beispielsweise aus Anlass des fünfjährigen Bestehens des DZL an den Standorten oder während des DGP-Kongresses teilgenommen haben.

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung mit entsprechenden Erläuterungen bei Abweichungen vom ursprünglichen Plan und wesentlichen Umwidmungen.

Die Zeitplanung wurde im Wesentlichen eingehalten. Durch das Ausscheiden eines Projektleiters bzw. dessen Annahme einer Berufung an die Charité in Berlin wurde das Budget nicht voll ausgeschöpft. Die verbleibenden Selbstbewirtschaftungsmittel (ca. 182.854€ - ohne DZL Academy Budget) werden für die Finanzierung von DZG Aktivitäten (2021-2023) und als flexible Mittel in DZL3.0 zur Stärkung neuer Arbeitsbereiche eingesetzt.

DZL Academy Budget (Berichtszeitraum: 01.08.2019 – 31.12.2020)

Die DZL Academy unterstützt junge Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler deren Ziel eine Karriere in der translationalen Lungenforschung ist. Mit einem vielfältigen Programm zum Training und Networking trägt die DZL Academy zur Ausbildung von international konkurrenzfähigen jungen Wissenschaftler*innen bei.

Im Oktober 2018 übernahm die Standortkoordinatorin für das TLRC die administrative Koordination DZL Academy. Im Rahmen dessen wurden die Mittel für die DZL Academy für den Zeitraum August 2019 bis Dezember 2020 an das TLRC transferiert.

Zu den wesentlichen kostenverursachenden Programmpunkten während des Berichtszeitraums zählten Forschungsaufenthalte an DZL Standorten (Mobility Grants), DZL Academy Reception (2019), DZG organisierte Workshops, DZL organisierte Kurse, und das Sponsoring der Teilnahme an externen Kursen/Seminaren/Konferenzen (Anzeige 2020-18). Des Weiteren wurden Reisekosten für DZL Academy Board Mitglieder zu Board Meetings über das DZL Academy Budget abgerechnet.

Außerplanmäßig waren die Ausgaben für ein 3-Jahresabonnement für das online Journal for Visual Experimentation (JoVE), zum Zwecke der Fortbildung aller registrierten DZL Academy Fellows. Der entsprechende Antrag für diese Ausgaben wurde vom Fördermittelmanagement genehmigt (Anzeige 2020-19).

Die Reisemittelkostenabrechnung erfolgte mittels einer eigens für die Academy erstellten Vorlage auf Basis des Bundesreisekostengesetzes, die mit dem Fördermittelmanagement vorab abgestimmt wurde.

Heidelberg, den 19.05.2021

Prof. Dr. med. Hans Ulrich Kauczor

Appendix 1 DZL Meilenstein-und Verwertungsplan

Appendix 2 Publikationen des DZL-Partners UKHD/RKU 2016 – 2020

Appendix 1

DZL/TLRC Meilenstein und Verwertungsplan

0= keine direkte Verwertung

1= Publikation; (1) Publikation in Bearbeitung

2= Patentanmeldung

3= Konzept zur Überführung in klinische Studien Phase I/II

4= Durchführung einer zulassungsrelevanten Phase III-Studie

5= Eingang in Leitlinien Diagnostik/Behandlung

6= Ausgründung

7= essentielle Infrastruktur (z.B. Biomaterialbank)

DZL- Meilenstein- und Verwertungsplan zu chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD)

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start; ◆ major milestone/project complete						
COPD-F1: Differential contribution of fibroblast subtypes to alveolarization and neo-alveolarization – exploitation for novel treatment concepts of BPD and COPD (COPD basic science flagship project)						
COPD-F1: Identification of relevant cell types for alveolarization and neo-alveolarization in COPD and BPD; mapping of signaling pathways in these cells and verification in human tissue samples; testing of novel therapeutic approaches (Verwertung: 1, 2)	◆				◆	
ARCN: FZB						
CPC-M: HMGU						
CPC-M: KUM						
UGMLC: JLU						
UGMLC: MPI-BN						
COPD-F2: Role of soluble guanylate cyclase signaling in smoke-induced airway injury/emphysema and responsiveness to cGMP enhancing therapies (COPD translational flagship project)						
COPD-F2: Analysis of sGC regulation in CCSP-rtTAM2/LC1/floxed sGCβ1 mice after smoke exposure and in CSE exposed epithelial cells; clarification of the role of epithelial sGC/cGMP signaling in airway/alveolar epithelial homeostasis and smoke-induced injury; exploration of suitability for therapeutic intervention (Verwertung: 1)	◆				◆	
ARCN: CAU						
CPC-M: HMGU						
TLRC: RKU						1
UGMLC: JLU						
UGMLC: UMR						
COPD-F3: Deep phenotyping of COPD using imaging and biomarker correlation (COPD clinical flagship project)						
COPD-F3: Review of imaging biomarkers to be used in clinical DZL trials, and complete 2nd round of CT/MRI subtrial in COSYCONET cohort; final assessment of deep	◆				◆	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

DZL- Meilenstein- und Verwertungsplan zu Cystischer Fibrose (CF)

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start; ◆ major milestone/project complete						
CF-F1. Evaluate alternative chloride channel SLC26A9 as a modifier and novel therapeutic target of cystic fibrosis (CF basic science flagship project)						
SLC26A9 in epithelial cell models will be studied; SLC26A9-deficient mice will be crossed with CF mouse models; initiation of genetic and functional studies in CF patients, preclinical studies in mouse models, genetic and functional studies in CF patients (Verwertung: 1, 3)	◆				◆	
BREATH: MHH						
TLRC: RKU						1
CF-F2. Elucidation of the pathogenetic role of the microbial metagenome in cystic fibrosis (CF) lung disease (CF translational flagship project)						
Establishment of a pipeline for microbial metagenomics and technology implementation at all DZL sites; studies on relationship between the CF airways' microbial metagenome and CF lung disease including impact of standard antimicrobial therapy and topical therapy of the sinonasal niche (Verwertung: 1, 3)	◆				◆	
BREATH: MHH						
TLRC: RKU						1,7
UGMLC: JLU						
CF-F3. Randomized, double-blind, controlled studies on safety and efficacy of preventive inhalation of hypertonic saline in infants with cystic fibrosis (PRESIS) (CF clinical flagship project)						
In total 40 infants with CF already finished the 52 week pilot trial, with multi-center validation of morpho-functional MRI and infant MBW completed; PRESIS phase II trial including open label extension; if phase II positive, phase III trial will be initiated. (Verwertung: 1, 3, 4)	◆				◆	
ARCN: UKSH HL						
BREATH: MHH						
TLRC: RKU						1,5
UGMLC: JLU						
CF-1. Identify and validate CF modifiers and novel therapeutic targets in patient cohorts and animal models						
CF-1.1: Continue modifier studies in CF patients from European twin and sibling study and DZL CF cohorts including validation of previously identified candidates (CFTR locus haplotype, CD14, CD95, EHF, miR-148b, IFNGR1, IL1-R, SCNN1B, STAT3, TGFB1, TNFR1) by retrospective and prospective assessment of survivor effects and lung disease severity (Verwertung: 1)	◆				◆	
BREATH: MMH						
TLRC: RKU						

[illegible]

DZL- Meilenstein- und Verwertungsplan zu Pneumonie/ARDS (ALI)

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start ◆ major milestone/project complete						
ALI-F1 Nasopharyngeal colonization approaches as preventive strategies against invasive pneumococcal disease (ALI basic science flagship project)						
Spn FISHing in nasopharyngeal compartment; studying the effects of immune cell depletion on colonization-induced adaptive immunity; antimicrobial peptide screening against colonizing Spn; initiation of peptide efficacy screening in two-hit Spn/IAV infection model (Verwertung 1)	◆				◆	
BREATH: MHH						
UGMLC: JLU						
ALI-F2 Targeting regeneration programs and cellular interactions in lung stem cell niches for repair after infection-induced injury (ALI translational flagship project)						
Establishment of optimized dose and time schedules for inhaled growth factor interventions (e.g. FGF10) in mouse pneumonia models for first-in-man clinical trials; definition of effects of intratracheal MSC/(iPSC)-derived macrophage cell therapies on lung stem cell niches in pneumonia models; establishment of dose/time schedules of preclinical MSC/iPSC-derived macrophage applications in order to start clinical proof-of concept trials (based on established GFP platforms) (Verwertung 1, 2,3)	◆				◆	
BREATH: MHH						
CPC-M: HMGU						
CPC-M: KUM						
UGMLC: JLU						
UGMLC: MPI-BN						
ALI-F3 Systematic analyses of GM-CSF-induced host defense and repair signatures in alveolar and circulating innate immune cells from patients included in the GI-HOPE study (GI-HOPE-SIG) (ALI clinical flagship project)						
Analysis of transcriptomic/miRNomic/proteomic signatures in peripheral blood/BALF samples of GI-HOPE study patients, including bioinformatic analysis and pathway modeling (Verwertung 1, 5)	◆				◆	
BREATH: MHH						
UGMLC: JLU						
ALI-1 Role of cell-intrinsic pattern (microbes, damage) recognition receptor (PRR) signaling cross talk in shaping lung immune responses						
ALI-1.1 Signal integration of multiple PAMP/DAMP- and cytokine- induced signaling pathways and resulting gene regulatory events determining quality and quantity of the host immune response (e.g. discrimination between pathogens and commensal microbes) (Verwertung 1)	◆				◆	
ARCN: UKSH HL						
BREATH: MHH						
CPC-M: KUM						
TLRC: RKU						1
UGMLC: JLU						
ALI-1.2 Pathogen evasion strategies to circumvent/exploit host defenses (Verwertung 1)	◆				◆	
BREATH: MHH						
UGMLC: JLU						

ALI-4 Novel protein-based immunization strategies and non-antibiotic targets for ALI prevention and treatment									
ALI-4.1 Target identification in host immune pathways for new vaccines and adjunctive therapies for highly pathogenic and multi- or pan-antibiotic resistant lung infection:									
ALI-4.1.1 Development of novel adjuvant formulations/strategies for next-generation vaccines (Verwertung 1, 2, 3)	◆							◆	
BREATH: MHH									
ALI-4.1.2 Use of MS-based proteomics/metabolomics screens of nasal wash fluids from colonized mice and pneumococcal pneumonia patients to identify antimicrobial peptides supporting pneumococcal decolonization (Verwertung 1, 2)		◆						◆	
BREATH: MHH									
ALI-4.1.3 Use of innate immune response stimuli (e.g. by PRR agonists) to foster host defenses in pneumonia (Verwertung 1, 2)		◆						◆	
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU									
ALI-5 Preclinical/clinical development of local-progenitor/stem cell-based ALI repair strategies									
ALI-5.1 Dissection of regeneration programs in various lung stem cells and identification of the cellular interactions (e.g. with mesenchyme or immune cells) in their niches in lung infection models (Verwertung 1)	◆							◆	
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU									
ALI-5.2 Mechanisms of pathogen-induced lung tissue regeneration failure and its therapeutic reversal (Verwertung 1,2)	◆							◆	
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU									
ALI-5.3 Exploitation of identified signaling pathways (e.g. FGF-receptor-dependent; Wnt-dependent) to promote alveolar repair in pneumonia models (Verwertung 1, 2, 3)			◆						◆
CPC-M: HMGU									
UGMLC: JLU									
ALI-5.4 MSC(re)-programming and tuning by e.g. antagomirs/mi-R mimics (Verwertung 1)			◆						◆
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU									
ALI-5.5 Establishment of clinical study protocols involving different routes of MCS donation (Verwertung 3, 4)					◆				◆
ARCN: UKSH HL									
BREATH: MHH									
CPC-M: HMGU									
CPC-M: KUM									
UGMLC: JLU									
ALI-6 Phase II/III clinical trials of inhalation based adjunctive ALI therapies (GM-CSF; FGF10) and antibiotics in COPD exacerbation – signature analysis in large patient cohorts (CAPNETZ, PROGRESS) to identify novel biomarkers									
ALI-6.1 Systems medicine analysis of omics-data in nationwide patient cohorts to identify prognostic/ predictive signatures and their verification in confirmative cohort studies (e.g. as part of CAPNETZ) (Verwertung 1)			◆						◆
ARCN: UKSH HL									

DZL-Meilenstein- und Verwertungsplan zu Interstitielle (diffuse parenchymatöse) Lungenerkrankungen (DPLD)

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start; ◆ major milestone/project complete						
DPLD-F1: Cell-specific functional analysis of MUC5B genotypes in IPF (DPLD basic science flagship project)						
Characterization of MUC5B genotype-specific primary cell isolates (alveolar type II cells, fibroblasts), iPS cell generation and differentiation into epithelial cell lineages and lung organoids (Verwertung: 1,3)	◆				◆	
BREATH: MHH, ITEM						
CPC-M: HMGU						
CPC-M: KUM						
CPC-M: ASK						
TLRC: Thoraxklinik						
UGMLC: JLU						
DPLD-F2: Profiling peripheral biomarkers and inflammatory cell subsets in IPF (DPLD translational flagship project)						
Whole proteome sequencing of BAL and plasma and NGS of MDSCs and monocytes in IPF subjects, alongside with systems biology integration (Verwertung: 1,2,3,6)	◆				◆	
ARCN: Ghd						
CPC-M: HMGU						
CPC-M: KUM						
CPC-M: ASK						
TLRC: Thoraxklinik						
UGMLC: JLU						
DPLD-F3: Assessment of efficacy of pirfenidone in non-IPF DPLD (DPLD clinical flagship project)						
Prospective randomized controlled trial of oral pirfenidone vs placebo in patients with non-IPF lung fibrosis (collagen/vascular disease-LF, asbestos-induced LF, hypersensitivity pneumonia, fibrotic NSIP) (Verwertung: 1,4,5)	◆			◆		
ARCN: Ghd						
BREATH: MHH						
CPC-M: KUM						
CPC-M: ASK						
TLRC: Thoraxklinik						
UGMLC: JLU						
DPLD-1. Uniform unbiased patient biosampling and high-throughput analysis of tissues, cell populations and single cells of DPLD cohorts						
DPLD-1 Prospective biosampling, phenotypic characterization and profiling using genetics, epigenetics, genomics, and proteomics for biomarker development and patient (Verwertung: 1)	◆			◆		
ARCN: Ghd						
BREATH: MHH						
CPC-M: HMGU						

[illegible]

DPLD-9.1. Defining the cost efficacy of novel IPF therapies (nintedanib and pirfenidone) (Verwertung: 1,5)		◆				◆	
ARCN: Ghd							
CPC-M: HMGU							
CPC-M: KUM							
CPC-M: ASK							
TLRC: Thoraxklinik							
UGMLC: JLU							
DPLD-9.2. Defining the cost efficacy of lung transplantation in IPF (Verwertung: 1,5)		◆				◆	
ARCN: Ghd							
BREATH: MHH							
CPC-M: HMGU							
CPC-M: KUM							
CPC-M: ASK							
TLRC: Thoraxklinik							
UGMLC: JLU							

DZL-Meilenstein- und Verwertungsplan zu PH

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start ◆ major milestone/project complete						
PH-F1 Evaluation of Wnt/β-catenin mediated (fibro)-proliferative responses in Pulmonary Hypertension (PH) (PH basic science flagship project)						
Analysis of functional role and molecular targets of Wnt/β-catenin signaling in experimental and human PH and RVH fibroblasts; investigation of Wnt/β-catenin pathway contribution to the development of PH and RVH (Verwertung 1)	◆				◆	
BREATH: MHH						
CPC-M: HMGU						
UGMLC: JLU						
UGMLC: MPI-BN						
PH-F2 Evaluation of MAPK Kinase inhibition as novel therapeutic strategy in Pulmonary Hypertension (PH) in preclinical models (PH translational flagship project)						
Analysis of p38 MAPK regulation with upstream and downstream signaling in experimental and human PH/RV hypertrophy; studies probing the role of p38 MAPK interference in experimental models and experimental and human cell culture systems (Verwertung 1, 2, 3)	◆				◆	
BREATH: MHH						
CPC-M: HMGU						
CPC-M: KUM						
UGMLC: JLU						
PH-F3 Balloon pulmonary angioplasty (BPA) for patients with inoperable or persistent chronic thromboembolic pulmonary hypertension (PH clinical flagship project)						
Analysis of cumulative outcome data (survival, hemodynamics, exercise capacity, predefined criteria of clinical worsening, biomarkers) and case-control analysis; responder analysis based on long-term survival and predefined improvement criteria; randomized controlled study: medical treatment plus/minus BPA in inoperable CTEPH (Verwertung 1, 3, 4)	◆				◆	
BREATH: MHH						
CPC-M: KUM						
UGMLC: JLU						
PH-1 Identification and characterization of key molecular and cellular players driving maladaptive vascular remodeling in PAH						
PH-1.1 RNAseq and DNA methylome analysis in lung vascular cells and blood samples from PAH patients to gain disease specific information (Verwertung 1)	◆				◆	
BREATH: MHH						
UGMLC: MPI-BN						
TLRC: Thoraxklinik						
TLRC: RKU						(1)
PH-1.2 Exploration of the PAH Notch profile and evaluation of Notch inhibition as novel therapeutic strategy in PAH (Verwertung 1)	◆			◆		
UGMLC: MPI-BN						

[illegible]

PH-3.3 Interference with/harnessing of peptidergic signaling (big-endothelin, natriuretic peptides) as novel therapeutic concept (Verwertung 1,3)	◆							◆	
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU									
PH-3.4 Employment of antagomirs/miR-mimics targeting miR-21 and miR-155 for treatment of PH (Verwertung 1,2, 3)	◆						◆		
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU, MPI-BN									
PH-3.5 Analysis and exploitation of epigenetic mechanisms and signaling cascades underlying the beneficial effects of chronic exercise training in PH (Verwertung 1,5)	◆						◆		
TLRC: Thoraxklinik									
UGMLC: JLU									
PH-3.6 Employment of gene-editing technologies to manufacture iPS-derived endothelial cells with reverse-remodeling potency (e.g. enhanced BMPR2 signaling) (Verwertung 1,2)			◆					◆	
BREATH: MHH									
UGMLC: JLU, MPI-BN									
PH-3.7 Manipulation of morphogenetic pathways (Wnt signaling, Notch signaling) as novel therapeutic strategies in PH (Verwertung 1,2)			◆					◆	
CPC-M: HMGU									
UGMLC: JLU									
UGMLC: MPI-BN									
PH-4 Profiling different classes of PH for phenotypic commonalities/differences and responsiveness to therapy, utilizing large scaled biobanks and comprehensive databases									
PH-4.1 Further extension of the COMPERA and Giessen PH registries – link with other large international PH registries (Verwertung 1, 7)		◆						◆	
ARCN: FZB									
BREATH: MHH									
CPC-M: KUM									
CPC-M: ASK									
TLRC: Thoraxklinik									
UGMLC: JLU									
PH-4.2 Search for novel biomarkers (peptides, miRome, microvesicles) discriminating between the different classes of PH (Verwertung 1,2,3,5)	◆						◆		
ARCN: FZB									
BREATH: MHH									
CPC-M: KUM, ASK, HMGU									
CPC-M: ASK									
CPC-M: HMGU									
TLRC: Thoraxklinik									
UGMLC:JLU									
PH-4.3 Search for novel biomarkers (peptides, miRome, microvesicles) predicting response to single therapies or combination therapies (Verwertung 1,2,3,5)	◆							◆	

DZL-Meilenstein- und Verwertungsplan zu Lungenkrebs (LC)

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start; ◆ major milestone/project complete						
LC-F1. Unravelling mechanisms contributing to deregulated TGF-β signaling in lung cancer and the impact on therapy resistance (LC basic science flagship project)						
Mechanisms mediating BAMBI down-regulation and impact of p53 mutations and EGFR mutations on TGF-β signaling in preclinical models; Impact of TGF-β on LC progression and personalized treatment options to reduce therapy resistance (Verwertung: 1, 2, 3)	◆				◆	
ARCN: FZB						
ARCN: Ghd						
ARCN: UKSH KI						
CPC-M: KUM						
CPC-M: HMGU						
TLRC: DKFZ						
TLRC: Thoraxklinik						
TLRC: RKU						0
UGMLC: UMR						
LC-F2. Molecular mechanisms of epigenetic deregulation in lung cancer and its utility for clinical translation (LC translational flagship project)						
DNA methylation analysis in the <i>in vitro</i> environment model; selection of loci to be included into the diagnostic panel (genetic/epigenetic alterations) and appropriate assays; validation of the biomarker panel(s); unraveling mechanisms of epigenetic re-patterning mediated by gene mutations in epigenetic enzymes; joint data analyses (primary tissues, <i>in vitro</i> model system, clinical data) (Verwertung: 1, 2)	◆				◆	
ARCN: UKSH KI						
ARCN: FZB						
ARCN: Ghd						
CPC-M: HMGU						
CPC-M: ASK						
TLRC: DKFZ						
TLRC: Thoraxklinik						
LC-F3. Tackling resistance in ALK+ non-small cell lung cancer (NSCLC) by iterating replication damage with G1 arrest (INTERCALATE) (LC clinical flagship project)						
DZL <u>S</u> equential <u>B</u> iomaterial <u>A</u> cquisition (SBA) – cohort assembly approach will be utilized to explore longitudinally the advent and mechanisms of TKI-resistance (ALK ⁺ -SBA). A ctDNA-platform to track molecular patterns of resistance and early response capturing with novel imaging will be explored and established. In preclinical models the influence of chromosomal instability (CIN) on the occurrence of resistance and the optimization of timing of treatment to tackle the occurrence will be explored. Results will be utilized (a) to prospectively guide and assess efficacy of treatment in defined patient cohorts and (b) to design and implement an investigator initiated trial (IIT) tackling ALK+-TKI resistance. (Verwertung: 1, 5)	◆				◆	
ARCN: Ghd						
ARCN: UKSH KI						
BREATH: MHH						
CPC-M: KUM						

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

* competitive funds

	2016	2017	2018	2019	2020	VK
◆ project start; ◆ major milestone/project complete						
PLI-1 Imaging						
PLI-1.1 Framework/ continuous support of all platform Imaging projects by the central coordination office	◆				◆	
TLRC: RKU						7
PLI-1.2 Development and validation of Imaging Biomarkers/ Definition of standardized imaging read-outs as endpoints or surrogates/ Implementation of imaging biomarkers in prospective DZL-trials	◆				◆	
ARCN: FZB						
ARCN: UzL						
BREATH: MHH						
BREATH: LUH						
BREATH: ITEM						
CPC-M: KUM						
TLRC: RKU						1
TLRC: Thoraxklinik						
TLRC: EMBL						
UGMLC: JLU						
UGMLC: UMR						
PLI-1.3 Education/ Webinars on how to use imaging and imaging biomarkers for cross-center training activities	◆				◆	
ARCN: FZB						
ARCN: UzL						
BREATH: MHH						
BREATH: ITEM						
CPC-M: KUM						
TLRC: RKU						0
TLRC: Thoraxklinik						
TLRC: EMBL						
UGMLC: JLU						
UGMLC: UMR						
PLI-1.4 (2016-2018) Compilation of image-based results from projects on "Growing and ageing of airways and vessels (GAVA)"/ Identification of studies and projects related to GAVA/ Review of imaging technology and imaging biomarkers/Organization of GAVA workshops to discuss results and draft papers	◆				◆	

Appendix 2 Publikationen des DZL-Partners UKHD / RKU 2016 – 2020

2016

1. Babu K R, Muckenthaler M U. miR-20a regulates expression of the iron exporter ferroportin in lung cancer. *J Mol Med (Berl)*, 2016; **94**(3): p. 347-59.
2. Baroke E, Heussel C P, Warth A, Eichinger M, Oltmanns U, Palmowski K, Herth F J, Kreuter M. Pleuroparenchymal fibroelastosis in association with carcinomas. *Respirology*, 2016; **21**(1): p. 191-4.
3. Boskamp T, Lachmund D, Oetjen J, Cordero Hernandez Y, Trede D, Maass P, Casadonte R, Kriegsmann J, Warth A, Dienemann H, Weichert W, Kriegsmann M. A new classification method for MALDI imaging mass spectrometry data acquired on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Biochim Biophys Acta*, 2016.
4. Chung J H, Huitt G, Yagihashi K, Hobbs S B, Faino A V, Bolster B D, Jr., Biederer J, Puderbach M, Lynch D A. Proton Magnetic Resonance Imaging for Initial Assessment of Isolated Mycobacterium avium Complex Pneumonia. *Ann Am Thorac Soc*, 2016; **13**(1): p. 49-57.
5. Dalpke A, Zimmermann S, Schnitzler P. Underdiagnosing of Mycoplasma pneumoniae infections as revealed by use of a respiratory multiplex PCR panel. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016; **86**(1): p. 50-2.
6. Davids B, Gross J, Berger M M, Baloglu E, Bartsch P, Mairbaur H. Inhibition of alveolar Na transport and LPS causes hypoxemia and pulmonary arterial vasoconstriction in ventilated rats. *Physiol Rep*, 2016; **4**(18).
7. Farrell P M, Sommerburg O. Toward quality improvement in cystic fibrosis newborn screening: Progress and continuing challenges. *J Cyst Fibros*, 2016; **15**(3): p. 267-9.
8. Firnkorn D, Merker S, Ganzinger M, Muley T, Knaup P. Unlocking Data for Statistical Analyses and Data Mining: Generic Case Extraction of Clinical Items from i2b2 and tranSMART. *Stud Health Technol Inform*, 2016; **228**: p. 567-71.
9. Flechsig P, Choyke P, Kratochwil C, Warth A, Antoch G, Holland Letz T, Rath D, Eichwald V, Huber P E, Kauczor H U, Haberkorn U, Giesel F L. Increased x-ray attenuation in malignant vs. benign mediastinal nodes in an orthotopic model of lung cancer. *Diagn Interv Radiol*, 2016; **22**(1): p. 35-9.
10. Flechsig P, Kratochwil C, Warth A, Rath D, Eichwald V, Huber P E, Kauczor H U, Haberkorn U, Giesel F L. A Comparison of microCT and microPET for Evaluating Lymph Node Metastasis in a Rat Model. *Mol Imaging Biol*, 2016; **18**(2): p. 243-8.
11. Forde E, Schutte A, Reeves E, Greene C, Humphreys H, Mall M, Fitzgerald-Hughes D, Devocelle M. Differential In Vitro and In Vivo Toxicities of Antimicrobial Peptide Prodrugs for Potential Use in Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016; **60**(5): p. 2813-21.
12. Fritzsche B, Hagner M, Dai L, Christochowicz S, Agrawal R, van Bodegom C, Schmidt S, Schatterny J, Hirtz S, Brown R, Goritzka M, Duerr J, Zhou-Suckow Z, Mall M A. Impaired mucus clearance exacerbates allergen-induced type 2 airway inflammation in juvenile mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2016.
13. Gdynia G, Sauer S W, Kopitz J, Fuchs D, Duglova K, Ruppert T, Miller M, Pahl J, Cerwenka A, Enders M, Mairbaur H, Kaminski M M, Penzel R, Zhang C, Fuller J C, Wade R C, Benner A, Chang-Claude J, Brenner H, Hoffmeister M, Zentgraf H, Schirmacher P, Roth W. The HMGB1 protein induces a metabolic type of tumour cell death by blocking aerobic respiration. *Nat Commun*, 2016; **7**: p. 10764.

14. Hoffmann H, Junker K, Kugler C, Schnabel P A, Warth A. [Application and interpretation of the R classification for lung cancer : Results of a survey of certified lung cancer centers]. *Pathologe*, 2016; **37**(3): p. 258-68.
15. Jia J, Conlon T M, Ballester Lopez C, Seimetz M, Bednorz M, Zhou-Suckow Z, Weissmann N, Eickelberg O, Mall M A, Yildirim A O. Cigarette smoke causes acute airway disease and exacerbates chronic obstructive lung disease in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016; **311**(3): p. L602-10.
16. Karch A, Vogelmeier C, Welte T, Bals R, Kauczor H U, Biederer J, Heinrich J, Schulz H, Glaser S, Holle R, Watz H, Korn S, Adaskina N, Biertz F, Vogel C, Vestbo J, Wouters E F, Rabe K F, Sohler S, Koch A, Jorres R A, Group C S. The German COPD cohort COSYCONET: Aims, methods and descriptive analysis of the study population at baseline. *Respir Med*, 2016; **114**: p. 27-37.
17. Kirby M, van Beek E J, Seo J B, Biederer J, Nakano Y, Coxson H O, Parraga G. Management of COPD: Is there a role for quantitative imaging? *Eur J Radiol*, 2016.
18. Kreuter M, Ehlers-Tenenbaum S, Palmowski K, Bruhwylter J, Oltmanns U, Muley T, Heussel C P, Warth A, Kolb M, Herth F J. Impact of Comorbidities on Mortality in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS One*, 2016; **11**(3): p. e0151425.
19. Kreuter M, Kirsten D, Bahmer T, Penzel R, Claussen M, Ehlers-Tenenbaum S, Muley T, Palmowski K, Eichinger M, Leider M, Herth F J, Rabe K F, Bittmann I, Warth A. Screening for Helicobacter pylori in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Lung Biopsies. *Respiration*, 2016; **91**(1): p. 3-8.
20. Kriegsmann M, Casadonte R, Kriegsmann J, Dienemann H, Schirmacher P, Hendrik Kobarg J, Schwamborn K, Stenzinger A, Warth A, Weichert W. Reliable Entity Subtyping in Non-small Cell Lung Cancer by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry on Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Specimens. *Mol Cell Proteomics*, 2016; **15**(10): p. 3081-3089.
21. Kriegsmann M, Warth A. What is better/reliable, mitosis counting or Ki67/MIB1 staining? *Transl Lung Cancer Res*, 2016; **5**(5): p. 543-546.
22. Kubo T, Ohno Y, Nishino M, Lin P J, Gautam S, Kauczor H U, Hatabu H, i L s g. Low dose chest CT protocol (50 mAs) as a routine protocol for comprehensive assessment of intrathoracic abnormality. *Eur J Radiol Open*, 2016; **3**: p. 86-94.
23. Kubo T, Ohno Y, Seo J B, Yamashiro T, Kalender W A, Lee C H, Lynch D A, Kauczor H U, Hatabu H. Securing safe and informative thoracic CT examinations-Progress of radiation dose reduction techniques. *Eur J Radiol*, 2016.
24. Kubo T, Ohno Y, Takenaka D, Nishino M, Gautam S, Sugimura K, Kauczor H U, Hatabu H, i L s g. Standard-dose vs. low-dose CT protocols in the evaluation of localized lung lesions: Capability for lesion characterization-iLEAD study. *Eur J Radiol Open*, 2016; **3**: p. 67-73.
25. Lim H J, Weinheimer O, Wielputz M O, Dinkel J, Hielscher T, Gompelmann D, Kauczor H U, Heussel C P. Fully Automated Pulmonary Lobar Segmentation: Influence of Different Prototype Software Programs onto Quantitative Evaluation of Chronic Obstructive Lung Disease. *PLoS One*, 2016; **11**(3): p. e0151498.
26. Mainz J G, Schumacher U, Schadlich K, Hentschel J, Koitschev C, Koitschev A, Riethmüller J, Prenzel F, Sommerburg O, Wiedemann B, Staab D, Gleiber W, Fischer R, Beck J F, Arnold C, Cooperators. Sino nasal inhalation of isotonic versus hypertonic saline (6.0%) in CF patients with chronic rhinosinusitis - Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blind, controlled trial. *J Cyst Fibros*, 2016; **15**(6): p. e57-e66.
27. Mall M A. Unplugging Mucus in Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc*, 2016; **13 Suppl 2**: p. S177-85.

28. Mall M A, Stahl M, Graeber S Y, Sommerburg O, Kauczor H U, Wielputz M O. Early detection and sensitive monitoring of CF lung disease: Prospects of improved and safer imaging. *Pediatr Pulmonol*, 2016; **51**(S44): p. S49-S60.
29. Marwitz S, Depner S, Dvornikov D, Merkle R, Szczygiel M, Muller-Decker K, Lucarelli P, Wasch M, Mairbaur H, Rabe K F, Kugler C, Vollmer E, Reck M, Scheufele S, Kroger M, Ammerpohl O, Siebert R, Goldmann T, Klingmuller U. Downregulation of the TGFbeta Pseudoreceptor BAMBI in Non-Small Cell Lung Cancer Enhances TGFbeta Signaling and Invasion. *Cancer Res*, 2016; **76**(13): p. 3785-801.
30. Mijosek V, Lasitschka F, Warth A, Zabeck H, Dalpke A H, Weitnauer M. Endoplasmic Reticulum Stress Is a Danger Signal Promoting Innate Inflammatory Responses in Bronchial Epithelial Cells. *J Innate Immun*, 2016; **8**(5): p. 464-78.
31. Oltmanns U, Palmowski K, Wielputz M, Kahn N, Baroke E, Eberhardt R, Wege S, Wiebel M, Kreuter M, Herth F J, Mall M A. Optical coherence tomography detects structural abnormalities of the nasal mucosa in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2016; **15**(2): p. 216-22.
32. Pahn G, Skornitzke S, Schlemmer H P, Kauczor H U, Stiller W. Toward standardized quantitative image quality (IQ) assessment in computed tomography (CT): A comprehensive framework for automated and comparative IQ analysis based on ICRU Report 87. *Phys Med*, 2016; **32**(1): p. 104-15.
33. Petersen I, Warth A. Lung cancer: developments, concepts, and specific aspects of the new WHO classification. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016; **142**(5): p. 895-904.
34. Pfarr N, Penzel R, Klauschen F, Heim D, Brandt R, Kazdal D, Jesinghaus M, Herpel E, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, Endris V, Stenzinger A. Copy number changes of clinically actionable genes in melanoma, non-small cell lung cancer and colorectal cancer-A survey across 822 routine diagnostic cases. *Genes Chromosomes Cancer*, 2016; **55**(11): p. 821-33.
35. Pfarr N, Stenzinger A, Penzel R, Warth A, Dienemann H, Schirmacher P, Weichert W, Endris V. High-throughput diagnostic profiling of clinically actionable gene fusions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2016; **55**(1): p. 30-44.
36. Piel S, Kreuter M, Herth F, Kauczor H U, Heussel C P. [Pulmonary granulomatous diseases and pulmonary manifestations of systemic granulomatous disease : Including tuberculosis and nontuberculous mycobacteriosis]. *Radiologe*, 2016; **56**(10): p. 874-884.
37. Pusterla O, Bauman G, Wielputz M O, Nyilas S, Latzin P, Heussel C P, Bieri O. Rapid 3D in vivo 1H human lung respiratory imaging at 1.5 T using ultra-fast balanced steady-state free precession. *Magn Reson Med*, 2016.
38. Rengier F, Worz S, Melzig C, Ley S, Fink C, Benjamin N, Partovi S, von Tengg-Kobligh H, Rohr K, Kauczor H U, Grunig E. Automated 3D Volumetry of the Pulmonary Arteries based on Magnetic Resonance Angiography Has Potential for Predicting Pulmonary Hypertension. *PLoS One*, 2016; **11**(9): p. e0162516.
39. Rickert-Zacharias V, Schultz C, Mall M A. A Protease Inhibitor Tackles Epithelial Sodium Channels in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016; **194**(6): p. 650-2.
40. Rieber J, Deeg A, Ullrich E, Foerster R, Bischof M, Warth A, Schnabel P A, Muley T, Kappes J, Heussel C P, Welzel T, Thomas M, Steins M, Dienemann H, Debus J, Hoffmann H, Rieken S. Outcome and prognostic factors of postoperative radiation therapy (PORT) after incomplete resection of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 2016; **91**: p. 41-7.
41. Salomon J J, Spahn S, Wang X, Fullekrug J, Bertrand C A, Mall M A. Generation and functional characterization of epithelial cells with stable expression of SLC26A9 Cl- channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016; **310**(7): p. L593-602.

42. Scheel A H, Dietel M, Heukamp L C, Johrens K, Kirchner T, Reu S, Ruschoff J, Schildhaus H U, Schirmacher P, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Fischer R N, Wolf J, Buettner R. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol*, 2016; **29**(10): p. 1165-72.
43. Scheel A H, Dietel M, Heukamp L C, Johrens K, Kirchner T, Reu S, Ruschoff J, Schildhaus H U, Schirmacher P, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Fischer R N, Wolf J, Buettner R. [Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer : Current state of the art and experiences of the first German harmonization study]. *Pathologe*, 2016; **37**(6): p. 557-567.
44. Schneider M A, Muley T, Kahn N C, Warth A, Thomas M, Herth F J, Dienemann H, Meister M. Glycodelin is a potential novel follow-up biomarker for malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget*, 2016; **7**(44): p. 71285-71297.
45. Stahr C S, Samarage C R, Donnelley M, Farrow N, Morgan K S, Zosky G, Boucher R C, Siu K K, Mall M A, Parsons D W, Dubsky S, Fouras A. Quantification of heterogeneity in lung disease with image-based pulmonary function testing. *Sci Rep*, 2016; **6**: p. 29438.
46. von Laffert M, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, Buttner R, Huber R M, Wolf J, Griesinger F, Dietel M, Grohe C. [Statement of the German Society for Pathology and the working group thoracic oncology of the working group oncology/German Cancer Society on ALK testing in NSCLC: Immunohistochemistry and/or FISH?]. *Pathologe*, 2016; **37**(2): p. 187-91.
47. von Laffert M, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, Buttner R, Huber R M, Wolf J, Griesinger F, Dietel M, Grohe C. [ALK-Diagnostics in NSCLC - Immunohistochemistry (IHC) and/or Fluorescence-in-situ Hybridisation (FISH)]. *Pneumologie*, 2016; **70**(4): p. 277-81.
48. von Stackelberg O, Kauczor H U. [Lung cancer screening with thoracic X-ray and CT : Current situation]. *Radiologe*, 2016; **56**(9): p. 793-7.
49. Wagner C J, Schultz C, Mall M A. Neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 12 in cystic fibrosis lung disease. *Mol Cell Pediatr*, 2016; **3**(1): p. 25.
50. Warth A, Endris V, Stenzinger A, Penzel R, Harms A, Duell T, Abdollahi A, Lindner M, Schirmacher P, Muley T, Dienemann H, Fink L, Morresi-Hauf A, Pfarr N, Weichert W. Genetic changes of non-small cell lung cancer under neoadjuvant therapy. *Oncotarget*, 2016; **7**(20): p. 29761-9.
51. Warth A, Korner S, Penzel R, Muley T, Dienemann H, Schirmacher P, von Knebel-Doeberitz M, Weichert W, Kloor M. Microsatellite instability in pulmonary adenocarcinomas: a comprehensive study of 480 cases. *Virchows Arch*, 2016; **468**(3): p. 313-9.
52. Warth A, Langer F. [Report of the working group Thoracic Pathology of the German Pathological Society 2016]. *Pathologe*, 2016; **37**(Suppl 2): p. 253-255.
53. Warth A, Muley T, Harms A, Hoffmann H, Dienemann H, Schirmacher P, Weichert W. Clinical Relevance of Different Papillary Growth Patterns of Pulmonary Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2016; **40**(6): p. 818-26.
54. Weichert W, Kossakowski C, Harms A, Schirmacher P, Muley T, Dienemann H, Warth A. Proposal of a prognostically relevant grading scheme for pulmonary squamous cell carcinoma. *Eur Respir J*, 2016; **47**(3): p. 938-46.
55. Weidler S, Stopsack K H, Hammermann J, Sommerburg O, Mall M A, Hoffmann G F, Kohlmüller D, Okun J G, Macek M, Jr., Votava F, Krulisova V, Balascakova M, Skalicka V, Lee-Kirsch M A, Stopsack M. A product of immunoreactive trypsinogen and pancreatitis-associated protein as second-tier strategy in cystic fibrosis newborn screening. *J Cyst Fibros*, 2016; **15**(6): p. 752-758.
56. Weitnauer M, Mijosek V, Dalpke A H. Control of local immunity by airway epithelial cells. *Mucosal Immunol*, 2016; **9**(2): p. 287-98.

57. Wielputz M O, Eichinger M, Biederer J, Wege S, Stahl M, Sommerburg O, Mall M A, Kauczor H U, Puderbach M. Imaging of Cystic Fibrosis Lung Disease and Clinical Interpretation. *Rofo*, 2016; **188**(9): p. 834-45.
58. Wielputz M O, Mall M A. MRI accelerating progress in functional assessment of cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*, 2016.
59. Wujak L A, Blume A, Baloglu E, Wygrecka M, Wygowski J, Herold S, Mayer K, Vadasz I, Besuch P, Mairbaurl H, Seeger W, Morty R E. FX1D1 negatively regulates Na(+)/K(+)-ATPase activity in lung alveolar epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol*, 2016; **220**: p. 54-61.
60. Zimmer J, Weitnauer M, Boutin S, Kublbeck G, Thiele S, Walker P, Lasitschka F, Lunding L, Orinska Z, Vock C, Arnold B, Wegmann M, Dalpke A. Nuclear Localization of Suppressor of Cytokine Signaling-1 Regulates Local Immunity in the Lung. *Front Immunol*, 2016; **7**: p. 514.

2017

61. Altmann A, Sauter M, Roesch S, Mier W, Warta R, Debus J, Dyckhoff G, Herold-Mende C, Haberkorn U. Identification of a Novel ITGalphavbeta6-Binding Peptide Using Protein Separation and Phage Display. *Clin Cancer Res*, 2017; **23**(15): p. 4170-4180.
62. Barben J, Castellani C, Dankert-Roelse J, Gartner S, Kashirskaya N, Linnane B, Mayell S, Munck A, Sands D, Sommerburg O, Pybus S, Winters V, Southern K W. The expansion and performance of national newborn screening programmes for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*, 2017; **16**(2): p. 207-213.
63. Berger M M, Macholz F, Lehmann L, Dankl D, Hochreiter M, Bacher B, Bartsch P, Mairbaurl H. Remote ischemic preconditioning does not prevent acute mountain sickness after rapid ascent to 3,450 m. *J Appl Physiol (1985)*, 2017; **123**(5): p. 1228-1234.
64. Berger M M, Macholz F, Sareban M, Schmidt P, Fried S, Dankl D, Niebauer J, Bartsch P, Mairbaurl H. Inhaled budesonide does not prevent acute mountain sickness after rapid ascent to 4559 m. *Eur Respir J*, 2017; **50**(3).
65. Bernhardt D, Adeberg S, Bozorgmehr F, Opfermann N, Hoerner-Rieber J, König L, Kappes J, Thomas M, Herth F, Heussel C P, Warth A, Debus J, Steins M, Rieken S. Outcome and prognostic factors in patients with brain metastases from small-cell lung cancer treated with whole brain radiotherapy. *J Neurooncol*, 2017; **134**(1): p. 205-212.
66. Biederer J, Ohno Y, Hatabu H, Schiebler M L, van Beek E J, Vogel-Claussen J, Kauczor H U. Screening for lung cancer: Does MRI have a role? *Eur J Radiol*, 2017; **86**: p. 353-360.
67. Blaauwgeers H, Flieder D, Warth A, Harms A, Monkhurst K, Witte B, Thunnissen E. A Prospective Study of Loose Tissue Fragments in Non-Small Cell Lung Cancer Resection Specimens: An Alternative View to "Spread Through Air Spaces". *Am J Surg Pathol*, 2017; **41**(9): p. 1226-1230.
68. Boskamp T, Lachmund D, Oetjen J, Cordero Hernandez Y, Trede D, Maass P, Casadonte R, Kriegsmann J, Warth A, Dienemann H, Weichert W, Kriegsmann M. A new classification method for MALDI imaging mass spectrometry data acquired on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Biochim Biophys Acta*, 2017; **1865**(7): p. 916-926.
69. Boutin S, Dalpke A H. Acquisition and adaptation of the airway microbiota in the early life of cystic fibrosis patients. *Mol Cell Pediatr*, 2017; **4**(1): p. 1.
70. Boutin S, Depner M, Stahl M, Graeber S Y, Dittrich S A, Legatzki A, von Mutius E, Mall M, Dalpke A H. Comparison of Oropharyngeal Microbiota from Children with Asthma and Cystic Fibrosis. *Mediators Inflamm*, 2017; **2017**: p. 5047403.
71. Boutin S, Graeber S Y, Stahl M, Dittrich S A, Mall M A, Dalpke A H. Chronic but not intermittent infection with *Pseudomonas aeruginosa* is associated with global changes of the lung microbiome in cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 2017; **50**(4).

72. Boutin S, Hagenfeld D, Zimmermann H, El Sayed N, Hopker T, Greiser H K, Becher H, Kim T S, Dalpke A H. Clustering of Subgingival Microbiota Reveals Microbial Disease Ecotypes Associated with Clinical Stages of Periodontitis in a Cross-Sectional Study. *Front Microbiol*, 2017; **8**: p. 340.
73. Bubendorf L, Dafni U, Schobel M, Finn S P, Tischler V, Sejda A, Marchetti A, Thunnissen E, Verbeke E K, Warth A, Sansano I, Cheney R, Speel E J M, Nonaka D, Monkhorst K, Hager H, Martorell M, Savic S, Kerr K M, Tan Q, Tsourti Z, Geiger T R, Kammler R, Schulze K, Das-Gupta A, Shames D, Peters S, Stahel R A, Lungscape C. Prevalence and clinical association of MET gene overexpression and amplification in patients with NSCLC: Results from the European Thoracic Oncology Platform (ETOP) Lungscape project. *Lung Cancer*, 2017; **111**: p. 143-149.
74. Buschle L R, Kurz F T, Kampf T, Wagner W L, Duerr J, Stiller W, Konietzke P, Wunnemann F, Mall M A, Wielputz M O, Schlemmer H P, Ziener C H. Dephasing and diffusion on the alveolar surface. *Phys Rev E*, 2017; **95**(2-1): p. 022415.
75. Buzan M T A, Wetscherek A, Heussel C P, Kreuter M, Herth F J, Warth A, Kauczor H U, Pop C M, Dinkel J. Texture analysis using proton density and T2 relaxation in patients with histological usual interstitial pneumonia (UIP) or nonspecific interstitial pneumonia (NSIP). *PLoS One*, 2017; **12**(5): p. e0177689.
76. Costa da Silva M, Breckwoldt M O, Vinchi F, Correia M P, Stojanovic A, Thielmann C M, Meister M, Muley T, Warth A, Platten M, Hentze M W, Cerwenka A, Muckenthaler M U. Iron Induces Anti-tumor Activity in Tumor-Associated Macrophages. *Front Immunol*, 2017; **8**: p. 1479.
77. Dietz S, Harms A, Endris V, Eichhorn F, Kriegsmann M, Longuespee R, Stenzinger A, Sultmann H, Warth A, Kazdal D. Spatial distribution of EGFR and KRAS mutation frequencies correlates with histological growth patterns of lung adenocarcinomas. *Int J Cancer*, 2017; **141**(9): p. 1841-1848.
78. Elborn J S, Davies J, Mall M A, Flume P A, Plant B. Current strategies for the long-term assessment, monitoring, and management of cystic fibrosis patients treated with CFTR modulator therapy. *J Cyst Fibros*, 2017; **16**(1): p. 163-164.
79. Fahndrich S, Biertz F, Karch A, Kleibrink B, Koch A, Teschler H, Welte T, Kauczor H U, Janciauskiene S, Jorres R A, Greulich T, Vogelmeier C F, Bals R, investigators C. Cardiovascular risk in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respir Res*, 2017; **18**(1): p. 171.
80. Flechsig P, Frank P, Kratochwil C, Antoch G, Rath D, Moltz J, Rieser M, Warth A, Kauczor H U, Schwartz L H, Haberkorn U, Giesel F L. Radiomic Analysis using Density Threshold for FDG-PET/CT-Based N-Staging in Lung Cancer Patients. *Mol Imaging Biol*, 2017; **19**(2): p. 315-322.
81. Fritzsche B, Hagner M, Dai L, Christochowitz S, Agrawal R, van Bodegom C, Schmidt S, Schatterny J, Hirtz S, Brown R, Goritzka M, Duerr J, Zhou-Suckow Z, Mall M A. Impaired mucus clearance exacerbates allergen-induced type 2 airway inflammation in juvenile mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2017; **140**(1): p. 190-203 e5.
82. Gao J W, Rizzo S, Ma L H, Qiu X Y, Warth A, Seki N, Hasegawa M, Zou J W, Li Q, Femia M, Lv T F, Song Y, written on behalf of the A M E L C C G. Pulmonary ground-glass opacity: computed tomography features, histopathology and molecular pathology. *Transl Lung Cancer Res*, 2017; **6**(1): p. 68-75.
83. Gautschi O, Milia J, Filleron T, Wolf J, Carbone D P, Owen D, Camidge R, Narayanan V, Doebele R C, Besse B, Remon-Masip J, Janne P A, Awad M M, Peled N, Byoung C C, Karp D D, Van Den Heuvel M, Wakelee H A, Neal J W, Mok T S K, Yang J C H, Ou S I, Pall G, Froesch P, Zalcman G, Gandara D R, Riess J W, Velcheti V, Zeidler K, Diebold J, Fruh M, Michels S, Monnet I, Popat S, Rosell R, Karachaliou N, Rothschild S I, Shih J Y, Warth A, Muley T, Cabillic F, Mazieres J, Drilon A. Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry. *J Clin Oncol*, 2017; **35**(13): p. 1403-1410.

84. Giesel F L, Schneider F, Kratochwil C, Rath D, Moltz J, Holland-Letz T, Kauczor H U, Schwartz L H, Haberkorn U, Flechsig P. Correlation Between SUVmax and CT Radiomic Analysis Using Lymph Node Density in PET/CT-Based Lymph Node Staging. *J Nucl Med*, 2017; **58**(2): p. 282-287.
85. Guo M, Tomoshige K, Meister M, Muley T, Fukazawa T, Tsuchiya T, Karns R, Warth A, Fink-Baldauf I M, Nagayasu T, Naomoto Y, Xu Y, Mall M A, Maeda Y. Gene signature driving invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *EMBO Mol Med*, 2017; **9**(4): p. 462-481.
86. Haberkorn U, Mier W, Kopka K, Herold-Mende C, Altmann A, Babich J. Identification of Ligands and Translation to Clinical Applications. *J Nucl Med*, 2017; **58**(Suppl 2): p. 27S-33S.
87. Hahn A, Faulhaber J, Srisawang L, Stortz A, Salomon J J, Mall M A, Frings S, Mohrlen F. Cellular distribution and function of ion channels involved in transport processes in rat tracheal epithelium. *Physiol Rep*, 2017; **5**(12).
88. Harms A, Kriegsmann M, Fink L, Langer F, Warth A. [The new TNM classification for lung tumors : Changes and the assessment of multiple tumor foci]. *Pathologe*, 2017; **38**(1): p. 11-20.
89. Herpel E, Rieker R J, Dienemann H, Muley T, Meister M, Hartmann A, Warth A, Agaimy A. SMARCA4 and SMARCA2 deficiency in non-small cell lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens. *Ann Diagn Pathol*, 2017; **26**: p. 47-51.
90. Horner-Rieber J, Bernhardt D, Dern J, König L, Adeberg S, Paul A, Heussel C P, Kappes J, Hoffmann H, Herth F J P, Debus J, Warth A, Rieken S. Histology of non-small cell lung cancer predicts the response to stereotactic body radiotherapy. *Radiother Oncol*, 2017; **125**(2): p. 317-324.
91. Hwang H J, Hoffman E A, Lee C H, Goo J M, Levin D L, Kauczor H U, Seo J B. The role of dual-energy computed tomography in the assessment of pulmonary function. *Eur J Radiol*, 2017; **86**: p. 320-334.
92. Kauczor H U, Heussel C P, von Stackelberg O. Time to take CT screening to the next level? *Eur Respir J*, 2017; **49**(4).
93. Kazdal D, Harms A, Endris V, Penzel R, Kriegsmann M, Eichhorn F, Muley T, Stenzinger A, Pfarr N, Weichert W, Warth A. Prevalence of somatic mitochondrial mutations and spatial distribution of mitochondria in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2017; **117**(2): p. 220-226.
94. Kerr K M, Dafni U, Schulze K, Thunnissen E, Bubendorf L, Hager H, Finn S, Biernat W, Vliegen L, Losa J H, Marchetti A, Cheney R, Warth A, Speel E J, Blackhall F, Monkhorst K, Jantus Lewintre E, Tischler V, Clark C, Bertran-Alamillo J, Meldgaard P, Gately K, Wrona A, Vandenberghe P, Filip E, De Luca G, Savic S, Muley T, Smit E F, Dingemans A C, Priest L, Baas P, Camps C, Weder W, Polydoropoulou V, Geiger T R, Kammler R, Sumiyoshi T, Molina M A, Shames D S, Stahel R A, Peters S, Consortium E L. Prevalence and clinical association of gene mutations through Multiplex Mutation Testing in patients with NSCLC: Results from the ETOP Lungscape Project. *Ann Oncol*, 2017.
95. Kirby M, van Beek E J R, Seo J B, Biederer J, Nakano Y, Coxson H O, Parraga G. Management of COPD: Is there a role for quantitative imaging? *Eur J Radiol*, 2017; **86**: p. 335-342.
96. Kriegsmann M, Longuespee R, Wandernoth P, Mohanu C, Lisenko K, Weichert W, Warth A, Dienemann H, De Pauw E, Katzenberger T, Aust D, Baretton G, Kriegsmann J, Casadonte R. Typing of colon and lung adenocarcinoma by high throughput imaging mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 2017; **1865**(7): p. 858-864.
97. Kubo T, Ohno Y, Seo J B, Yamashiro T, Kalender W A, Lee C H, Lynch D A, Kauczor H U, Hatabu H. Securing safe and informative thoracic CT examinations-Progress of radiation dose reduction techniques. *Eur J Radiol*, 2017; **86**: p. 313-319.

98. Kumar V, Fleming T, Terjung S, Gorzelanny C, Gebhardt C, Agrawal R, Mall M A, Ranzinger J, Zeier M, Madhusudhan T, Ranjan S, Isermann B, Liesz A, Deshpande D, Haring H U, Biswas S K, Reynolds P R, Hammes H P, Peperkok R, Angel P, Herzig S, Nawroth P P. Homeostatic nuclear RAGE-ATM interaction is essential for efficient DNA repair. *Nucleic Acids Res*, 2017; **45**(18): p. 10595-10613.
99. Leichsenring J, Volckmar A L, Magios N, Morais de Oliveira C M, Penzel R, Brandt R, Kirchner M, Bozorgmehr F, Thomas M, Schirmacher P, Warth A, Endris V, Stenzinger A. Synonymous EGFR variant p.Q787Q is neither prognostic nor predictive in patients with lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2017; **56**(3): p. 214-220.
100. Letovanec I, Finn S, Zygoura P, Smyth P, Soltermann A, Bubendorf L, Speel E J, Marchetti A, Nonaka D, Monkhurst K, Hager H, Martorell M, Sejda A, Cheney R, Hernandez-Losa J, Verbeke E, Weder W, Savic S, Di Lorito A, Navarro A, Felipe E, Warth A, Baas P, Meldgaard P, Blackhall F, Dingemans A M, Dienemann H, Dziadziuszko R, Vansteenkiste J, O'Brien C, Geiger T, Sherlock J, Schageman J, Dafni U, Kammler R, Kerr K, Thunnissen E, Stahel R, Peters S, Consortium E L. Evaluation of NGS and RT-PCR methods for ALK rearrangement in European NSCLC patients: Results from the ETOP Lungscape Project. *J Thorac Oncol*, 2017.
101. Leutz-Schmidt P, Weinheimer O, Jobst B J, Dinkel J, Biederer J, Kauczor H U, Puderbach M U, Wielpütz M O. Influence of exposure parameters and iterative reconstruction on automatic airway segmentation and analysis on MDCT-An ex vivo phantom study. *PLoS One*, 2017; **12**(8): p. e0182268.
102. Li H, Salomon J J, Sheppard D N, Mall M A, Galletta L J. Bypassing CFTR dysfunction in cystic fibrosis with alternative pathways for anion transport. *Curr Opin Pharmacol*, 2017; **34**: p. 91-97.
103. Livraghi-Butrico A, Wilkinson K J, Volmer A S, Gilmore R C, Rogers T D, Caldwell R A, Burns K A, Esther C R, Jr., Mall M A, Boucher R C, O'Neal W K, Grubb B R. Lung disease phenotypes caused by over-expression of combinations of alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel in mouse airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017: p. ajplung 00382 2017.
104. Loktev A, Haberkorn U, Mier W. Multicyclic Peptides as Scaffolds for the Development of Tumor Targeting Agents. *Curr Med Chem*, 2017; **24**(20): p. 2141-2155.
105. Mall M A, Hwang T C, Brakman I. Cystic fibrosis research topics featured at the 14th ECFS Basic Science Conference: Chairman's summary. *J Cyst Fibros*, 2017.
106. Mann P, Witte M, Moser T, Lang C, Runz A, Johnen W, Berger M, Biederer J, Karger C P. 3D dosimetric validation of motion compensation concepts in radiotherapy using an anthropomorphic dynamic lung phantom. *Phys Med Biol*, 2017; **62**(2): p. 573-595.
107. Milewski D, Balli D, Ustiyani V, Le T, Dienemann H, Warth A, Breuhahn K, Whitsett J A, Kalinichenko V V, Kalin T V. FOXM1 activates AGR2 and causes progression of lung adenomas into invasive mucinous adenocarcinomas. *PLoS Genet*, 2017; **13**(12): p. e1007097.
108. Montgomery S T, Mall M A, Kicic A, Stick S M, Arest C F. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: mechanisms and potential therapies. *Eur Respir J*, 2017; **49**(1).
109. Muller J, Lim H J, Eichinger M, Jobst B J, Eberhardt R, Gompelmann D, Koenigkam-Santos M, Puderbach M, Kauczor H U, Heussel C P, Wielpütz M O. Influence of fissure integrity on quantitative CT and emphysema distribution in emphysema-type COPD using a dedicated COPD software. *Eur J Radiol*, 2017; **95**: p. 293-299.
110. Nattenmüller J, Wochner R, Muley T, Steins M, Hummler S, Teucher B, Wiskemann J, Kauczor H U, Wielpütz M O, Heussel C P. Prognostic Impact of CT-Quantified Muscle and Fat Distribution before and after First-Line-Chemotherapy in Lung Cancer Patients. *PLoS One*, 2017; **12**(1): p. e0169136.

111. Neves J, Leitz D, Kraut S, Brandenberger C, Agrawal R, Weissmann N, Muhlfeld C, Mall M A, Altamura S, Muckenthaler M U. Disruption of the Hecpudin/Ferroportin Regulatory System Causes Pulmonary Iron Overload and Restrictive Lung Disease. *EBioMedicine*, 2017; **20**: p. 230-239.
112. Ng Kuet Leong N, Brombacher F, Dalpke A H, Weitnauer M. Crosstalk between glucocorticoids and IL-4 modulates Ym1 expression in alternatively activated myeloid cells. *Immunobiology*, 2017; **222**(5): p. 759-767.
113. Oudkerk M, Devaraj A, Vliegenthart R, Henzler T, Prosch H, Heussel C P, Bastarrika G, Sverzellati N, Mascalchi M, Delorme S, Baldwin D R, Callister M E, Becker N, Heuvelmans M A, Rzyman W, Infante M V, Pastorino U, Pedersen J H, Paci E, Duffy S W, de Koning H, Field J K. European position statement on lung cancer screening. *Lancet Oncol*, 2017; **18**(12): p. e754-e766.
114. Petersen I, Dietel M, Geilenkeuser W J, Mireskandari M, Weichert W, Steiger K, Scheel A H, Buttner R, Schirmacher P, Warth A, Lasitschka F, Schildhaus H U, Kirchner T, Reu S, Kreipe H, Langer F, Tiemann M, Schulte C, Johrens K. EGFR immunohistochemistry as biomarker for antibody-based therapy of squamous NSCLC - Experience from the first ring trial of the German Quality Assurance Initiative for Pathology (QuIP((R))). *Pathol Res Pract*, 2017; **213**(12): p. 1530-1535.
115. Pusterla O, Bauman G, Wielputz M O, Nyilas S, Latzin P, Heussel C P, Bieri O. Rapid 3D in vivo 1H human lung respiratory imaging at 1.5 T using ultra-fast balanced steady-state free precession. *Magn Reson Med*, 2017; **78**(3): p. 1059-1069.
116. Safi S, Yamauchi Y, Rathinasamy A, Stamova S, Eichhorn M, Warth A, Rauch G, Dienemann H, Hoffmann H, Beckhove P. Functional T cells targeting tumor-associated antigens are predictive for recurrence-free survival of patients with radically operated non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2017; **6**(11): p. e1360458.
117. Sareban M, Perz T, Macholz F, Reich B, Schmidt P, Fried S, Mairbaurl H, Berger M M, Niebauer J. Reliability of echocardiographic speckle-tracking derived bi-atrial strain assessment under different hemodynamic conditions. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2017; **33**(11): p. 1685-1692.
118. Scheel A H, Baenfer G, Baretton G, Dietel M, Diezko R, Henkel T, Heukamp L C, Jasani B, Johrens K, Kirchner T, Lasitschka F, Petersen I, Reu S, Schildhaus H U, Schirmacher P, Schwamborn K, Sommer U, Stoss O, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Wolf J, Buttner R, Ruschoff J. Interlaboratory concordance of PD-L1 immunohistochemistry for non-small-cell lung cancer. *Histopathology*, 2017.
119. Schmidt L H, Stucke-Ring J, Brand C, Schliemann C, Harrach S, Muley T, Herpel E, Kessler T, Mohr M, Gorlich D, Kreuter M, Lenz G, Wardelmann E, Thomas M, Berdel W E, Schwoppe C, Hartmann W. CD13 as target for tissue factor induced tumor vascular infarction in small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2017; **113**: p. 121-127.
120. Schneider M A, Christopoulos P, Muley T, Warth A, Klingmueller U, Thomas M, Herth F J, Dienemann H, Mueller N S, Theis F, Meister M. AURKA, DLGAP5, TPX2, KIF11 and CKAP5: Five specific mitosis-associated genes correlate with poor prognosis for non-small cell lung cancer patients. *Int J Oncol*, 2017; **50**(2): p. 365-372.
121. Sommerburg O, Stahl M, Hammermann J, Okun J G, Kulozik A, Hoffmann G, Mall M. [Newborn Screening on Cystic Fibrosis in Germany: Comparison of the new Screening Protocol with an Alternative Protocol]. *Klin Padiatr*, 2017; **229**(2): p. 59-66.
122. Stahl M, Wielputz M O, Graeber S Y, Joachim C, Sommerburg O, Kauczor H U, Puderbach M, Eichinger M, Mall M A. Comparison of Lung Clearance Index and Magnetic Resonance Imaging for Assessment of Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017; **195**(3): p. 349-359.

123. Stanke F, Hector A, Hedtfeld S, Hartl D, Griese M, Tummler B, Mall M A. An informative intragenic microsatellite marker suggests the IL-1 receptor as a genetic modifier in cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 2017; **50**(6).
124. Taggart C, Mall M A, Lalmanach G, Cataldo D, Ludwig A, Janciauskiene S, Heath N, Meiners S, Overall C M, Schultz C, Turk B, Borensztajn K S. Protean proteases: at the cutting edge of lung diseases. *Eur Respir J*, 2017; **49**(2).
125. Thunnissen E, Borczuk A C, Flieder D B, Witte B, Beasley M B, Chung J H, Dacic S, Lantuejoul S, Russell P A, den Bakker M, Botling J, Brambilla E, de Cuba E, Geisinger K R, Hiroshima K, Marchevsky A M, Minami Y, Moreira A, Nicholson A G, Yoshida A, Tsao M S, Warth A, Duhig E, Chen G, Matsuno Y, Travis W D, Butnor K, Cooper W, Mino-Kenudson M, Motoi N, Poleri C, Pelosi G, Kerr K, Aisner S C, Ishikawa Y, Buettner R H, Keino N, Yatabe Y, Noguchi M. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *J Thorac Oncol*, 2017; **12**(2): p. 334-346.
126. Triphan S M, Jobst B J, Anjorin A, Sedlacek O, Wolf U, Terekhov M, Hoffmann C, Ley S, Duber C, Biederer J, Kauczor H U, Jakob P M, Wielputz M O. Reproducibility and comparison of oxygen-enhanced T1 quantification in COPD and asthma patients. *PLoS One*, 2017; **12**(2): p. e0172479.
127. Vehreschild J J, Heussel C P, Groll A H, Vehreschild M, Silling G, Wurthwein G, Brecht M, Cornely O A. Serial assessment of pulmonary lesion volume by computed tomography allows survival prediction in invasive pulmonary aspergillosis. *Eur Radiol*, 2017; **27**(8): p. 3275-3282.
128. von Laffert M, Schirmacher P, Warth A, Weichert W, Buttner R, Huber R M, Wolf J, Griesinger F, Dietel M, Grohe C. ALK-Testing in non-small cell lung cancer (NSCLC): Immunohistochemistry (IHC) and/or fluorescence in-situ Hybridisation (FISH)? Statement of the Germany Society for Pathology (DGP) and the Working Group Thoracic Oncology (AIO) of the German Cancer Society e.V. (Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und der AG Thorakale Onkologie der Arbeitsgemeinschaft Onkologie/Deutsche Krebsgesellschaft e.V.). *Lung Cancer*, 2017; **103**: p. 1-5.
129. Warth A. Spread through air spaces (STAS): a comprehensive update. *Transl Lung Cancer Res*, 2017; **6**(5): p. 501-507.
130. Warth A. Spread through air spaces (STAS): prognostic impact of a semi-quantitative assessment. *J Thorac Dis*, 2017; **9**(7): p. 1792-1795.
131. Warth A, Beasley M B, Mino-Kenudson M. Breaking New Ground: The Evolving Concept of Spread through Air Spaces (STAS). *J Thorac Oncol*, 2017; **12**(2): p. 176-178.
132. Wielputz M O, Kauczor H U, Weckbach S. [Incidental findings in chest Xrays]. *Radiologe*, 2017; **57**(4): p. 263-269.
133. Yamauchi Y, Safi S, Muley T, Warth A, Herth F J F, Dienemann H, Hoffmann H, Eichhorn M E. C-reactive protein-albumin ratio is an independent prognostic predictor of tumor recurrence in stage IIIA-N2 lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*, 2017; **114**: p. 62-67.
134. Zhao J, Dinkel J, Warth A, Penzel R, Reinmuth N, Schnabel P, Muley T, Meister M, Zabeck H, Steins M, Yang J Y, Zhou Q, Schlemmer H P, Herth F J F, Kauczor H U, Heussel C P. CT characteristics in pulmonary adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor mutation. *PLoS One*, 2017; **12**(9): p. e0182741.
135. Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, Agrawal R, Mall M A. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. *Cell Tissue Res*, 2017; **367**(3): p. 537-550.

136. Allgauer M, Budczies J, Christopoulos P, Endris V, Lier A, Rempel E, Volckmar A L, Kirchner M, von Winterfeld M, Leichsenring J, Neumann O, Frohling S, Penzel R, Thomas M, Schirmacher P, Stenzinger A. Implementing tumor mutational burden (TMB) analysis in routine diagnostics-a primer for molecular pathologists and clinicians. *Transl Lung Cancer Res*, 2018; **7**(6): p. 703-715.
137. Balazs A, Balla Z, Kui B, Maleth J, Rakonczay Z, Jr., Duerr J, Zhou-Suckow Z, Schatterny J, Sandler M, Mayerle J, Kuhn J P, Tiszlavicz L, Mall M A, Hegyi P. Ductal Mucus Obstruction and Reduced Fluid Secretion Are Early Defects in Chronic Pancreatitis. *Front Physiol*, 2018; **9**: p. 632.
138. Balazs A, Mall M A. Mucopurulent Triggering of the Airway Epithelium. Implications in Health and Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018; **197**(4): p. 418-420.
139. Berger M M, Macholz F, Schmidt P, Fried S, Perz T, Dankl D, Niebauer J, Bartsch P, Mairbaurl H, Sareban M. Inhaled Budesonide Does Not Affect Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction at 4559 Meters of Altitude. *High Alt Med Biol*, 2018; **19**(1): p. 52-59.
140. Bernhardt D, Adeberg S, Bozorgmehr F, Opfermann N, Horner-Rieber J, König L, Kappes J, Thomas M, Unterberg A, Herth F, Heussel C P, Warth A, Debus J, Steins M, Rieken S. Outcome and prognostic factors in single brain metastases from small-cell lung cancer. *Strahlenther Onkol*, 2018; **194**(2): p. 98-106.
141. Bernhardt D, Aufderstrasse S, König L, Adeberg S, Bozorgmehr F, Christopoulos P, Shafie R A E, Horner-Rieber J, Kappes J, Thomas M, Herth F, Steins M, Debus J, Rieken S. Impact of inflammatory markers on survival in patients with limited disease small-cell lung cancer undergoing chemoradiotherapy. *Cancer Manag Res*, 2018; **10**: p. 6563-6569.
142. Bernhardt D, Hommertgen A, Schmitt D, El Shafie R, Paul A, König L, Mair-Walther J, Krisam J, Klose C, Welzel T, Horner-Rieber J, Kappes J, Thomas M, Heussel C P, Steins M, Kieser M, Debus J, Rieken S. Whole brain radiation therapy alone versus radiosurgery for patients with 1-10 brain metastases from small cell lung cancer (ENCEPHALON Trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2018; **19**(1): p. 388.
143. Bernhardt D, König L, Aufderstrasse S, Krisam J, Hoerner-Rieber J, Adeberg S, Bozorgmehr F, El Shafie R, Lang K, Kappes J, Thomas M, Herth F, Heussel C P, Warth A, Marcrom S, Debus J, Steins M, Rieken S. Generation of a New Disease-specific Prognostic Score for Patients With Brain Metastases From Small-cell Lung Cancer Treated With Whole Brain Radiotherapy (BMS-Score) and Validation of Two Other Indices. *Clin Lung Cancer*, 2018; **19**(4): p. 340-345.
144. Boutin S, Weitnauer M, Hassel S, Graeber S Y, Stahl M, Dittrich A S, Mall M A, Dalpke A H. One time quantitative PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* to discriminate intermittent from chronic infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2018; **17**(3): p. 348-355.
145. Brunnemer E, Walscher J, Tenenbaum S, Hausmanns J, Schulze K, Seiter M, Heussel C P, Warth A, Herth F J F, Kreuter M. Real-World Experience with Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respiration*, 2018; **95**(5): p. 301-309.
146. Burtscher M, Gatterer H, Burtscher J, Mairbaurl H. Extreme Terrestrial Environments: Life in Thermal Stress and Hypoxia. A Narrative Review. *Front Physiol*, 2018; **9**: p. 572.
147. Christopoulos P, Endris V, Bozorgmehr F, Elsayed M, Kirchner M, Ristau J, Buchhalter I, Penzel R, Herth F J, Heussel C P, Eichhorn M, Muley T, Meister M, Fischer J R, Rieken S, Warth A, Bischoff H, Schirmacher P, Stenzinger A, Thomas M. EML4-ALK fusion variant V3 is a high-risk feature conferring accelerated metastatic spread, early treatment failure and worse overall survival in ALK(+) non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2018; **142**(12): p. 2589-2598.

148. Christopoulos P, Kirchner M, Endris V, Stenzinger A, Thomas M. EML4-ALK V3, treatment resistance, and survival: refining the diagnosis of ALK(+) NSCLC. *J Thorac Dis*, 2018; **10**(Suppl 17): p. S1989-S1991.
149. Dittrich A S, Kuhbandner I, Gehrig S, Rickert-Zacharias V, Twigg M, Wege S, Taggart C C, Herth F, Schultz C, Mall M A. Elastase activity on sputum neutrophils correlates with severity of lung disease in cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 2018; **51**(3).
150. Dvornikov D, Schneider M A, Ohse S, Szczygiel M, Titkova I, Rosenblatt M, Muley T, Warth A, Herth F J, Dienemann H, Thomas M, Timmer J, Schilling M, Busch H, Boerries M, Meister M, Klingmüller U. Expression ratio of the TGFβ-inducible gene MYO10 is prognostic for overall survival of squamous cell lung cancer patients and predicts chemotherapy response. *Sci Rep*, 2018; **8**(1): p. 9517.
151. Eichhorn F, Harms A, Warth A, Muley T, Winter H, Eichhorn M E. PD-L1 expression in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 2018; **118**: p. 76-82.
152. Endris V, Buchhalter I, Allgauer M, Rempel E, Lier A, Volckmar A L, Kirchner M, von Winterfeld M, Leichsenring J, Neumann O, Penzel R, Weichert W, Glimm H, Frohling S, Winter H, Herth F, Thomas M, Schirmacher P, Budczies J, Stenzinger A. Measurement of tumor mutational burden (TMB) in routine molecular diagnostics: in silico and real-life analysis of three larger gene panels. *Int J Cancer*, 2018.
153. Flechsig P, Hural O, Kreuter M, Eichhorn M, G H E, Sachpekidis C, Kauczor H U, Haberkorn U, Heussel C P, Eichinger M. Impact of FDG-PET on the Detection of Patients with Lung Cancer at High Risk for ILD. *In Vivo*, 2018; **32**(6): p. 1457-1462.
154. Flechsig P, Rastgoo R, Kratochwil C, Martin O, Holland-Letz T, Harms A, Kauczor H U, Haberkorn U, Giesel F L. Impact of Computer-Aided CT and PET Analysis on Non-invasive T Staging in Patients with Lung Cancer and Atelectasis. *Mol Imaging Biol*, 2018; **20**(6): p. 1044-1052.
155. Gentzsch M, Mall M A. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest*, 2018; **154**(2): p. 383-393.
156. Gonzalez-Vallinas M, Rodriguez-Paredes M, Albrecht M, Sticht C, Stichel D, Gutekunst J, Pitea A, Sass S, Sanchez-Rivera F J, Lorenzo-Bermejo J, Schmitt J, De La Torre C, Warth A, Theis F J, Müller N S, Gretz N, Muley T, Meister M, Tschaharganeh D F, Schirmacher P, Matthäus F, Breuhahn K. Epigenetically Regulated Chromosome 14q32 miRNA Cluster Induces Metastasis and Predicts Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma Patients. *Mol Cancer Res*, 2018; **16**(3): p. 390-402.
157. Graeber S Y, Dopfer C, Naehrlich L, Gyulumyan L, Scheuermann H, Hirtz S, Wege S, Mairbaurl H, Dorda M, Hyde R, Bagheri-Hanson A, Rueckes-Nilges C, Fischer S, Mall M A, Tümmler B. Effects of Lumacaftor-Ivacaftor Therapy on Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function in Phe508del Homozygous Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018; **197**(11): p. 1433-1442.
158. Hahn A, Salomon J J, Leitz D, Feigenbutz D, Korsch L, Lisewski I, Schimpf K, Millar-Buchner P, Mall M A, Frings S, Möhrle F. Expression and function of Anoctamin 1/TMEM16A calcium-activated chloride channels in airways of in vivo mouse models for cystic fibrosis research. *Pflugers Arch*, 2018; **470**(9): p. 1335-1348.
159. Harms A, Endris V, Winter H, Kriegsmann M, Stenzinger A, Schirmacher P, Warth A, Kazdal D. Molecular dissection of large cell carcinomas of the lung with null immunophenotype. *Pathology*, 2018; **50**(5): p. 530-535.
160. Hofer F, Kauczor H U, Stargardt T. Cost-utility analysis of a potential lung cancer screening program for a high-risk population in Germany: A modelling approach. *Lung Cancer*, 2018; **124**: p. 189-198.

161. Jobst B J, Weinheimer O, Buschulte T, Trauth M, Tremper J, Delorme S, Becker N, Motsch E, Gross M L, Trotter A, Eichinger M, Kauczor H U, Wielputz M O. Longitudinal airway remodeling in active and past smokers in a lung cancer screening population. *Eur Radiol*, 2018.
162. Jobst B J, Weinheimer O, Trauth M, Becker N, Motsch E, Gross M L, Tremper J, Delorme S, Eigentopf A, Eichinger M, Kauczor H U, Wielputz M O. Effect of smoking cessation on quantitative computed tomography in smokers at risk in a lung cancer screening population. *Eur Radiol*, 2018; **28**(2): p. 807-815.
163. Kaireit T F, Voskrebenez A, Gutberlet M, Freise J, Jobst B, Kauczor H U, Welte T, Wacker F, Vogel-Claussen J. Comparison of quantitative regional perfusion-weighted phase resolved functional lung (PREFUL) MRI with dynamic gadolinium-enhanced regional pulmonary perfusion MRI in COPD patients. *J Magn Reson Imaging*, 2018.
164. Kauczor H U, Wielputz M O, Jobst B J, Weinheimer O, Gompelmann D, Herth F J F, Heussel C P. Computed Tomography Imaging for Novel Therapies of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Thorac Imaging*, 2018.
165. Kazdal D, Harms A, Endris V, Penzel R, Oliveira C, Kriegsmann M, Longuespee R, Winter H, Schneider M A, Muley T, Pfarr N, Weichert W, Stenzinger A, Warth A. Subclonal evolution of pulmonary adenocarcinomas delineated by spatially distributed somatic mitochondrial mutations. *Lung Cancer*, 2018; **126**: p. 80-88.
166. Kerr K M, Dafni U, Schulze K, Thunnissen E, Bubendorf L, Hager H, Finn S, Biernat W, Vliegen L, Losa J H, Marchetti A, Cheney R, Warth A, Speel E J, Blackhall F, Monkhurst K, Jantus Lewintre E, Tischler V, Clark C, Bertran-Alamillo J, Meldgaard P, Gately K, Wrona A, Vandenberghe P, Filip E, De Luca G, Savic S, Muley T, Smit E F, Dingemans A C, Priest L, Baas P, Camps C, Weder W, Polydoropoulou V, Geiger T R, Kammler R, Sumiyoshi T, Molina M A, Shames D S, Stahel R A, Peters S, Consortium E L. Prevalence and clinical association of gene mutations through multiplex mutation testing in patients with NSCLC: results from the ETOP Lungscape Project. *Ann Oncol*, 2018; **29**(1): p. 200-208.
167. Konietzke P, Jobst B, Wagner W L, Jarosch I, Graber R, Kenn K, Kauczor H U, Wielputz M O. Similarities in the Computed Tomography Appearance in alpha1-Antitrypsin Deficiency and Smoking-Related Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Smoking Collective. *Respiration*, 2018; **96**(3): p. 231-239.
168. Konietzke P, Weinheimer O, Wielputz M O, Savage D, Ziyeh T, Tu C, Newman B, Galban C J, Mall M A, Kauczor H U, Robinson T E. Validation of automated lobe segmentation on paired inspiratory-expiratory chest CT in 8-14 year-old children with cystic fibrosis. *PLoS One*, 2018; **13**(4): p. e0194557.
169. Konietzke P, Weinheimer O, Wielputz M O, Wagner W L, Kaukel P, Eberhardt R, Heussel C P, Kauczor H U, Herth F J, Schuhmann M. Quantitative CT detects changes in airway dimensions and air-trapping after bronchial thermoplasty for severe asthma. *Eur J Radiol*, 2018; **107**: p. 33-38.
170. Kopf S, Groener J B, Kender Z, Fleming T, Brune M, Riedinger C, Volk N, Herpel E, Pesta D, Szendrodi J, Wielputz M O, Kauczor H U, Katus H A, Kreuter M, Nawroth P P. Breathlessness and Restrictive Lung Disease: An Important Diabetes-Related Feature in Patients with Type 2 Diabetes. *Respiration*, 2018; **96**(1): p. 29-40.
171. Kriegsmann K, Zgorzelski C, Kazdal D, Cremer M, Muley T, Winter H, Longuespee R, Kriegsmann J, Warth A, Kriegsmann M. Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) in Thoracic Tumors is Less Sensitive but More Specific Compared With Synaptophysin, Chromogranin A, and CD56. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2018.
172. Kriegsmann M, Harms A, Kazdal D, Fischer S, Stenzinger A, Leichsenring J, Penzel R, Longuespee R, Kriegsmann K, Muley T, Safi S, Warth A. Analysis of the proliferative activity in

- lung adenocarcinomas with specific driver mutations. *Pathol Res Pract*, 2018; **214**(3): p. 408-416.
173. Kriegsmann M, Harms A, Longuespee R, Muley T, Winter H, Kriegsmann K, Kazdal D, Goeppert B, Pathil A, Warth A. Role of conventional immunomarkers, HNF4-alpha and SATB2, in the differential diagnosis of pulmonary and colorectal adenocarcinomas. *Histopathology*, 2018; **72**(6): p. 997-1006.
174. Kriegsmann M, Kriegsmann K, Harms A, Longuespee R, Zgorzelski C, Leichsenring J, Muley T, Winter H, Kazdal D, Goeppert B, Warth A. Expression of HMB45, MelanA and SOX10 is rare in non-small cell lung cancer. *Diagn Pathol*, 2018; **13**(1): p. 68.
175. Leichsenring J, Volckmar A L, Kirchner M, Kazdal D, Kriegsmann M, Stogbauer F, Bockmayr T, Klauschen F, Herth F J F, Penzel R, Warth A, Schirmacher P, Endris V, Stenzinger A. Targeted deep sequencing of effusion cytology samples is feasible, informs spatiotemporal tumor evolution, and has clinical and diagnostic utility. *Genes Chromosomes Cancer*, 2018; **57**(2): p. 70-79.
176. Letovanec I, Finn S, Zygoura P, Smyth P, Soltermann A, Bubendorf L, Speel E J, Marchetti A, Nonaka D, Monkhurst K, Hager H, Martorell M, Sejda A, Cheney R, Hernandez-Losa J, Verbeke E, Weder W, Savic S, Di Lorito A, Navarro A, Felip E, Warth A, Baas P, Meldgaard P, Blackhall F, Dingemans A M, Dienemann H, Dziadziuszko R, Vansteenkiste J, O'Brien C, Geiger T, Sherlock J, Schageman J, Dafni U, Kammler R, Kerr K, Thunnissen E, Stahel R, Peters S, European Thoracic Oncology Platform Lungscope C. Evaluation of NGS and RT-PCR Methods for ALK Rearrangement in European NSCLC Patients: Results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscope Project. *J Thorac Oncol*, 2018; **13**(3): p. 413-425.
177. Leutz-Schmidt P, Stahl M, Sommerburg O, Eichinger M, Puderbach M U, Schenk J P, Alrajab A, Triphan S M F, Kauczor H U, Mall M A, Wielpütz M O. Non-contrast enhanced magnetic resonance imaging detects mosaic signal intensity in early cystic fibrosis lung disease. *Eur J Radiol*, 2018; **101**: p. 178-183.
178. Lindner T, Loktev A, Altmann A, Giesel F, Kratochwil C, Debus J, Jager D, Mier W, Haberkorn U. Development of Quinoline-Based Theranostic Ligands for the Targeting of Fibroblast Activation Protein. *J Nucl Med*, 2018; **59**(9): p. 1415-1422.
179. Livraghi-Butrico A, Wilkinson K J, Volmer A S, Gilmore R C, Rogers T D, Caldwell R A, Burns K A, Esther C R, Jr., Mall M A, Boucher R C, O'Neal W K, Grubb B R. Lung disease phenotypes caused by overexpression of combinations of alpha-, beta-, and gamma-subunits of the epithelial sodium channel in mouse airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018; **314**(2): p. L318-L331.
180. Loktev A, Lindner T, Mier W, Debus J, Altmann A, Jager D, Giesel F, Kratochwil C, Barthe P, Roumestand C, Haberkorn U. A Tumor-Imaging Method Targeting Cancer-Associated Fibroblasts. *J Nucl Med*, 2018; **59**(9): p. 1423-1429.
181. Lynch D A, Moore C M, Wilson C, Nevrekar D, Jennermann T, Humphries S M, Austin J H M, Grenier P A, Kauczor H U, Han M K, Regan E A, Make B J, Bowler R P, Beaty T H, Curran-Everett D, Hokanson J E, Curtis J L, Silverman E K, Crapo J D, Genetic Epidemiology of C I. CT-based Visual Classification of Emphysema: Association with Mortality in the COPD Gene Study. *Radiology*, 2018; **288**(3): p. 859-866.
182. Mairbaur H. Neocytolysis: How to Get Rid of the Extra Erythrocytes Formed by Stress Erythropoiesis Upon Descent From High Altitude. *Front Physiol*, 2018; **9**: p. 345.
183. Mall M A, Hwang T C, Braakman I. Cystic fibrosis research topics featured at the 14th ECFS Basic Science Conference: Chairman's summary. *J Cyst Fibros*, 2018; **17**(2S): p. S1-S4.
184. Margaroli C, Garratt L W, Horati H, Dittrich A S, Rosenow T, Montgomery S T, Frey D L, Brown M R, Schultz C, Gugliani L, Kicic A, Peng L, Scholte B J, Mall M A, Janssens H M, Stick S M,

- Tirouvanziam R, Arest C F, Impede C F. Elastase Exocytosis by Airway Neutrophils Associates with Early Lung Damage in Cystic Fibrosis Children. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018.
185. Melnik S, Dvornikov D, Muller-Decker K, Depner S, Stanek P, Meister M, Warth A, Thomas M, Muley T, Risch A, Plass C, Klingmuller U, Niehrs C, Glinka A. Cancer cell specific inhibition of Wnt/beta-catenin signaling by forced intracellular acidification. *Cell Discov*, 2018; **4**: p. 37.
186. Melzig C, Golestaneh A F, Mier W, Schwager C, Das S, Schlegel J, Lasitschka F, Kauczor H U, Debus J, Haberkorn U, Abdollahi A. Combined external beam radiotherapy with carbon ions and tumor targeting endoradiotherapy. *Oncotarget*, 2018; **9**(52): p. 29985-30004.
187. Montgomery S T, Dittrich A S, Garratt L W, Turkovic L, Frey D L, Stick S M, Mall M A, Kicic A, Arest C F. Interleukin-1 is associated with inflammation and structural lung disease in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2018; **17**(6): p. 715-722.
188. Muhlfeld C, Neves J, Brandenberger C, Hegermann J, Wrede C, Altamura S, Muckenthaler M U. Air-blood barrier thickening and alterations of alveolar epithelial type 2 cells in mouse lungs with disrupted hepcidin/ferroportin regulatory system. *Histochem Cell Biol*, 2018.
189. Ohno Y, Kauczor H U, Hatabu H, Seo J B, van Beek E J R, International Workshop for Pulmonary Functional I. MRI for solitary pulmonary nodule and mass assessment: Current state of the art. *J Magn Reson Imaging*, 2018; **47**(6): p. 1437-1458.
190. Roth A, Boulay K, Gross M, Polycarpou-Schwarz M, Mallette F A, Regnier M, Bida O, Ginsberg D, Warth A, Schnabel P A, Muley T, Meister M, Zabeck H, Hoffmann H, Diederichs S. Restoring LINC00673 expression triggers cellular senescence in lung cancer. *RNA Biol*, 2018.
191. Sermet-Gaudelus I, Clancy J P, Nichols D P, Nick J A, De Boeck K, Solomon G M, Mall M A, Bolognese J, Bouisset F, den Hollander W, Paquette-Lamontagne N, Tomkinson N, Henig N, Elborn J S, Rowe S M. Antisense oligonucleotide eluforsen improves CFTR function in F508del cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2018.
192. Skornitzke S, Hirsch J, Kauczor H U, Stiller W. Evaluation of the effect of image noise on CT perfusion measurements using digital perfusion phantoms. *Eur Radiol*, 2018.
193. Sommer C M, Harms A, Do T D, Gockner T L, Kriegsmann M, Schlett C L, Holzer K, Vollherbst D, Warth A, Pereira P L, Eichwald V, Jugold M, Kauczor H U, Flechsig P. Inherently Radiopaque Narrow-Size-Calibrated Microspheres: Proof of Principle in a Pig Embolization Model. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2018; **41**(9): p. 1404-1411.
194. Stahl M, Graeber S Y, Joachim C, Barth S, Ricklefs I, Diekmann G, Kopp M V, Naehrlich L, Mall M A. Three-center feasibility of lung clearance index in infants and preschool children with cystic fibrosis and other lung diseases. *J Cyst Fibros*, 2018; **17**(2): p. 249-255.
195. Stahl M, Joachim C, Wielputz M O, Mall M A. Comparison of lung clearance index determined by washout of N₂ and SF₆ in infants and preschool children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2018.
196. Stahl M, Wielputz M O, Kauczor H U, Mall M A, all a. Reply to Verbanck and Vanderhelst: The Respective Roles of Lung Clearance Index and Magnetic Resonance Imaging in the Clinical Management of Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018; **197**(3): p. 410-411.
197. Stahl M, Wielputz M O, Ricklefs I, Dopfer C, Barth S, Schlegtendal A, Graeber S Y, Sommerburg O, Diekmann G, Husing J, Koerner-Rettberg C, Naehrlich L, Dittrich A M, Kopp M V, Mall M A. Preventive Inhalation of Hypertonic Saline in Infants with Cystic Fibrosis (PRESIS): A Randomized, Double-Blind, Controlled Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018.
198. Ter-Karapetyan A, Triphan S M F, Jobst B J, Anjorin A F, Ley-Zaporozhan J, Ley S, Sedlaczek O, Biederer J, Kauczor H U, Jakob P M, Wielputz M O. Towards quantitative perfusion MRI of the lung in COPD: The problem of short-term repeatability. *PLoS One*, 2018; **13**(12): p. e0208587.

199. Triphan S M F, Biederer J, Burmester K, Fellhauer I, Vogelmeier C F, Jorres R A, Kauczor H U, Heussel C P, Wielputz M O, Jobst B J. Design and application of an MR reference phantom for multicentre lung imaging trials. *PLoS One*, 2018; **13**(7): p. e0199148.
200. Tsuchiya N, van Beek E J, Ohno Y, Hatabu H, Kauczor H U, Swift A, Vogel-Claussen J, Biederer J, Wild J, Wielputz M O, Schiebler M L. Magnetic resonance angiography for the primary diagnosis of pulmonary embolism: A review from the international workshop for pulmonary functional imaging. *World J Radiol*, 2018; **10**(6): p. 52-64.
201. Wagner W L, Wuennemann F, Pacile S, Albers J, Arfelli F, Dreossi D, Biederer J, Konietzke P, Stiller W, Wielputz M O, Accardo A, Confalonieri M, Cova M, Lotz J, Alves F, Kauczor H U, Tromba G, Dullin C. Towards synchrotron phase-contrast lung imaging in patients - a proof-of-concept study on porcine lungs in a human-scale chest phantom. *J Synchrotron Radiat*, 2018; **25**(Pt 6): p. 1827-1832.
202. Wielputz M O, Lee H Y, Koyama H, Yoshikawa T, Seki S, Kishida Y, Sakai Y, Kauczor H U, Sugimura K, Ohno Y. Morphologic Characterization of Pulmonary Nodules With Ultrashort TE MRI at 3T. *AJR Am J Roentgenol*, 2018; **210**(6): p. 1216-1225.
203. Wielputz M O, Triphan S M F, Ohno Y, Jobst B J, Kauczor H U. Outracing Lung Signal Decay - Potential of Ultrashort Echo Time MRI. *Rofo*, 2018.
204. Wielputz M O, von Stackelberg O, Stahl M, Jobst B J, Eichinger M, Puderbach M U, Nahrlich L, Barth S, Schneider C, Kopp M V, Ricklefs I, Buchholz M, Tummler B, Dopfer C, Vogel-Claussen J, Kauczor H U, Mall M A. Multicentre standardisation of chest MRI as radiation-free outcome measure of lung disease in young children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2018; **17**(4): p. 518-527.
205. Yin Y, Sedlacek O, Muller B, Warth A, Gonzalez-Vallinas M, Lahrmann B, Grabe N, Kauczor H U, Breuhahn K, Vignon-Clementel I E, Drasdo D. Tumor Cell Load and Heterogeneity Estimation From Diffusion-Weighted MRI Calibrated With Histological Data: an Example From Lung Cancer. *IEEE Trans Med Imaging*, 2018; **37**(1): p. 35-46.
206. Zabeck H, Dienemann H, Hoffmann H, Pfannschmidt J, Warth A, Schnabel P A, Muley T, Meister M, Sultmann H, Frohlich H, Kuner R, Lasitschka F. Molecular signatures in IASLC/ATS/ERS classified growth patterns of lung adenocarcinoma. *PLoS One*, 2018; **13**(10): p. e0206132.

2019

207. Ackermann M, Stark H, Neubert L, Schubert S, Borchert P, Linz F, Wagner W L, Stiller W, Wielputz M, Hoefer A, Haverich A, Mentzer S J, Shah H R, Welte T, Kuehnelt M, Jonigk D. Morphomolecular motifs of pulmonary neoangiogenesis in interstitial lung diseases. *Eur Respir J*, 2019.
208. Allen B D, Schiebler M L, Sommer G, Kauczor H U, Biederer J, Kruser T J, Carr J C, Hazen G. Cost-effectiveness of lung MRI in lung cancer screening. *Eur Radiol*, 2019.
209. Anagnostopoulou P, Latzin P, Jensen R, Stahl M, Harper A, Yammine S, Usemann J, Foong R E, Spycher B, Hall G L, Singer F, Stanojevic S, Mall M, Ratjen F, Ramsey K A. Normative data for multiple breath washout outcomes in school-aged Caucasian children. *Eur Respir J*, 2019.
210. Bains S, Eguchi T, Warth A, Yeh Y C, Nitadori J I, Woo K M, Chou T Y, Dienemann H, Muley T, Nakajima J, Shinozaki-Ushiku A, Wu Y C, Lu S, Kadota K, Jones D R, Travis W D, Tan K S, Adusumilli P S. Procedure-Specific Risk Prediction for Recurrence in Patients Undergoing Lobectomy or Sublobar Resection for Small (≤ 2 cm) Lung Adenocarcinoma: An International Cohort Analysis. *J Thorac Oncol*, 2019; **14**(1): p. 72-86.
211. Biederer J. Using Lung MRI and Elastic Registration to Assess Pulmonary Fibrosis. *Radiology*, 2019; **291**(2): p. 493-494.

212. Brown R, Paulsen M, Schmidt S, Schatterny J, Frank A, Hirtz S, Delaney R, Doherty D, Hagner M, Taggart C, Weldon S, Mall M A. Lack of IL-1 Receptor Signaling Reduces Spontaneous Airway Eosinophilia in Juvenile Mice with Muco-Obstructive Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019.
213. Buchhalter I, Rempel E, Endris V, Allgauer M, Neumann O, Volckmar A L, Kirchner M, Leichsenring J, Lier A, von Winterfeld M, Penzel R, Christopoulos P, Thomas M, Frohling S, Schirmacher P, Budczies J, Stenzinger A. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *Int J Cancer*, 2019; **144**(4): p. 848-858.
214. Budczies J, Allgauer M, Litchfield K, Rempel E, Christopoulos P, Kazdal D, Endris V, Thomas M, Frohling S, Peters S, Swanton C, Schirmacher P, Stenzinger A. Optimizing panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement. *Ann Oncol*, 2019; **30**(9): p. 1496-1506.
215. Chan T A, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada S A, Stenzinger A, Peters S. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol*, 2019; **30**(1): p. 44-56.
216. Christopoulos P, Budczies J, Kirchner M, Dietz S, Sultmann H, Thomas M, Stenzinger A. Defining molecular risk in ALK(+) NSCLC. *Oncotarget*, 2019; **10**(33): p. 3093-3103.
217. Christopoulos P, Dietz S, Kirchner M, Volckmar A L, Endris V, Neumann O, Ogrodnik S, Heussel C P, Herth F J, Eichhorn M, Meister M, Budczies J, Allgauer M, Leichsenring J, Zemojtel T, Bischoff H, Schirmacher P, Thomas M, Sultmann H, Stenzinger A. Detection of TP53 Mutations in Tissue or Liquid Rebiopsies at Progression Identifies ALK+ Lung Cancer Patients with Poor Survival. *Cancers (Basel)*, 2019; **11**(1).
218. Christopoulos P, Kirchner M, Bozorgmehr F, Endris V, Elsayed M, Budczies J, Ristau J, Penzel R, Herth F J, Heussel C P, Eichhorn M, Muley T, Meister M, Fischer J R, Rieken S, Lasitschka F, Bischoff H, Sotillo R, Schirmacher P, Thomas M, Stenzinger A. Identification of a highly lethal V3(+) TP53(+) subset in ALK(+) lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 2019; **144**(1): p. 190-199.
219. Dietz S, Christopoulos P, Gu L, Volckmar A L, Endris V, Yuan Z, Ogrodnik S J, Zemojtel T, Heussel C P, Schneider M A, Meister M, Muley T, Reck M, Schlesner M, Thomas M, Stenzinger A, Sultmann H. Serial liquid biopsies for detection of treatment failure and profiling of resistance mechanisms in KLC1-ALK-rearranged lung cancer. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2019; **5**(6).
220. Dietz S, Lifshitz A, Kazdal D, Harms A, Endris V, Winter H, Stenzinger A, Warth A, Sill M, Tanay A, Sultmann H. Global DNA methylation reflects spatial heterogeneity and molecular evolution of lung adenocarcinomas. *Int J Cancer*, 2019; **144**(5): p. 1061-1072.
221. Eder M, Pavan S, Bauder-Wust U, van Rietschoten K, Baranski A C, Harrison H, Campbell S, Stace C L, Walker E H, Chen L, Bennett G, Mudd G, Schierbaum U, Leotta K, Haberkorn U, Kopka K, Teufel D P. Bicyclic Peptides as a New Modality for Imaging and Targeting of Proteins Overexpressed by Tumors. *Cancer Res*, 2019; **79**(4): p. 841-852.
222. Endris V, Buchhalter I, Allgauer M, Rempel E, Lier A, Volckmar A L, Kirchner M, von Winterfeld M, Leichsenring J, Neumann O, Penzel R, Weichert W, Glimm H, Frohling S, Winter H, Herth F, Thomas M, Schirmacher P, Budczies J, Stenzinger A. Measurement of tumor mutational burden (TMB) in routine molecular diagnostics: in silico and real-life analysis of three larger gene panels. *Int J Cancer*, 2019; **144**(9): p. 2303-2312.
223. Ercetin E, Richtmann S, Delgado B M, Gomez-Mariano G, Wrenger S, Korenbaum E, Liu B, DeLuca D, Kuhnle M P, Jonigk D, Yuskaeva K, Warth A, Muley T, Winter H, Meister M, Welte T, Janciauskiene S, Schneider M A. Clinical Significance of SERPINA1 Gene and Its Encoded Alpha1-antitrypsin Protein in NSCLC. *Cancers (Basel)*, 2019; **11**(9).
224. Flechsig P, Lindner T, Loktev A, Roesch S, Mier W, Sauter M, Meister M, Herold-Mende C, Haberkorn U, Altmann A. PET/CT Imaging of NSCLC with a alphavbeta6 Integrin-Targeting Peptide. *Mol Imaging Biol*, 2019; **21**(5): p. 973-983.

225. Gassmann M, Mairbaurl H, Livshits L, Seide S, Hackbusch M, Malczyk M, Kraut S, Gassmann N, Weissmann N, Muckenthaler M U. The increase in hemoglobin concentration with altitude varies among human populations. *Ann N Y Acad Sci*, 2019; **1450**(1): p. 204-220.
226. Geisbusch P, Skrypnik D, Ante M, Trojan M, Bruckner T, Rengier F, Bockler D. Endograft migration after thoracic endovascular aortic repair. *J Vasc Surg*, 2019; **69**(5): p. 1387-1394.
227. Giesel F L, Heussel C P, Lindner T, Rohrich M, Rathke H, Kauczor H U, Debus J, Haberkorn U, Kratochwil C. FAPI-PET/CT improves staging in a lung cancer patient with cerebral metastasis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019; **46**(8): p. 1754-1755.
228. Giesel F L, Kratochwil C, Lindner T, Marschalek M M, Loktev A, Lehnert W, Debus J, Jager D, Flechsig P, Altmann A, Mier W, Haberkorn U. (68)Ga-FAPI PET/CT: Biodistribution and Preliminary Dosimetry Estimate of 2 DOTA-Containing FAP-Targeting Agents in Patients with Various Cancers. *J Nucl Med*, 2019; **60**(3): p. 386-392.
229. Guerra M, Frey D, Hagner M, Dittrich S, Paulsen M, Mall M A, Schultz C. Cathepsin G Activity as a New Marker for Detecting Airway Inflammation by Microscopy and Flow Cytometry. *ACS Cent Sci*, 2019; **5**(3): p. 539-548.
230. Heeke S, Benzaquen J, Long-Mira E, Audelan B, Lespinet V, Bordone O, Lalvee S, Zahaf K, Poudenx M, Humbert O, Montaudie H, Dugourd P M, Chassang M, Passeron T, Delingette H, Marquette C H, Hofman V, Stenzinger A, Ilie M, Hofman P. In-house Implementation of Tumor Mutational Burden Testing to Predict Durable Clinical Benefit in Non-small Cell Lung Cancer and Melanoma Patients. *Cancers (Basel)*, 2019; **11**(9).
231. Heijerman H G M, McKone E F, Downey D G, Van Braeckel E, Rowe S M, Tullis E, Mall M A, Welter J J, Ramsey B W, McKee C M, Marigowda G, Moskowitz S M, Waltz D, Sosnay P R, Simard C, Ahluwalia N, Xuan F, Zhang Y, Taylor-Cousar J L, McCoy K S, Group V X T. Efficacy and safety of the elxacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 2019; **394**(10212): p. 1940-1948.
232. Herth F J F, Reinmuth N, Wormanns D, Antoch G, Biederer J, Vogel-Claussen J, Kauczor H U, Pfeifer M, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und B, Vorstand der Deutschen R. [Joint Statement of the German Radiological Society and the German Respiratory Society on a Quality-Assured Early Detection Program for Lung Cancer with Low-dose CT]. *Pneumologie*, 2019; **73**(10): p. 573-577.
233. Hery-Arnaud G, Boutin S, Cuthbertson L, Elborn S J, Tunney M M. The lung and gut microbiome: what has to be taken into consideration for cystic fibrosis? *J Cyst Fibros*, 2019; **18**(1): p. 13-21.
234. Jobst B J, Owsijewitsch M, Kauczor H U, Biederer J, Ley S, Becker N, Kopp-Schneider A, Delorme S, Heussel C P, Puderbach M, Wielpütz M O, Ley-Zaporozhan J. GOLD stage predicts thoracic aortic calcifications in patients with COPD. *Exp Ther Med*, 2019; **17**(1): p. 967-973.
235. Jobst B J, Weinheimer O, Buschulte T, Trauth M, Tremper J, Delorme S, Becker N, Motsch E, Gross M L, Trotter A, Eichinger M, Kauczor H U, Wielpütz M O. Longitudinal airway remodeling in active and past smokers in a lung cancer screening population. *Eur Radiol*, 2019; **29**(6): p. 2968-2980.
236. Kahnert K, Jobst B, Biertz F, Biederer J, Watz H, Huber R M, Behr J, Grenier P A, Alter P, Vogelmeier C F, Kauczor H U, Jorres R A. Relationship of spirometric, body plethysmographic, and diffusing capacity parameters to emphysema scores derived from CT scans. *Chron Respir Dis*, 2019; **16**: p. 1479972318775423.
237. Kaireit T F, Voskresenzov A, Gutberlet M, Freise J, Jobst B, Kauczor H U, Welte T, Wacker F, Vogel-Claussen J. Comparison of quantitative regional perfusion-weighted phase resolved functional lung (PREFUL) MRI with dynamic gadolinium-enhanced regional pulmonary perfusion MRI in COPD patients. *J Magn Reson Imaging*, 2019; **49**(4): p. 1122-1132.

238. Kauczor H U, von Stackelberg O. Subsolid Lung Nodules: Potential for Overdiagnosis. *Radiology*, 2019; **293**(2): p. 449-450.
239. Kauczor H U, Wielputz M O, Jobst B J, Weinheimer O, Gompelmann D, Herth F J F, Heussel C P. Computed Tomography Imaging for Novel Therapies of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Thorac Imaging*, 2019; **34**(3): p. 202-213.
240. Kazdal D, Endris V, Allgauer M, Kriegsmann M, Leichsenring J, Volckmar A L, Harms A, Kirchner M, Kriegsmann K, Neumann O, Brandt R, Talla S B, Rempel E, Ploeger C, von Winterfeld M, Christopoulos P, Merino D M, Stewart M, Allen J, Bischoff H, Meister M, Muley T, Herth F, Penzel R, Warth A, Winter H, Frohling S, Peters S, Swanton C, Thomas M, Schirmacher P, Budczies J, Stenzinger A. Spatial and Temporal Heterogeneity of Panel-Based Tumor Mutational Burden in Pulmonary Adenocarcinoma: Separating Biology From Technical Artifacts. *J Thorac Oncol*, 2019; **14**(11): p. 1935-1947.
241. Kazdal D, Longuespee R, Dietz S, Casadonte R, Schwamborn K, Volckmar A L, Kriegsmann J, Kriegsmann K, Fresnais M, Stenzinger A, Sultmann H, Warth A, Kriegsmann M. Digital PCR After MALDI-Mass Spectrometry Imaging to Combine Proteomic Mapping and Identification of Activating Mutations in Pulmonary Adenocarcinoma. *Proteomics Clin Appl*, 2019; **13**(1): p. e1800034.
242. Kerr K M, Thunnissen E, Dafni U, Finn S P, Bubendorf L, Soltermann A, Verbeken E, Biernat W, Warth A, Marchetti A, Speel E M, Pokharel S, Quinn A M, Monkhorst K, Navarro A, Madsen L B, Radonic T, Wilson J, De Luca G, Gray S G, Cheney R, Savic S, Martorell M, Muley T, Baas P, Meldgaard P, Blackhall F, Dingemans A M, Dziadziuszko R, Vansteenkiste J, Weder W, Polydoropoulou V, Geiger T, Kammler R, Peters S, Stahel R, Lungscape C. A retrospective cohort study of PD-L1 prevalence, molecular associations and clinical outcomes in patients with NSCLC: Results from the European Thoracic Oncology Platform (ETOP) Lungscape Project. *Lung Cancer*, 2019; **131**: p. 95-103.
243. Kim H, Goo J M, Ohno Y, Kauczor H U, Hoffman E A, Gee J C, van Beek E J R. Effect of Reconstruction Parameters on the Quantitative Analysis of Chest Computed Tomography. *J Thorac Imaging*, 2019; **34**(2): p. 92-102.
244. Klotz L V, Courty Y, Lindner M, Petit-Courty A, Stowasser A, Koch I, Eichhorn M E, Lilis I, Morresi-Hauf A, Arendt K A M, Pepe M, Giapanou I, Ntaliarda G, Behrend S J, Opolopoiou M, Gissot V, Guyetant S, Marchand-Adam S, Behr J, Kaiser J C, Hatz R A, Lamort A S, Stathopoulos G T. Comprehensive clinical profiling of the Gauting locoregional lung adenocarcinoma donors. *Cancer Med*, 2019; **8**(4): p. 1486-1499.
245. Koelsche C, Tavernar L, Neumann O, Heussel C P, Eberhardt R, Winter H, Stenzinger A, Mechttersheimer G. Primary pulmonary myxoid sarcoma with an unusual gene fusion between exon 7 of EWSR1 and exon 5 of CREB1. *Virchows Arch*, 2019.
246. Kratochwil C, Flechsig P, Lindner T, Abderrahim L, Altmann A, Mier W, Adeberg S, Rathke H, Rohrich M, Winter H, Plinkert P K, Marme F, Lang M, Kauczor H U, Jager D, Debus J, Haberkorn U, Giesel F L. (68)Ga-FAPI PET/CT: Tracer Uptake in 28 Different Kinds of Cancer. *J Nucl Med*, 2019; **60**(6): p. 801-805.
247. Kriegsmann K, Cremer M, Zgorzelski C, Harms A, Muley T, Winter H, Kazdal D, Warth A, Kriegsmann M. Agreement of CK5/6, p40, and p63 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Pathology*, 2019; **51**(3): p. 240-245.
248. Kriegsmann K, Longuespee R, Hundemer M, Zgorzelski C, Casadonte R, Schwamborn K, Weichert W, Schirmacher P, Harms A, Kazdal D, Leichsenring J, Stenzinger A, Warth A, Fresnais M, Kriegsmann J, Kriegsmann M. Combined Immunohistochemistry after Mass Spectrometry Imaging for Superior Spatial Information. *Proteomics Clin Appl*, 2019; **13**(1): p. e1800035.

249. Leichsenring J, Horak P, Kreutzfeldt S, Heining C, Christopoulos P, Volckmar A L, Neumann O, Kirchner M, Ploeger C, Budczies J, Heilig C E, Hutter B, Frohlich M, Uhrig S, Kazdal D, Allgauer M, Harms A, Rempel E, Lehmann U, Thomas M, Pfarr N, Azoitei N, Bonzheim I, Marienfeld R, Moller P, Werner M, Fend F, Boerries M, von Bubnoff N, Lassmann S, Longerich T, Bitzer M, Seufferlein T, Malek N, Weichert W, Schirmacher P, Penzel R, Endris V, Brors B, Klauschen F, Glimm H, Frohling S, Stenzinger A. Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer*, 2019; **145**(11): p. 2996-3010.
250. Leichsenring J, Kazdal D, Ploeger C, Allgauer M, Endris V, Volckmar A L, Neumann O, Kirchner M, Penzel R, Rempel E, Budczies J, Schirmacher P, Frohling S, Stenzinger A. [From panel diagnostics to comprehensive genomic analysis : Infobesity or empowerment?]. *Pathologe*, 2019; **40**(3): p. 235-242.
251. Leidenberger T, Gordon Y, Farag M, Delles M, Sanches A F, Fink M A, Kallenbach K, Kauczor H U, Rengier F. Imaging-Based 4D Aortic Pressure Mapping in Marfan Syndrome Patients: A Matched Case-Control Study. *Ann Thorac Surg*, 2019.
252. Lerche M, Eichstaedt C A, Hinderhofer K, Grunig E, Tausche K, Ziemssen T, Halank M, Wirtz H, Seyfarth H J. Mutually reinforcing effects of genetic variants and interferon-beta 1a therapy for pulmonary arterial hypertension development in multiple sclerosis patients. *Pulm Circ*, 2019; **9**(3): p. 2045894019872192.
253. Leutz-Schmidt P, Eichinger M, Stahl M, Sommerburg O, Biederer J, Kauczor H U, Puderbach M U, Mall M A, Wielputz M O. Ten years of chest MRI for patients with cystic fibrosis : Translation from the bench to clinical routine. *Radiologe*, 2019.
254. Lindner T, Loktev A, Giesel F, Kratochwil C, Altmann A, Haberkorn U. Targeting of activated fibroblasts for imaging and therapy. *EJNMMI Radiopharm Chem*, 2019; **4**(1): p. 16.
255. Loktev A, Lindner T, Burger E M, Altmann A, Giesel F, Kratochwil C, Debus J, Marme F, Jager D, Mier W, Haberkorn U. Development of Fibroblast Activation Protein-Targeted Radiotracers with Improved Tumor Retention. *J Nucl Med*, 2019; **60**(10): p. 1421-1429.
256. Margaroli C, Garratt L W, Horati H, Dittrich A S, Rosenow T, Montgomery S T, Frey D L, Brown M R, Schultz C, Guglani L, Kicic A, Peng L, Scholte B J, Mall M A, Janssens H M, Stick S M, Tirouvanziam R. Elastase Exocytosis by Airway Neutrophils Is Associated with Early Lung Damage in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019; **199**(7): p. 873-881.
257. Marietta von Siemens S, Alter P, Lutter J I, Kauczor H U, Jobst B, Bals R, Trudzinski F C, Sohler S, Behr J, Watz H, Waschki B, Bewig B, Jones P W, Welte T, Vogelmeier C F, Jorres R A, Kahnert K, group C s, Names of participating study n. CAT score single item analysis in patients with COPD: Results from COSYCONET. *Respir Med*, 2019; **159**: p. 105810.
258. Melzig C, Worz S, Egenlauf B, Partovi S, Rohr K, Grunig E, Kauczor H U, Heussel C P, Rengier F. Combined automated 3D volumetry by pulmonary CT angiography and echocardiography for detection of pulmonary hypertension. *Eur Radiol*, 2019; **29**(11): p. 6059-6068.
259. Meyer C, Dahlbom M, Lindner T, Vauclin S, Mona C, Slavik R, Czernin J, Haberkorn U, Calais J. Radiation dosimetry and biodistribution of (68)Ga-FAPI-46 PET imaging in cancer patients. *J Nucl Med*, 2019.
260. Middleton P G, Mall M A, Drevinek P, Lands L C, McKone E F, Polineni D, Ramsey B W, Taylor-Cousar J L, Tullis E, Vermeulen F, Marigowda G, McKee C M, Moskowitz S M, Nair N, Savage J, Simard C, Tian S, Waltz D, Xuan F, Rowe S M, Jain R, Group V X S. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med*, 2019; **381**(19): p. 1809-1819.
261. Mock A, Heilig C E, Kreutzfeldt S, Huebschmann D, Heining C, Schrock E, Brors B, Stenzinger A, Jager D, Schlenk R, Glimm H, Frohling S, Horak P, Network D M. Community-driven development of a modified progression-free survival ratio for precision oncology. *ESMO Open*, 2019; **4**(6): p. e000583.

262. Muhlfeld C, Neves J, Brandenberger C, Hegermann J, Wrede C, Altamura S, Muckenthaler M U. Air-blood barrier thickening and alterations of alveolar epithelial type 2 cells in mouse lungs with disrupted hepcidin/ferroportin regulatory system. *Histochem Cell Biol*, 2019; **151**(3): p. 217-228.
263. Muley T, He Y, Rolny V, Wehnl B, Escherich A, Warth A, Stolp C, Schneider M A, Meister M, Herth F J, Dayyani F. Potential for the blood-based biomarkers cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and human epididymal protein 4 (HE4) to detect recurrence during monitoring after surgical resection of adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 2019; **130**: p. 194-200.
264. Nattenmuller J, Schlett C L, Tsuchiya N, Reeder S B, Pickhardt P J, Kramer H, Kauczor H U, Wielputz M O, Seo J B, Hatabu H, van Beek E J R, Schiebler M L, Representing the International Workshop for Pulmonary Functional I. Noncontrast Chest Computed Tomographic Imaging of Obesity and the Metabolic Syndrome: Part II Noncardiovascular Findings. *J Thorac Imaging*, 2019; **34**(2): p. 126-135.
265. Neves J, Haider T, Gassmann M, Muckenthaler M U. Iron Homeostasis in the Lungs-A Balance between Health and Disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019; **12**(1).
266. Peters S, Dafni U, Boyer M, De Ruyscher D, Faivre-Finn C, Felip E, Garrido P, Girard N, Guckenberger M, Haanen J, Le Pechoux C, Mornex F, Ozsahin M, Paz-Ares L, Planchard D, Raben D, Ramalingam S, Reck M, Smit E, Stahel R, Stenzinger A, Swanton C, Vallone S, Garassino M C. Position of a panel of international lung cancer experts on the approval decision for use of durvalumab in stage III non-small-cell lung cancer (NSCLC) by the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Ann Oncol*, 2019; **30**(2): p. 161-165.
267. Radzina M, Biederer J. Ultrasonography of the Lung. *Rofo*, 2019; **191**(10): p. 909-923.
268. Rengier F, Melzig C, Derlin T, Marra A M, Vogel-Claussen J. Advanced imaging in pulmonary hypertension: emerging techniques and applications. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2019; **35**(8): p. 1407-1420.
269. Richtmann S, Wilkens D, Warth A, Lasitschka F, Winter H, Christopoulos P, Herth F J F, Muley T, Meister M, Schneider M A. FAM83A and FAM83B as Prognostic Biomarkers and Potential New Therapeutic Targets in NSCLC. *Cancers (Basel)*, 2019; **11**(5).
270. Safi S, Yamauchi Y, Stamova S, Rathinasamy A, Op den Winkel J, Junger S, Bucur M, Umansky L, Warth A, Herpel E, Eichhorn M, Winter H, Hoffmann H, Beckhove P. Bone marrow expands the repertoire of functional T cells targeting tumor-associated antigens in patients with resectable non-small-cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 2019; **8**(12): p. e1671762.
271. Salomon J J, Gausterer J C, Selo M A, Hosoya K I, Huwer H, Schneider-Daum N, Lehr C M, Ehrhardt C. OCTN2-Mediated Acetyl-L-Carnitine Transport in Human Pulmonary Epithelial Cells In Vitro. *Pharmaceutics*, 2019; **11**(8).
272. Sareban M, Perz T, Macholz F, Reich B, Schmidt P, Fried S, Mairbaurl H, Berger M M, Niebauer J. Impairment of left atrial mechanics does not contribute to the reduction in stroke volume after active ascent to 4559 m. *Scand J Med Sci Sports*, 2019; **29**(2): p. 223-231.
273. Schlett C L, Nattenmuller J, Tsuchiya N, Vogel-Claussen J, Kauczor H U, Levin D, Hatabu H, Estepar J R, Wu M T, van Beek E J R, Schiebler M L, Representing the International Workshop for Pulmonary Functional I. Noncontrast Chest Computed Tomographic Imaging of Obesity and the Metabolic Syndrome: Part I Cardiovascular Findings. *J Thorac Imaging*, 2019; **34**(2): p. 116-125.
274. Schoilew K, Ueffing H, Dalpke A, Wolff B, Frese C, Wolff D, Boutin S. Bacterial biofilm composition in healthy subjects with and without caries experience. *J Oral Microbiol*, 2019; **11**(1): p. 1633194.
275. Sermet-Gaudelus I, Clancy J P, Nichols D P, Nick J A, De Boeck K, Solomon G M, Mall M A, Bolognese J, Bouisset F, den Hollander W, Paquette-Lamontagne N, Tomkinson N, Henig N,

- Elborn J S, Rowe S M. Antisense oligonucleotide eluforsen improves CFTR function in F508del cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2019; **18**(4): p. 536-542.
276. Skornitzke S, Hirsch J, Kauczor H U, Stiller W. Evaluation of the effect of image noise on CT perfusion measurements using digital perfusion phantoms. *Eur Radiol*, 2019; **29**(4): p. 2089-2097.
277. Small D M, Brown R R, Doherty D F, Abladey A, Zhou-Suckow Z, Delaney R J, Kerrigan L, Dougan C M, Borensztajn K S, Holsinger L, Booth R, Scott C J, Lopez-Campos G, Elborn J S, Mall M A, Weldon S, Taggart C C. Targeting of cathepsin S reduces cystic fibrosis-like lung disease. *Eur Respir J*, 2019; **53**(3).
278. Snieder B, Brast S, Grabner A, Buchholz S, Schroter R, Spoden G A, Florin L, Salomon J, Albrecht T, Barz V, Sparreboom A, Ciarimboli G. Identification of the Tetraspanin CD9 as an Interaction Partner of Organic Cation Transporters 1 and 2. *SLAS Discov*, 2019; **24**(9): p. 904-914.
279. Sommburg O, Helling-Bakki A, Alrajab A, Schenk J P, Springer W, Mall M A, Loukanov T, Eichhorn J G. Assessment of Suspected Vascular Rings and Slings and/or Airway Pathologies Using Magnetic Resonance Imaging Rather Than Computed Tomography. *Respiration*, 2019; **97**(2): p. 108-118.
280. Stahl M, Joachim C, Wielputz M O, Mall M A. Comparison of lung clearance index determined by washout of N₂ and SF₆ in infants and preschool children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 2019; **18**(3): p. 399-406.
281. Stahl M, Wielputz M O, Ricklefs I, Dopfer C, Barth S, Schlegte A, Graeber S Y, Sommerburg O, Diekmann G, Husing J, Koerner-Rettberg C, Nahrlich L, Dittrich A M, Kopp M V, Mall M A. Preventive Inhalation of Hypertonic Saline in Infants with Cystic Fibrosis (PRESIS). A Randomized, Double-Blind, Controlled Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019; **199**(10): p. 1238-1248.
282. Stenzinger A, Allen J D, Maas J, Stewart M D, Merino D M, Wempe M M, Dietel M. Tumor mutational burden standardization initiatives: Recommendations for consistent tumor mutational burden assessment in clinical samples to guide immunotherapy treatment decisions. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019; **58**(8): p. 578-588.
283. Streubel A, Stenzinger A, Stephan-Falkenau S, Kollmeier J, Misch D, Blum T G, Bauer T, Landt O, Am Ende A, Schirmacher P, Mairinger T, Endris V. Comparison of different semi-automated cfDNA extraction methods in combination with UMI-based targeted sequencing. *Oncotarget*, 2019; **10**(55): p. 5690-5702.
284. Thielmann C M, Costa da Silva M, Muley T, Meister M, Herpel E, Muckenthaler M U. Iron accumulation in tumor-associated macrophages marks an improved overall survival in patients with lung adenocarcinoma. *Sci Rep*, 2019; **9**(1): p. 11326.
285. Thunnissen E, Kerr K M, Dafni U, Bubendorf L, Finn S P, Soltermann A, Biernat W, Cheney R, Verbeke E, Warth A, Marchetti A, Speel E M, Pokharel S, Quinn A M, Monkhorst K, Navarro A, Madsen L B, Tsourti Z, Geiger T, Kammler R, Peters S, Stahel R A, European Thoracic Oncology Platform Lungscape C. Programmed death-ligand 1 expression influenced by tissue sample size. Scoring based on tissue microarrays' and cross-validation with resections, in patients with, stage I-III, non-small cell lung carcinoma of the European Thoracic Oncology Platform Lungscape cohort. *Mod Pathol*, 2019.
286. Treue D, Bockmayr M, Stenzinger A, Heim D, Hester S, Klauschen F. Proteogenomic systems analysis identifies targeted therapy resistance mechanisms in EGFR-mutated lung cancer. *Int J Cancer*, 2019; **144**(3): p. 545-557.
287. Trudzinski F C, Kahnert K, Vogelmeier C F, Alter P, Seiler F, Fahndrich S, Watz H, Welte T, Speer T, Zewinger S, Biertz F, Kauczor H U, Jorres R A, Bals R, consortium C. Combined effects

- of lung function, blood gases and kidney function on the exacerbation risk in stable COPD: Results from the COSYCONET cohort. *Respir Med*, 2019; **154**: p. 18-26.
288. Volckmar A L, Leichsenring J, Kirchner M, Christopoulos P, Neumann O, Budczies J, Morais de Oliveira C M, Rempel E, Buchhalter I, Brandt R, Allgauer M, Talla S B, von Winterfeld M, Herpel E, Goeppert B, Lier A, Winter H, Brummer T, Frohling S, Faehling M, Fischer J R, Heussel C P, Herth F, Lasitschka F, Schirmacher P, Thomas M, Endris V, Penzel R, Stenzinger A. Combined targeted DNA and RNA sequencing of advanced NSCLC in routine molecular diagnostics: Analysis of the first 3,000 Heidelberg cases. *Int J Cancer*, 2019; **145**(3): p. 649-661.
289. Wagner W L, Rothermel A, Mokry T, Sommerer C, Heussel C P, Kauczor H U. [Rare cause for acute chest pain and dyspnea in young men]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2019; **114**(4): p. 342-344.
290. Wagner W L, Rothermel A, Optazait D E, Schneider D, Kreuter M, Kauczor H U, Heussel C P. [Acute hemoptysis and crazy-paving pattern]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2019; **114**(6): p. 558-560.
291. Walscher J, Gross B, Eberhardt R, Heussel C P, Eichinger M, Warth A, Lasitschka F, Herth F J F, Kreuter M. Transbronchial Cryobiopsies for Diagnosing Interstitial Lung Disease: Real-Life Experience from a Tertiary Referral Center for Interstitial Lung Disease. *Respiration*, 2019; **97**(4): p. 348-354.
292. Weber R, Meister M, Muley T, Thomas M, Sultmann H, Warth A, Winter H, Herth F J F, Schneider M A. Pathways regulating the expression of the immunomodulatory protein glycodelin in nonsmall cell lung cancer. *Int J Oncol*, 2019; **54**(2): p. 515-526.
293. Weinheimer O, Hoff B A, Fortuna A B, Fernandez-Baldera A, Konietzke P, Wielputz M O, Robinson T E, Galban C J. Influence of Inspiratory/Expiratory CT Registration on Quantitative Air Trapping. *Acad Radiol*, 2019; **26**(9): p. 1202-1214.
294. Wielputz M O, Eichinger M, Wege S, Eberhardt R, Mall M A, Kauczor H U, Puderbach M U, Risse F, Heussel C P, Heussel G. Midterm Reproducibility of Chest Magnetic Resonance Imaging in Adults with Clinically Stable Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019; **200**(1): p. 103-107.
295. Wielputz M O, Triphan S M F, Ohno Y, Jobst B J, Kauczor H U. Outracing Lung Signal Decay - Potential of Ultrashort Echo Time MRI. *Rofo*, 2019; **191**(5): p. 415-423.
296. Wolff D, Frese C, Schoilew K, Dalpke A, Wolff B, Boutin S. Amplicon-based microbiome study highlights the loss of diversity and the establishment of a set of species in patients with dentin caries. *PLoS One*, 2019; **14**(7): p. e0219714.
297. Woods J C, Wild J M, Wielputz M O, Clancy J P, Hatabu H, Kauczor H U, van Beek E J R, Altes T A. Current state of the art MRI for the longitudinal assessment of cystic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*, 2019.

2020

298. Ackermann M, Stark H, Neubert L, Schubert S, Borchert P, Linz F, Wagner W L, Stiller W, Wielputz M, Hoefer A, Haverich A, Mentzer S J, Shah H R, Welte T, Kuehnelt M, Jonigk D. Morphomolecular motifs of pulmonary neoangiogenesis in interstitial lung diseases. *Eur Respir J*, 2020; **55**(3).
299. Akl E A, Blazic I, Yaacoub S, Frija G, Chou R, Appiah J A, Fatehi M, Flor N, Hitti E, Jafri H, Jin Z Y, Kauczor H U, Kawooya M, Kazerooni E A, Ko J P, Mahfouz R, Muglia V, Nyabanda R, Sanchez M, Shete P B, Ulla M, Zheng C, van Deventer E, Perez M D R. Use of Chest Imaging in the Diagnosis and Management of COVID-19: A WHO Rapid Advice Guide. *Radiology*, 2020: p. 203173.

300. Allen B D, Schiebler M L, Sommer G, Kauczor H U, Biederer J, Kruser T J, Carr J C, Hazen G. Cost-effectiveness of lung MRI in lung cancer screening. *Eur Radiol*, 2020; **30**(3): p. 1738-1746.
301. Altmann A, Haberkorn U A, Siveke J. The latest developments in imaging fibroblast activation protein (FAP). *J Nucl Med*, 2020.
302. Anagnostopoulou P, Latzin P, Jensen R, Stahl M, Harper A, Yasmine S, Usemann J, Foong R E, Spycher B, Hall G L, Singer F, Stanojevic S, Mall M A, Ratjen F, Ramsey K A. Normative data for multiple breath washout outcomes in school-aged Caucasian children. *Eur Respir J*, 2020; **55**(4).
303. Baloglu E, Nonnenmacher G, Seleninova A, Berg L, Velineni K, Ermis-Kaya E, Mairbaur H. The role of hypoxia-induced modulation of alveolar epithelial Na(+)- transport in hypoxemia at high altitude. *Pulm Circ*, 2020; **10**(1 Suppl): p. 50-58.
304. Barben J, Castellani C, Munck A, Davies J C, de Winter-de Groot K M, Gartner S, Kashirskaya N, Linnane B, Mayell S J, McColley S, Ooi C Y, Proesmans M, Ren C L, Salinas D, Sands D, Sermet-Gaudelus I, Sommerburg O, Southern K W, European C F S N S W G. Updated guidance on the management of children with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-related metabolic syndrome/cystic fibrosis screen positive, inconclusive diagnosis (CRMS/CFSPID). *J Cyst Fibros*, 2020.
305. Becker N, Motsch E, Trotter A, Heussel C P, Dienemann H, Schnabel P A, Kauczor H U, Maldonado S G, Miller A B, Kaaks R, Delorme S. Lung cancer mortality reduction by LDCT screening-Results from the randomized German LUSI trial. *Int J Cancer*, 2020; **146**(6): p. 1503-1513.
306. Biederer J, Ohno Y, Hatabu H, Schiebler M L, van Beek E J R, Vogel-Claussen J, Kauczor H U. "Screening for lung cancer: Does MRI have a role?" [European Journal of Radiology 86 (2017) 353-360]. *Eur J Radiol*, 2020; **125**: p. 108896.
307. Bischoff A, Weinheimer O, Eichinger M, Stahl M, Sommerburg O, Kauczor H U, Mall M A, Wielputz M O. [Cystic fibrosis and computed tomography of the lungs]. *Radiologe*, 2020; **60**(9): p. 791-801.
308. Bornitz F, Ewert R, Knaak C, Magnet F S, Windisch W, Herth F. Weaning from Invasive Ventilation in Specialist Centers Following Primary Weaning Failure. *Dtsch Arztebl Int*, 2020; **117**(12): p. 205-210.
309. Boutin S, Dalpke A H. The Microbiome: A Reservoir to Discover New Antimicrobials Agents. *Curr Top Med Chem*, 2020; **20**(14): p. 1291-1299.
310. Brandelik S C, Heussel C P, Kauczor H U, Rocken C, Huber L, Basset M, Kimmich C, Schonland S O, Hegenbart U, Nattenmuller J. CT features in amyloidosis of the respiratory system - Comprehensive analysis in a tertiary referral center cohort. *Eur J Radiol*, 2020; **129**: p. 109123.
311. Brown R, Paulsen M, Schmidt S, Schatterny J, Frank A, Hirtz S, Delaney R, Doherty D, Hagner M, Taggart C, Weldon S, Mall M A. Lack of IL-1 Receptor Signaling Reduces Spontaneous Airway Eosinophilia in Juvenile Mice with Muco-Obstructive Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020; **62**(3): p. 300-309.
312. Budczies J, Kazdal D, Allgauer M, Christopoulos P, Rempel E, Pfarr N, Weichert W, Frohling S, Thomas M, Peters S, Endris V, Schirmacher P, Stenzinger A. Quantifying potential confounders of panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement. *Lung Cancer*, 2020; **142**: p. 114-119.
313. Buk M, Rengier F, Mokry T, Riffel J, Giannitsis E, Kihm L, Malikova H, Kauczor H U, von Stackelberg O, Weber T F. Appropriateness of CT pulmonary angiograms according to current diagnostic guidelines based on risk stratification: A retrospective single-center study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2020.

314. Catarata M J, Medeiros R, Oliveira M J, Pego A, Frade J G, Martins M F, Robalo Cordeiro C, Herth F J F, Thomas M, Kriegsmann M, Meister M, Schneider M A, Muley T, Ribeiro R. Germline Genetic Variants of the Renin-Angiotensin System, Hypoxia and Angiogenesis in Non-Small Cell Lung Cancer Progression: Discovery and Validation Studies. *Cancers (Basel)*, 2020; **12**(12).
315. Christopoulos P, Kirchner M, Roeper J, Saalfeld F, Janning M, Bozorgmehr F, Magios N, Kazdal D, Volckmar A L, Bruckner L M, Bochtler T, Kriegsmann M, Endris V, Penzel R, Kriegsmann K, Eichhorn M, Herth F J F, Heussel C P, El Shafie R A, Schneider M A, Muley T, Meister M, Faehling M, Fischer J R, Heukamp L, Schirmacher P, Bischoff H, Wermke M, Loges S, Griesinger F, Stenzinger A, Thomas M. Risk stratification of EGFR(+) lung cancer diagnosed with panel-based next-generation sequencing. *Lung Cancer*, 2020; **148**: p. 105-112.
316. Dietz S, Christopoulos P, Yuan Z, Angeles A K, Gu L, Volckmar A L, Ogrodnik S J, Janke F, Fratte C D, Zemojtel T, Schneider M A, Kazdal D, Endris V, Meister M, Muley T, Cecchin E, Reck M, Schlesner M, Thomas M, Stenzinger A, Sultmann H. Longitudinal therapy monitoring of ALK-positive lung cancer by combined copy number and targeted mutation profiling of cell-free DNA. *EBioMedicine*, 2020; **62**: p. 103103.
317. Do T D, Rheinheimer S, Kauczor H U, Stiller W, Weber T, Skornitzke S. Image quality evaluation of dual-layer spectral CT in comparison to single-layer CT in a reduced-dose setting. *Eur Radiol*, 2020; **30**(10): p. 5709-5719.
318. Duerr J, Leitz D H W, Szczygiel M, Dvornikov D, Fraumann S G, Kreutz C, Zadora P K, Seyhan Agircan A, Konietzke P, Engelmann T A, Hegermann J, Mulugeta S, Kawabe H, Knudsen L, Ochs M, Rotin D, Muley T, Kreuter M, Herth F J F, Wielputz M O, Beers M F, Klingmüller U, Mall M A. Conditional deletion of Nedd4-2 in lung epithelial cells causes progressive pulmonary fibrosis in adult mice. *Nat Commun*, 2020; **11**(1): p. 2012.
319. Eichstaedt C A, Mairbaur H, Song J, Benjamin N, Fischer C, Dehnert C, Schommer K, Berger M M, Bartsch P, Grunig E, Hinderhofer K. Genetic Predisposition to High-Altitude Pulmonary Edema. *High Alt Med Biol*, 2020; **21**(1): p. 28-36.
320. Giesel F, Adeberg S, Syed M, Lindner T, Jimenez L D, Mavriopoulou E, Staudinger F, Tonndorf-Martini E, Regnery S, Rieken S, ElShafie R, Rohrich M, Flechsig P, Kluge A, Altmann A, Debus J, Haberkorn U A, Kratochwil C. FAPI-74 PET/CT Using Either (18)F-AIF or Cold-kit (68)Ga-labeling: Biodistribution, Radiation Dosimetry and Tumor Delineation in Lung Cancer Patients. *J Nucl Med*, 2020.
321. Gonzalez Maldonado S, Delorme S, Husing A, Motsch E, Kauczor H U, Heussel C P, Kaaks R. Evaluation of Prediction Models for Identifying Malignancy in Pulmonary Nodules Detected via Low-Dose Computed Tomography. *JAMA Netw Open*, 2020; **3**(2): p. e1921221.
322. Gonzalez Maldonado S, Motsch E, Trotter A, Kauczor H U, Heussel C P, Hermann S, Zeissig S R, Delorme S, Kaaks R. Overdiagnosis in lung cancer screening: Estimates from the German Lung Cancer Screening Intervention Trial. *Int J Cancer*, 2020.
323. Graeber S Y, van Mourik P, Vonk A M, Kruisselbrink E, Hirtz S, van der Ent C K, Mall M A, Beekman J M. Comparison of Organoid Swelling and In Vivo Biomarkers of CFTR Function to Determine Effects of Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for the F508del Mutation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020; **202**(11): p. 1589-1592.
324. Gramer G, Brockow I, Labitzke C, Fang-Hoffmann J, Beivers A, Feyh P, Hoffmann G F, Nennstiel U, Sommerburg O. Implementing a tracking system for confirmatory diagnostic results after positive newborn screening for cystic fibrosis-implications for process quality and patient care. *Eur J Pediatr*, 2020.
325. Griesinger F, Eberhardt W, Nusch A, Reiser M, Zahn M O, Maintz C, Bernhardt C, Losem C, Stenzinger A, Heukamp L C, Buttner R, Marschner N, Janicke M, Fleitz A, Spring L, Sahlmann J, Karatas A, Hipper A, Weichert W, Heilmann M, Sadjadian P, Gleiber W, Grah C, Waller C F,

- Reck M, Rittmeyer A, Christopoulos P, Sebastian M, Thomas M, Group C R. Biomarker testing in non-small cell lung cancer in routine care: Analysis of the first 3,717 patients in the German prospective, observational, nation-wide CRISP Registry (AIO-TRK-0315). *Lung Cancer*, 2020.
326. Guerra M, Halls V S, Schatterny J, Hagner M, Mall M A, Schultz C. Protease FRET Reporters Targeting Neutrophil Extracellular Traps. *J Am Chem Soc*, 2020.
327. Haase R, Dodd J D, Kauczor H U, Kazerooni E A, Dewey M. Developing a lung nodule management protocol specifically for cardiac CT: Methodology in the DISCHARGE trial. *Eur J Radiol Open*, 2020; **7**: p. 100235.
328. Hagner M, Albrecht M, Guerra M, Braubach P, Halle O, Zhou-Suckow Z, Butz S, Jonigk D, Hansen G, Schultz C, Dittrich A M, Mall M A. IL-17A from innate and adaptive lymphocytes contributes to inflammation and damage in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*, 2020.
329. Hagner M, Frey D L, Guerra M, Dittrich A S, Halls V S, Wege S, Herth F J F, Schultz C, Mall M A. New method for rapid and dynamic quantification of elastase activity on sputum neutrophils from patients with cystic fibrosis using flow cytometry. *Eur Respir J*, 2020; **55**(4).
330. Hatabu H, Ohno Y, Geftter W B, Parraga G, Madore B, Lee K S, Altes T A, Lynch D A, Mayo J R, Seo J B, Wild J M, van Beek E J R, Schiebler M L, Kauczor H U, Fleischner S. Expanding Applications of Pulmonary MRI in the Clinical Evaluation of Lung Disorders: Fleischner Society Position Paper. *Radiology*, 2020; **297**(2): p. 286-301.
331. Hippchen T, Altamura S, Muckenthaler M U, Merle U. Hypoferremia is Associated With Increased Hospitalization and Oxygen Demand in COVID-19 Patients. *Hemasphere*, 2020; **4**(6): p. e492.
332. Jin Q, Heussel C P, Kauczor H U, Cui W, Lv G. [Evolution of CT manifestations in a Coronavirus (2019-nCoV) pneumonia patient]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2020; **115**(5): p. 412-413.
333. Kahnert K, Jorres R A, Kauczor H U, Biederer J, Jobst B, Alter P, Biertz F, Mertsch P, Lucke T, Lutter J I, Trudzinski F C, Behr J, Bals R, Watz H, Vogelmeier C F, Welte T, Study-Group C, Names of participating study n. Relationship between clinical and radiological signs of bronchiectasis in COPD patients: Results from COSYCONET. *Respir Med*, 2020; **172**: p. 106117.
334. Kauczor H U, Baird A M, Blum T G, Bonomo L, Bostantzoglou C, Burghuber O, Cepicka B, Comanescu A, Couraud S, Devaraj A, Jespersen V, Morozov S, Agmon I N, Peled N, Powell P, Prosch H, Ravara S, Rawlinson J, Revel M P, Silva M, Snoeckx A, van Ginneken B, van Meerbeeck J P, Vardavas C, von Stackelberg O, Gaga M, European Society of R, the European Respiratory S. ESR/ERS statement paper on lung cancer screening. *Eur Radiol*, 2020; **30**(6): p. 3277-3294.
335. Kauczor H U, Baird A M, Blum T G, Bonomo L, Bostantzoglou C, Burghuber O, Cepicka B, Comanescu A, Couraud S, Devaraj A, Jespersen V, Morozov S, Nardi Agmon I, Peled N, Powell P, Prosch H, Ravara S, Rawlinson J, Revel M P, Silva M, Snoeckx A, van Ginneken B, van Meerbeeck J P, Vardavas C, von Stackelberg O, Gaga M, European Society of R, the European Respiratory S. ESR/ERS statement paper on lung cancer screening. *Eur Respir J*, 2020; **55**(2).
336. Kauczor H U, Welte T. The Role of CT in the Diagnosis of COVID-19-a State of Constant Flux. *Dtsch Arztebl Int*, 2020; **117**(22-23): p. 387-388.
337. Klebe M, Fremd C, Kriegsmann M, Kriegsmann K, Albrecht T, Thewes V, Kirchner M, Charoentong P, Volk N, Haag J, Wirtz R, Oskarsson T, Schulz A, Heil J, Schneeweiss A, Winter H, Sinn P. Frequent Molecular Subtype Switching and Gene Expression Alterations in Lung and Pleural Metastasis From Luminal A-Type Breast Cancer. *JCO Precis Oncol*, 2020; **4**.
338. Kocer K, Boutin S, Probst K, Heeg K, Nurjadi D. Whole-genome sequencing disproves two suspected transmission events of blaNDM between *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacterales in hospitalized patients. *J Hosp Infect*, 2020; **106**(2): p. 372-375.

339. Kolbe U, Yi B, Poth T, Saunders A, Boutin S, Dalpke A H. Early Cytokine Induction Upon *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Murine Precision Cut Lung Slices Depends on Sensing of Bacterial Viability. *Front Immunol*, 2020; **11**: p. 598636.
340. Konietzke P, Mueller J, Wuennemann F, Wagner W L, Schenk J P, Alrajab A, Kauczor H U, Stahl M, Mall M A, Wielpütz M O, Sommerburg O. The value of chest magnetic resonance imaging compared to chest radiographs with and without additional lung ultrasound in children with complicated pneumonia. *PLoS One*, 2020; **15**(3): p. e0230252.
341. Konietzke P, Weinheimer O, Wagner W L, Wuennemann F, Hintze C, Biederer J, Heussel C P, Kauczor H U, Wielpütz M O. Optimizing airway wall segmentation and quantification by reducing the influence of adjacent vessels and intravascular contrast material with a modified integral-based algorithm in quantitative computed tomography. *PLoS One*, 2020; **15**(8): p. e0237939.
342. Konietzke P, Wielpütz M O, Wagner W L, Wuennemann F, Kauczor H U, Heussel C P, Eichinger M, Eberhardt R, Gompelmann D, Weinheimer O. Quantitative CT detects progression in COPD patients with severe emphysema in a 3-month interval. *Eur Radiol*, 2020; **30**(5): p. 2502-2512.
343. Kriegsmann K, Zgorzelski C, Kazdal D, Cremer M, Muley T, Winter H, Longuespee R, Kriegsmann J, Warth A, Kriegsmann M. Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) in Thoracic Tumors is Less Sensitive but More Specific Compared With Synaptophysin, Chromogranin A, and CD56. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2020; **28**(3): p. 237-242.
344. Kriegsmann K, Zgorzelski C, Muley T, Christopoulos P, von Winterfeld M, Herpel E, Goepfert B, Mechtersheimer G, Sinn P, Stenzinger A, Schirmacher P, Winter H, Eichinger M, Warth A, Kriegsmann M. Immunohistological expression of oestrogen receptor, progesterone receptor, mammaglobin, human epidermal growth factor receptor 2 and GATA-binding protein 3 in non-small-cell lung cancer. *Histopathology*, 2020; **77**(6): p. 900-914.
345. Kriegsmann M, Haag C, Weis C A, Steinbuss G, Warth A, Zgorzelski C, Muley T, Winter H, Eichhorn M E, Eichhorn F, Kriegsmann J, Christopoulos P, Thomas M, Witzens-Harig M, Sinn P, von Winterfeld M, Heussel C P, Herth F J F, Klauschen F, Stenzinger A, Kriegsmann K. Deep Learning for the Classification of Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020; **12**(6).
346. Kriegsmann M, Zgorzelski C, Casadonte R, Schwamborn K, Muley T, Winter H, Eichhorn M, Eichhorn F, Warth A, Deininger S O, Christopoulos P, Thomas M, Longerich T, Stenzinger A, Weichert W, Müller-Tidow C, Kriegsmann J, Schirmacher P, Kriegsmann K. Mass Spectrometry Imaging for Reliable and Fast Classification of Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes. *Cancers (Basel)*, 2020; **12**(9).
347. Kumar V, Agrawal R, Pandey A, Kopf S, Hoeffgen M, Kaymak S, Bandapalli O R, Gorbunova V, Seluanov A, Mall M A, Herzig S, Nawroth P P. Compromised DNA repair is responsible for diabetes-associated fibrosis. *EMBO J*, 2020; **39**(11): p. e103477.
348. Kuon J, Hommertgen A, Krisam J, Lasitschka F, Stenzinger A, Blasi M, Bozorgmehr F, Maenz M, Kieser M, Schneider M, Thomas M. Durvalumab in frail and elderly patients with stage four non-small cell lung cancer: Study protocol of the randomized phase II DURATION trial. *Trials*, 2020; **21**(1): p. 352.
349. Kuster M M, Schneider M A, Richter A M, Richtmann S, Winter H, Kriegsmann M, Pullamsetti S S, Stiewe T, Savai R, Muley T, Dammann R H. Epigenetic Inactivation of the Tumor Suppressor IRX1 Occurs Frequently in Lung Adenocarcinoma and Its Silencing Is Associated with Impaired Prognosis. *Cancers (Basel)*, 2020; **12**(12).
350. Lasch F, Karch A, Koch A, Derlin T, Voskrebenezov A, Alsady T M, Hoepfer M M, Gall H, Roller F, Harth S, Steiner D, Krombach G, Ghofrani H A, Rengier F, Heussel C P, Grunig E, Beitzke D, Hacker M, Lang I M, Behr J, Bartenstein P, Dinkel J, Schmidt K H, Kreitner K F, Frauenfelder T,

- Ulrich S, Hamer O W, Pfeifer M, Johns C S, Kiely D G, Swift A J, Wild J, Vogel-Claussen J. Comparison of MRI and VQ-SPECT as a Screening Test for Patients With Suspected CTEPH: CHANGE-MRI Study Design and Rationale. *Front Cardiovasc Med*, 2020; **7**: p. 51.
351. Leidenberger T, Gordon Y, Farag M, Delles M, Fava Sanches A, Fink M A, Kallenbach K, Kauczor H U, Rengier F. Imaging-Based 4D Aortic Pressure Mapping in Marfan Syndrome Patients: A Matched Case-Control Study. *Ann Thorac Surg*, 2020; **109**(5): p. 1434-1440.
352. Lenz D, Stahl M, Seidl E, Schondorf D, Brennenstuhl H, Gesenhues F, Heinzmann T, Longerich T, Mendes M I, Prokisch H, Salomons G S, Schon C, Smith D E C, Sommerburg O, Wagner M, Westhoff J H, Reiter K, Staufner C, Griese M. Rescue of respiratory failure in pulmonary alveolar proteinosis due to pathogenic MARS1 variants. *Pediatr Pulmonol*, 2020; **55**(11): p. 3057-3066.
353. Leutz-Schmidt P, Eichinger M, Sommerburg O, Stahl M, Triphan S M F, Gehlen S, Kauczor H U, Puderbach M U, Mall M A, Wielputz M O. [Magnetic resonance imaging of the lungs in cystic fibrosis]. *Radiologe*, 2020; **60**(9): p. 813-822.
354. Leutz-Schmidt P, Wielputz M O, Skornitzke S, Weinheimer O, Kauczor H U, Puderbach M U, Pahn G, Stiller W. Influence of acquisition settings and radiation exposure on CT lung densitometry-An anthropomorphic ex vivo phantom study. *PLoS One*, 2020; **15**(8): p. e0237434.
355. Merino D M, McShane L M, Fabrizio D, Funari V, Chen S J, White J R, Wenz P, Baden J, Barrett J C, Chaudhary R, Chen L, Chen W S, Cheng J H, Cyanam D, Dickey J S, Gupta V, Hellmann M, Helman E, Li Y, Maas J, Papin A, Patidar R, Quinn K J, Rizvi N, Tae H, Ward C, Xie M, Zehir A, Zhao C, Dietel M, Stenzinger A, Stewart M, Allen J, Consortium T M B H. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer*, 2020; **8**(1).
356. Montgomery S T, Frey D L, Mall M A, Stick S M, Kicic A, Arest C F. Rhinovirus Infection Is Associated With Airway Epithelial Cell Necrosis and Inflammation via Interleukin-1 in Young Children With Cystic Fibrosis. *Front Immunol*, 2020; **11**: p. 596.
357. Notohamiprodjo S, Treitl K M, Hauke C, Sutter S M, Auweter S, Pfeiffer F, Reiser M F, Hellbach K. Imaging characteristics of intravascular spherical contrast agents for grating-based x-ray dark-field imaging - effects of concentrations, spherical sizes and applied voltage. *Sci Rep*, 2020; **10**(1): p. 9405.
358. Palm V, Rengier F, Rajiah P, Heussel C P, Partovi S. Acute Pulmonary Embolism: Imaging Techniques, Findings, Endovascular Treatment and Differential Diagnoses. *Rofo*, 2020; **192**(1): p. 38-49.
359. Passaro A, Stenzinger A, Peters S. Tumor Mutational Burden as a Pan-cancer Biomarker for Immunotherapy: The Limits and Potential for Convergence. *Cancer Cell*, 2020; **38**(5): p. 624-625.
360. Pieper M, Schulz-Hildebrandt H, Mall M A, Huttmann G, König P. Intravital microscopic optical coherence tomography imaging to assess mucus-mobilizing interventions for mucobstructive lung disease in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020; **318**(3): p. L518-L524.
361. Polke M, Kirsten D, Teucher B, Kahn N, Geissler K, Costabel U, Herth F J F, Kreuter M. A Comparison of Existing Questionnaires for Identifying the Causes of Interstitial and Rare Lung Diseases. *Respiration*, 2020; **99**(2): p. 119-124.
362. Rheinheimer S, Heussel C P, Mayer P, Gaissmaier L, Bozorgmehr F, Winter H, Herth F J, Muley T, Liersch S, Bischoff H, Kriegsmann M, El Shafie R A, Stenzinger A, Thomas M, Kauczor H U, Christopoulos P. Oligoprogressive Non-Small-Cell Lung Cancer under Treatment with PD-(L)1 Inhibitors. *Cancers (Basel)*, 2020; **12**(4).

363. Rubin G D, Ryerson C J, Haramati L B, Sverzellati N, Kanne J P, Raoof S, Schluger N W, Volpi A, Yim J J, Martin I B K, Anderson D J, Kong C, Altes T, Bush A, Desai S R, Goldin O, Goo J M, Humbert M, Inoue Y, Kauczor H U, Luo F, Mazzone P J, Prokop M, Remy-Jardin M, Richeldi L, Schaefer-Prokop C M, Tomiyama N, Wells A U, Leung A N. The Role of Chest Imaging in Patient Management during the COVID-19 Pandemic: A Multinational Consensus Statement from the Fleischner Society. *Radiology*, 2020; **296**(1): p. 172-180.
364. Ruetten M, Steinmetz H W, Thiersch M, Kik M, Vaughan L, Altamura S, Muckenthaler M U, Gassmann M. Iron Regulation in Elderly Asian Elephants (*Elephas maximus*) Chronically Infected With *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Vet Sci*, 2020; **7**: p. 596379.
365. Sareban M, Perz T, Macholz F, Reich B, Schmidt P, Fried S, Mairbaurl H, Berger M M, Niebauer J. Preserved right ventricular function but increased right atrial contractile demand in altitude-induced pulmonary hypertension. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2020; **36**(6): p. 1069-1076.
366. Schiebler M L, Parraga G, Geftter W B, Madore B, Lee K S, Ohno Y, Kauczor H U, Hatabu H. Synopsis from Expanding Applications of Pulmonary MRI in the Clinical Evaluation of Lung Disorders: Fleischner Society Position Paper. *Chest*, 2020.
367. Schmidkonz C, Rauber S, Atzinger A, Agarwal R, Gotz T I, Soare A, Cordes M, Prante O, Bergmann C, Kleyer A, Ritt P, Maschauer S, Hennig P, Toms J, Kohner M, Manger B, Stone J H, Haberkorn U, Baeuerle T, Distler J H W, Agaimy A, Kuwert T, Schett G, Ramming A. Disentangling inflammatory from fibrotic disease activity by fibroblast activation protein imaging. *Ann Rheum Dis*, 2020; **79**(11): p. 1485-1491.
368. Schmitt F C F, Lipinski A, Hofer S, Uhle F, Nusschag C, Hackert T, Dalpke A H, Weigand M A, Brenner T, Boutin S. Pulmonary microbiome patterns correlate with the course of the disease in patients with sepsis-induced ARDS following major abdominal surgery. *J Hosp Infect*, 2020.
369. Selo M A, Sake J A, Ehrhardt C, Salomon J J. Organic Cation Transporters in the Lung-Current and Emerging (Patho)Physiological and Pharmacological Concepts. *Int J Mol Sci*, 2020; **21**(23).
370. Sha D, Jin Z, Budczies J, Kluck K, Stenzinger A, Sinicrope F A. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discov*, 2020; **10**(12): p. 1808-1825.
371. Silva M, Milanese G, Kauczor H U, Revel M P, Sverzellati N. Milestones towards lung cancer screening implementation. *Clin Radiol*, 2020; **75**(12): p. 881-885.
372. Sin D, McLennan G, Rengier F, Haddadin I, Heresi G A, Bartholomew J R, Fink M A, Thompson D, Partovi S. Acute pulmonary embolism multimodality imaging prior to endovascular therapy. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2020.
373. Sommerburg O, Hammermann J. Pancreatitis-Associated Protein in Neonatal Screening for Cystic Fibrosis: Strengths and Weaknesses. *Int J Neonatal Screen*, 2020; **6**(2): p. 28.
374. Sommerburg O, Schenk J P. [Abdominal manifestations in cystic fibrosis : Clinical review]. *Radiologe*, 2020; **60**(9): p. 781-790.
375. Sommerburg O, Wielputz M O, Trame J P, Wuennemann F, Opdazaite E, Stahl M, Puderbach M U, Kopp-Schneider A, Fritzsche E, Kauczor H U, Baumann I, Mall M A, Eichinger M. Magnetic Resonance Imaging Detects Chronic Rhinosinusitis in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*, 2020; **17**(6): p. 714-723.
376. Sorensen M, Kantorek J, Byrnes L, Boutin S, Mall M A, Lasitschka F, Zabeck H, Nguyen D, Dalpke A H. *Pseudomonas aeruginosa* Modulates the Antiviral Response of Bronchial Epithelial Cells. *Front Immunol*, 2020; **11**: p. 96.
377. Sorensen M, Khakimov B, Nurjadi D, Boutin S, Yi B, Dalpke A H, Eigenbrod T. Comparative evaluation of the effect of different growth media on in vitro sensitivity to azithromycin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2020; **9**(1): p. 197.

378. Stahl M, Joachim C, Kirsch I, Uselmann T, Yu Y, Alfeis N, Berger C, Minso R, Rudolf I, Stolpe C, Bovermann X, Liboschik L, Steinmetz A, Tennhardt D, Dorfler F, Rohmel J, Unorji-Frank K, Ruckes-Nilges C, von Stoutz B, Naehrlich L, Kopp M V, Dittrich A M, Sommerburg O, Mall M A. Multicentre feasibility of multiple-breath washout in preschool children with cystic fibrosis and other lung diseases. *ERJ Open Res*, 2020; **6**(4).
379. Stenzinger A, Endris V, Budczies J, Merkelbach-Bruse S, Kazdal D, Dietmaier W, Pfarr N, Siebolts U, Hummel M, Herold S, Andreas J, Zoche M, Togel L, Rempel E, Maas J, Merino D, Stewart M, Zaoui K, Schlesner M, Glimm H, Frohling S, Allen J, Horst D, Baretton G, Wickenhauser C, Tiemann M, Evert M, Moch H, Kirchner T, Buttner R, Schirmacher P, Jung A, Haller F, Weichert W, Dietel M. Harmonization and Standardization of Panel-Based Tumor Mutational Burden Measurement: Real-World Results and Recommendations of the Quality in Pathology Study. *J Thorac Oncol*, 2020; **15**(7): p. 1177-1189.
380. Swenson K E, Berger M M, Sareban M, Macholz F, Schmidt P, Schiefer L M, Mairbaurl H, Swenson E R. Rapid Ascent to 4559 m Is Associated with Increased Plasma Components of the Vascular Endothelial Glycocalyx and May Be Associated with Acute Mountain Sickness. *High Alt Med Biol*, 2020; **21**(2): p. 176-183.
381. Triphan S M F, Stahl M, Jobst B J, Sommerburg O, Kauczor H U, Schenk J P, Alrajab A, Eichinger M, Mall M A, Wielputz M O. Echo Time-Dependence of Observed Lung T1 in Patients With Cystic Fibrosis and Correlation With Clinical Metrics. *J Magn Reson Imaging*, 2020; **52**(6): p. 1645-1654.
382. Trudzinski F C, Jorres R A, Alter P, Kahnert K, Waschki B, Herr C, Kellerer C, Omlor A, Vogelmeier C F, Fahndrich S, Watz H, Welte T, Jany B, Sohler S, Biertz F, Herth F, Kauczor H U, Bals R, consortium C. Associations of oxygenated hemoglobin with disease burden and prognosis in stable COPD: Results from COSYCONET. *Sci Rep*, 2020; **10**(1): p. 10544.
383. Turkowski K, Herzberg F, Gunther S, Brunn D, Weigert A, Meister M, Muley T, Kriegsmann M, Schneider M A, Winter H, Thomas M, Grimminger F, Seeger W, Savai Pullamsetti S, Savai R. Fibroblast Growth Factor-14 Acts as Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinomas. *Cells*, 2020; **9**(8).
384. Umkehrer S, Morrone C, Dinkel J, Aigner L, Reiser M F, Herzen J, Yildirim A O, Pfeiffer F, Hellbach K. A proof-of-principal study using phase-contrast imaging for the detection of large airway pathologies after lung transplantation. *Sci Rep*, 2020; **10**(1): p. 18444.
385. Vogel-Claussen J, Ley-Zaporozhan J, Agarwal P, Biederer J, Kauczor H U, Ley S, Kuhl H, Mueller-Lisse U G, Persigehl T, Schlett C L, Wormanns D, Antoch G, Hamer O W. Recommendations of the Thoracic Imaging Section of the German Radiological Society for clinical application of chest imaging and structured CT reporting in the COVID-19 pandemic. *Rofo*, 2020; **192**(7): p. 633-640.
386. Wagner W L, Hellbach K, Fiedler M O, Salg G A, Wehrse E, Ziener C H, Merle U, Eckert C, Weber T F, Stiller W, Wielputz M O, Dullin C, Kenngott H G, Schlemmer H P, Weigand M A, Schirmacher P, Longerich T, Kauczor H U, Kommos F K, Schwab C. [Microvascular changes in COVID-19]. *Radiologe*, 2020; **60**(10): p. 934-942.
387. Wagner W L, Zheng Y, Pierce A, Ackermann M, Horstmann H, Kuner T, Ronchi P, Schwab Y, Konietzke P, Wunnemann F, Wielputz M O, Kauczor H U, Mentzer S J. Mesopolysaccharides: The extracellular surface layer of visceral organs. *PLoS One*, 2020; **15**(9): p. e0238798.
388. Wessels S, Muley T, Christopoulos P, Meister M, Heinzmann-Groth I, Warth A, Herpel E, Hummler S, Klingmuller U, Kuon J, Heussel C P, Eberhardt R, Herth F J F, Winter H, Bischoff H, Stenzinger A, Reck M, Huber R M, Thomas M, Schneider M A. Comprehensive serial biobanking in advanced NSCLC: feasibility, challenges and perspectives. *Transl Lung Cancer Res*, 2020; **9**(4): p. 1000-1014.

- 389. Wielputz M O. Making Contrast Material Obsolete: Functional Lung Imaging with MRI. *Radiology*, 2020; **296**(1): p. 200-201.
- 390. Wielputz M O, Puderbach M U, Delorme S. [Cystic fibrosis : A systemic problem]. *Radiologe*, 2020; **60**(9): p. 771-773.
- 391. Windisch P, Zwahlen D R, Koerber S A, Giesel F L, Debus J, Haberkorn U, Adeberg S. Clinical Results of Fibroblast Activation Protein (FAP) Specific PET and Implications for Radiotherapy Planning: Systematic Review. *Cancers (Basel)*, 2020; **12**(9).
- 392. Woods J C, Wild J M, Wielputz M O, Clancy J P, Hatabu H, Kauczor H U, van Beek E J R, Altes T A. Current state of the art MRI for the longitudinal assessment of cystic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*, 2020; **52**(5): p. 1306-1320.
- 393. Wucherpfennig L, Kahn N, Preusch M R, Kriegsmann M, Heussel C P, Wielputz M O, Kreuter M, Kriegsmann K, Eichinger M. [Fever, cough, limb pain - a trivial infection?]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2020.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN (nicht zutreffend)	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Deutsches Zentrum für Lungenforschung - "Translationale Forschung zur Bekämpfung weitverbreiteter Lungenerkrankungen"	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Boutin, Sébastien Haberkorn, Uwe Kauczor, Hans-Ulrich Mairbörl, Heimo Mall, Marcus Muckenthaler, Martina Sommerburg, Olaf Stahl, Mirjam Stenzinger, Albrecht Teucher, Birgit Wielpütz, Mark	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2020
	6. Veröffentlichungsdatum (aktuelles Datum in profi eintragen)
	7. Form der Publikation TIB (Hannover)
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Grabengasse 1 69117 Heidelberg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution (nicht zutreffend)
	10. Förderkennzeichen 82DZL004A1
	11. Seitenzahl 152
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst, Baden-Württemberg Königsstraße 46, 70173 Stuttgart	13. Literaturangaben 393 vollständige Auflistung im Appendix 1
	14. Tabellen 8
	15. Abbildungen 15
16. Zusätzliche Angaben Deutsches Zentrum für Lungenforschung – Schlussbericht zur Förderperiode 2016 - 2020	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Fördermittelmanagement des Helmholtz Zentrums München, 29.03.2021	
18. Kurzfassung Im Rahmen des Forschungsprogramms des DZL wurde am Translational Lung Research Center Heidelberg (TLRC), Partneereinrichtungen Universitätsklinikum Heidelberg und Universität Heidelberg, ein koordiniertes translationales Forschungsprogramm zur Verbesserung des Verständnisses der Krankheitsentstehung, Prävention, Diagnostik und Therapie von chronischen und malignen Lungenerkrankungen durchgeführt. Im Mittelpunkt standen die Krankheitsbereiche COPD, Mukoviszidose, Lungenkrebs, und interstitielle Lungenerkrankungen. Des Weiteren leistete die Plattformen Bildgebung einen wichtigen Beitrag zum Forschungsprogramm. Im Bereich COPD wurde nachgewiesen, dass Störungen der mukociliären Clearance die negativen Effekte von Passivrauchen auf die Lungengesundheit erheblich verstärken und gleichzeitig einen wesentlichen Risikofaktor bei der Pathogenese Allergen-induzierter Atemwegserkrankungen darstellt. Im Bereich CF wurde die große Bedeutung von Störungen des Chloridkanals für den Lungenphänotyp erstmals nachgewiesen. Weiterhin wurde die Bedeutung eines balanzierten Mikrobioms belegt und positive Effekte der Therapie mit Orkambi auf das Mikrobiom gezeigt. Im Bereich Lungenkrebs wurde die Bedeutung der tumorbiologischen Heterogenität mit Blick auf Aggressivität und Progression des Tumors umfassend untersucht. Für die Bildgebung von Lungenkrebs wurden neuartige Tracer für Integrin $\alpha v \beta 6$ und das Fibroblasten aktivierende Protein in der PET/CT entwickelt und erstmalig beim Menschen eingesetzt. Die Plattform Bildgebung hat weitere neue bildbasierte Biomarker entwickelt und in Machbarkeits- sowie klinischen Studien validiert. Weiterhin wurde die Nutzbarkeit bildbasierter Metadaten für Algorithmen der künstlichen Intelligenz auf den Weg gebracht. Damit hat das Universitätsklinikum und Universität Heidelberg entscheidend zur translationalen Forschung im TLRC/ DZL beigetragen und gute Voraussetzungen für die Fortsetzung des Forschungsprogramms in der Förderperiode 2021-23 geschaffen.	
19. Schlagwörter Lungenkrebs, Bronchialkarzinom, NSCLC, COPD, Mukoviszidose, Interstitielle Lungenerkrankungen, Lungenfibrose, Bildgebung, Translationale Forschung, DZL, TLRC, DZG	
20. Verlag Veröffentlicht über TIB (Hannover)	21. Preis (nicht zutreffend)