

SCHLUSSBERICHT

Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL)

STANDORT

Translational Lung Research Center Heidelberg

FÖRDERKENNZEICHEN

82DZL004B4

PARTNER

Deutsches Krebsforschungszentrum

01.01.2021 – 31.12.2023

AUTORINNEN UND AUTOREN

Rudolf Kaaks, Ursula Klingmüller, Sonja Loges, Christoph Plass, Rocio Sotillo, Holger Sültmann

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 82DZL004B4

Zuwendungsempfänger: DKFZ

Laufzeit des Vorhabens: von 01.01.2021 bis 31.12.2023

Vorhabenbezeichnung: Deutsches Zentrum für Lungenforschung - "Translationale Forschung zur Bekämpfung weitverbreiteter Lungenerkrankungen"

I. Kurzbericht

– Aufgabenstellung und Zielsetzung

Lungenkrankheiten stellen weltweit eine der Haupttodesursachen dar. Es wird erwartet, dass die Inzidenz und die daraus resultierende Belastung des Gesundheitssystems in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen werden. Durch den Zusammenschluss der fünf führenden deutschen Lungenzentren (Airway Research Center North, **ARCN**; Biomedical Research in End-Stage and Obstructive Lung Disease Hannover, **BREATH**; Comprehensive Pneumology Center Munich, **CPC-M**; Translational Lung Research Center Heidelberg, **TLRC**; Universities of Giessen & Marburg Lung Center, **UGMLC**) wurde im November 2011 das **Deutsche Zentrum für Lungenforschung (DZL)** gegründet. Alle Partner haben sich auf eine konzertierte Zusammenarbeit und eine ehrgeizige Forschungsstrategie geeinigt, um die Mission des DZL zu erfüllen: **Translationale Forschung zur Bekämpfung weitverbreiteter Lungenkrankheiten.**

Zu den zentralen Merkmalen des DZL gehören die Zusammenführung komplementärer Institutionen (EMBL, Fraunhofer, Helmholtz, Leibniz, Max Planck, Universitätskliniken, Pneumologische Zentren), die Bereitstellung finanzieller Ressourcen (institutionelle Budgets an Universitäten, Wissenschaftsorganisationen, Lungenkliniken; das DZL-Budget; Drittmittel aus verschiedenen Quellen), die gemeinsame Nutzung von Ressourcen (Wissen, Technologien, Biobanken, Patientenkohorten etc.) und Anreize für DZL-weite Kooperationen und Austauschprogramme. Im September 2022 umfasst das DZL 263 leitende Wissenschaftler aus 29 führenden deutschen Forschungseinrichtungen und deren Arbeitsgruppen, von denen die überwiegende Mehrheit an den fünf DZL-Standorten tätig ist.

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 Grundlagenforschung anzuregen (*from bench to bedside to bench*). Ein übergeordnetes wissenschaftliches Konzept verbindet die verschiedenen Krankheitsbereiche. Die Forschung ist in kooperativen Programmen organisiert 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, Workshop zum Schreiben von Förderanträgen und wissenschaftliche Symposien, 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.

– **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 2021-23 aufbauend auf den Ergebnissen der ersten (2011-15) und zweiten Förderperiode (2016-20) fortgeführt. Mit der Evaluierung im Jahr 2022 wurde das ursprüngliche Programm basierend auf den Vorschlägen von Gutachtern und Gutachterinnen sowie Wissenschaftlichem Beirat in einzelnen Punkten angepasst, um aktuellen wissenschaftlichen und strukturellen Entwicklungen Rechnung zu tragen.

– **Planung und Ablauf des Vorhabens**

Genaue Planung und Ablauf des Vorhabens sind im Meilensteinplan in Anhang 1 detailliert dargelegt.

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

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

- 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), PROGNOSES, ped-CAPNETZ, PROGRESS, COSYCONET)
- Assoziierung großer Thorax-Kliniken (ARCN, TLRC, CPC-M)
- Rekrutierung von international ausgewiesenen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern aus dem In- und Ausland
- Erweiterung des internationalen Beirats, bestehend aus renommierten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern, um einen Vertreter der Industrie
- Durchführung von Jahrestreffen mit bis zu 500 Lungenforscherinnen und -forschern

- 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 der Programms „Deutsch-Französische Lungenschule“; jährliche Munich International Autumn School for Respiratory Medicine (MIAS)
- Informationen für Patientinnen und Patienten über den Lungeninformationsdienst des DZL (www.lungeninformationsdienst.de)
- Aufbau und Gestaltung einer DZL-Website
- 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
- DZL-Beteiligung an klinischen Kohorten und Registern

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

- Weltweite Zulassung einer neuen Therapie für Pulmonal-arterielle Hypertonie (Riociguat) (PH)
- Erfolgreiche erste Studie eines neuen Therapieansatzes am Menschen (GM-CSF-Inhalation) bei akutem Lungenschaden (ALI)
- 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))
- Entwicklung neuer pharmakologischer Ansätze und klinische Studie (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 und -patientinnen identifiziert (AA)

- Nachweis der Reduktion negativer klinischer Ereignisse bei CTEPH bei Kombinations-therapie 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-positive NSCLC-Patienten und -Patientinnen, der mit beschleunigter Metastasierung, frühem Therapieversagen 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 und Patientinnen mit Tumoren, deren Resistenz von mTOR abhängt (LC).
- Etablierung und erfolgreicher erster Einsatz der Wach-ECMO (extrakorporale Membranoxygenierung) bei Lungenerkrankungen 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)

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**

Zu den **herausragenden translationalen Errungenschaften** zählen die weltweite Zulassung neuer, vom DZL geförderter PH-Therapien, die Entwicklung neuartiger diagnostischer und pharmakologischer Ansätze zur Bekämpfung von allergischem Asthma, COPD und akuter Lungenschädigung, große Fortschritte bei der Früherkennung und kausalen Behandlung von Mukoviszidose, die Etablierung der ECMO im Wachzustand und weiterer Lungenersatzverfahren bei Lungenerkrankungen im Endstadium sowie neuartige bildgebende Verfahren, die erstmals beim Menschen angewandt wurden. In allen Krankheitsbereichen wurden neue therapeutische Zielmoleküle identifiziert und in die präklinische Prüfung gebracht, neue Zell- und Tiermodelle etabliert und neue Patientenkohorten/Register innerhalb des DZL oder in Verbindung mit diesem eingerichtet. Seit der Gründung haben DZL-Wissenschaftler **mehr als 1.400 begutachtete Artikel in der Lungenforschung oder lungenrelevanten Grundlagenforschung in hochrangigen internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht (Impact-Faktor >10)**, haben mehr als 50 Patente angemeldet, waren an mehr als 300 klinischen Studien auf allen Ebenen (Phasen I-IV) beteiligt und kooperieren derzeit mit fast 300 internationalen kommerziellen Partnern, u.a. in Projekten der Grundlagenforschung und angewandten Forschung sowie bei der Durchführung klinischer Studien.

Die Schwerpunkte der **8 Disease Areas, der 2 Plattformen und der assoziierten wissenschaftlichen Partner** (Berlin, CAPNETZ, COSYCONET) innerhalb des DZL blieben in der dritten Förderperiode (2021-2023) unverändert, während die spezifischen Ziele innerhalb jeder DZL-Einheit entsprechend dem medizinischen Bedarf und dem wissenschaftlichen Fortschritt aktualisiert oder modifiziert wurden.

Eine wichtige Neuerung zum Zweck der gegenseitigen Befruchtung von Ideen und Fachwissen war die Einführung von Arbeitsgruppen in **krankheitsübergreifenden Forschungsbereichen (Disease-Spanning Working Groups, DSWG)**. Im Gegensatz zu den bestehenden Plattformen konzentrieren sich die DSWG nicht auf methodische/technische Aspekte, sondern befassen sich mit innovativen Ideen, die für die meisten, wenn nicht sogar für alle Krankheitsbereiche relevant sind. Es wurden flexible Mittel für DSWG-Sitzungen (zweimal jährlich) bereitgestellt, die allen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen/Ärztinnen/Ärzten aus den verschiedenen DZL-Standorten und Krankheitsbereichen offenstehen, die in dem jeweiligen Forschungsbereich tätig sind. Die DSWG-Mitglieder wählten zwei Personen als DSWG-Leitung, die sich um die Organisation und den Informationsfluss kümmerten. Für DZL 3.0 wurden drei Forschungsbereiche ausgewählt: **Lung Environment Interaction (LEI), Microbiome-Metagenome (MM) und Single-Cell Analysis (SCA)**, letzteres auf Empfehlung des Scientific Advisory Board (SAB) während der Evaluierung des Neuantrags für die dritte Förderperiode. Alle drei DSWG begannen ihren regelmäßigen Austausch während der Pandemie mit digitalen Auftakt- und Folgetreffen im Jahr 2021. Die jüngsten Berichte der DSWG an den DZL-Vorstand haben gezeigt, dass interdisziplinäre Forschungsideen und -projekte weiter ausgebaut werden können. Daher wurde beschlossen, ein spezifisches Budget für die Fortführung der DSWG in der vierten Förderperiode bereitzustellen. Das Konzept der DSWG steht in vollem Einklang mit der ursprünglichen Strategie des DZL, Forschung nicht in "separaten Krankheitssilos" zu organisieren, sondern ein vereinheitlichendes wissenschaftliches Konzept anzustreben, das allen Krankheitsbereichen zugutekommt, und unterstützt diese weiter.

Während das DZL bereits im Rahmen der zweiten Förderperiode mit mehreren anderen Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung (DZG) kooperierte, insbesondere mit dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) und dem Deutschen Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), erhielt die Initiative im Rahmen von DZL 3.0 durch die Festlegung eines Budgets für gemeinsame Aktivitäten eine echte Dynamik, die zwar sehr begrenzt ist, aber den Stellenwert, den das Bundesministerium der DZG-Kooperation beimisst, erfolgreich signalisiert. Ein Drittel der von den Mittelgebern ab 2021 gewährten jährlichen Aufstockung um 3% wird derzeit für den Ausbau der Forschungszusammenarbeit zwischen den verschiedenen DZG verwendet.

Das DZL ist seit seiner Gründung Teil mehrerer Forschungsnetzwerke mit dem Schwerpunkt Lungenerkrankungen und hat das **Instrument der Assoziierten Partnerschaften** mit verschiedenen Forschungsorganisationen zum gegenseitigen Nutzen aller Beteiligten entlang der translationalen Kette, auch unter Einbeziehung der Patientenvertretung, kontinuierlich genutzt. Die Partnerschaften sind nicht notwendigerweise finanziell abgesichert, sondern beruhen seit jeher auf der Verpflichtung, Forschungskonsortien bilateral zu öffnen und wissenschaftlichen Austausch, Sachleistungen für gemeinsame Forschungsprojekte und gemeinsame Anträge für zusätzliche Drittmittel zu ermöglichen.

Mehrere assoziierte Partner sind über die fünf DZL-Standorte: **ARCN**: PRI – Pulmonary Research Institute an der LungenClinic Grosshansdorf, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Campus Kiel & Lübeck; **BREATH**: CAPNETZ Stiftung, PROGNOSIS - The Prospective German Non-CF-Bronchiectasis Registry; **UGMLC**: COSYCONET - German COPD and SYstemic Consequences-COMorbidities NETWORK. Weitere nationale Partner sind mit dem DZL auf der Basis gegenseitiger Vereinbarungen zu übergreifenden Lungenforschungszielen assoziiert (NAKO - Nationale Gesundheitsstudie; RKI - Robert Koch-Institut). Schließlich ist mit dem **assoziierten Standort Berlin** (Charité/BIH - Berlin Institute of Health; PROGRESS - Pneumonia Research Network on Genetic Resistance and Susceptibility for the Evolution of Severe Sepsis) ein starker Partner in der Bundeshauptstadt ansässig.

Die COVID-19- und Post-COVID-19-Forschung wurde schon sehr früh im Verlauf der Pandemie zu einem Schwerpunkt der regionalen, bundesweiten und europäischen Fördereinrichtungen. Insbesondere das **Netzwerk Hochschulmedizin (NUM)** wurde im April 2020 nach Ausbruch der COVID-19-Pandemie gegründet, um einen Zusammenschluss aller 36 deutschen Universitätskliniken zu etablieren. Unmittelbar danach wurden alle DZL-Standorte zentral in diese Forschungsaktivitäten eingebunden. Ziel dieser Zusammenarbeit war es, die entstehenden, dringend notwendigen Pandemieforschungsprojekte im Kampf gegen die Pandemie zu koordinieren und die Zukunftsvorsorge zu fördern. Dazu gehört die Bündelung vorhandener Kompetenzen und Ressourcen innerhalb der verschiedenen deutschen Universitätskliniken und die Analyse diagnostischer und therapeutischer Strategien, um eine optimale Patientenbehandlung zu gewährleisten.

Das **Nationale Pandemie-Kohorten-Netzwerk (NAPKON)** stellt das zentrale Rückgrat des NUM dar, indem es eine Plattform und Infrastruktur für die Sammlung von Daten und Bioproben bereitstellt. Es wird durch eine Reihe weiterer Projekte ergänzt (z. B. mit Schwerpunkt auf Epidemiologie, Autopsie, (Epi-)Genetik, Bildgebung usw.). Die PIs und Teams des DZL sind federführend bei der Planung und Durchführung von standortübergreifenden Grundlagen- und translationalen Forschungsprojekten und klinischen Studien. Mit dieser breit angelegten Forschungsinfrastruktur hat NUM den Grundstein für weitere Pandemieforschungsprojekte gelegt, bei denen die rechtzeitige Koordinierung von Spitzentechnologie und klinischer Kompetenz von zentraler Bedeutung ist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die in den ersten drei 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 **vierte Förderperiode (2024-27)**.

– 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. Zahlreiche angemeldete Patente und Ergebnisse klinischer Studien bieten Anwendungsmöglichkeiten unserer Forschung zur Verbesserung von Prävention, Diagnostik und Therapie von Lungenerkrankungen. Einen konkreten Nutzen hatten auch Patientinnen und Patienten, die an unseren größtenteils gemeinsam mit dem Lungeninformationsdienst durchgeführten Informationsveranstaltungen – entweder an den Standorten oder während des DGP-Kongresses – teilgenommen haben.

– Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im DZL arbeiten rund 260 Wissenschaftlerinnen und 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-Forschenden 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. 550 Teilnehmerinnen und Teilnehmer, mehr als 350 Posterpräsentationen und fast 100 Teaservorträgen ist das Jahrestreffen ein erfolgreiches Forum zur Darstellung der Forschungsfortschritte und der Vernetzung. Das Jahrestreffen wechselt zwischen den Standorten und trägt 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 zuwendungsberechtigten assoziierten Mitglieder des DZL sind:

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
	Universitätsklinikum Heidelberg	UKHD
	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 bei Helmholtz Munich ansässigen **Lungeninformationsdienst (LID)** und unterstützt das Angebot allgemeinverständlich aufbereiteter Information aus Forschung und Klinik rund um Lungenerkrankungen. Die Wissenschaftler, Wissenschaftlerinnen, Ärztinnen 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.

II. Eingehende Darstellung des Vorhabens (Verwertungscode siehe Anhang 1)

- Das DKFZ hat zum Forschungsprogramm der Krankheitsbereiche COPD und Lungenkrebs beigetragen. Im Folgenden eine Zusammenfassung zu den jeweiligen Meilensteinen.

Krankheitsbereich COPD

COPD-2.3: Nutzung von Kohorten (COSYCONET) zur tiefen Phänotypisierung der Immunantwort, dem Fortschreiten des Krankheitsverlaufs und der Exazerbation

AG Plass

Chronische Lungenerkrankungen betreffen über 300 Millionen Menschen und sind weltweit eine der Hauptursachen für Todesfälle. Ein gemeinsames Merkmal sowohl von chronischen als auch von akuten Lungenerkrankungen sind Veränderungen der Integrität der Atembarriere und beeinträchtigte Regeneration der Lunge. COPD ist mit einer hohen Prävalenz mehrerer Begleiterkrankungen verbunden, zum Beispiel Lungenkrebs. Derzeit gibt es trotz der hohen wirtschaftlichen und gesundheitlichen Belastung ausgelöst durch COPD keine Heilungsmethoden. Es ist daher entscheidend Mechanismen, die die Regeneration der Lunge und übermäßige Entzündungen regulieren, zu verstehen um neue therapeutische Strategien zu definieren.

Angesichts der Bedeutung von Umweltfaktoren für die COPD haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die Krankheit mit veränderten epigenetischen Signalen assoziiert ist. Die Komplexität des Lungengewebes und die Krankheitsheterogenität erschweren ein besseres Verständnis der molekularen Veränderungen in COPD. Daher haben wir eine systematische epigenetische Charakterisierung verschiedener Zelltypen aus Mausmodellen und Patientenproben initiiert:

1. Das Projekt begann mit der Isolierung von Atemwegsmakrophagen (AM) aus einem Mausmodell der muko-obstruktiven Lungenerkrankung (Scnn1b-transgen) in Zusammenarbeit mit dem Team um Marcus A. Mall (Hey*, Paulsen*, et al, Nat. Com. 2021). Wir beobachteten eine epigenetische Umprogrammierung von AM durch das mukostatische Atemwegsumfeld, welches die regulatorischen Signalwege beeinflusste, die an der Makrophagenpolarisation und an entzündlichen Reaktionen beteiligt sind. Darüber hinaus hatten diese epigenetischen Veränderungen funktionale Konsequenzen. Daher wiesen AM von transgenen Mäusen eine reduzierte Efferocytose und Phagozytose auf und zeigten übermäßige entzündliche Reaktionen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS). Der Grund für die persistierende und hyperentzündliche Reaktion waren nicht die CFTR-Mutationen, sondern die verschleimte Mikroumgebung. Dies folgerten wir daraus, dass Scnn1b-Tg-Makrophagen aus dem Peritoneum oder AMs von Cfr^{-/-}-Mäusen ähnlich wie Wildtyp-Kontrollen reagierten. Darüber hinaus führte die ex-vivo-Stimulation von WT-AM mit Schleim zu Genexpressionsveränderungen, die denen in AM von Scnn1b-transgenen Mäusen ähnlich waren (phänotypische Konsequenzen z.B. beeinträchtigter Efferocytose und Phagozytose). Diese neuen Erkenntnisse zu den Mechanismen der AM-Interaktionen mit der Atemwegsumgebung und deren Beitrag zur epigenetischen Reprogrammierung von AMs werden die Entwicklung und Verbesserung immunomodulatorischer Therapien maßgeblich leiten.

2. Zusammen mit dem Team von Renata Jurkowska und der Thoraxklinik Heidelberg kryopräservierten wir distales Lungenparenchym von Patienten ohne COPD, mit leichter COPD (GOLD I) und mit etablierter COPD (GOLD II-IV) (Llamazares-Prada, et al, JCI Insight, 2021). Die Auswertung der Krankengeschichte, Rauchexposition und H&E-Präparate ermöglichten uns, gut abgestimmte Kohorten zur Isolierung und Profilierung von Stromal- und Epithelzellen zu erstellen.

3. Wir erstellten die ersten genomweiten DNA-Methylierungskarten für einzelne CpGs von primären menschlichen Lungenfibroblasten (HLFs) über alle COPD-Stadien hinweg und beobachteten signifikante Methylierungsveränderungen, die frühzeitig in der Krankheit auftreten, insbesondere in regulatorischen Regionen des Genoms (Schwartz*, Llamazares Prada*, et al, EMBO J, 2023). Diese Regionen enthielten Bindungsstellen für TCF21 und FOSL2/FRA2; Transkriptionsfaktoren, die Schlüsselprozesse im Zusammenhang mit COPD

regulieren. Die RNA-Sequenzierung von Fibroblasten zeigte eine Dysregulation von Genen, die an Proliferation, DNA-Reparatur und Organisation der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Die Datenintegration ermöglichte die Identifizierung von 110 potentiellen Regulatoren krankheitsspezifischer Phänotypen, die mit Fibroblastenreparaturprozessen in Verbindung stehen. Unsere Studie lieferte hochauflösende multi-omische Karten von COPD-Stadien spezifischen HLFs, und enthüllte neuartige transkriptomische und epigenetische Signaturen, die mit dem Beginn und Fortschreiten von COPD in Verbindung stehen. Damit war es uns möglich neuartige Kandidatenregulatoren zu identifizieren, die an der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen beteiligt sind, einschließlich epigenetischer Regulatoren. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potential der epigenetischen COPD-Forschung für die Entwicklung neuer Therapieansätze für Patienten.

4. In 2022 und 2023 haben wir anhand von menschlichen AT2-Zellen aus kryokonserviertem Lungenparenchym von Ex-Rauchern mit und ohne COPD die Hypothese geprüft, dass alveoläre Typ-2 (AT2)-Zellen als alveoläre epitheliale Vorläufer molekulare Veränderungen in sich tragen, die die alveoläre Regeneration bei COPD beeinträchtigen. Wir erstellten Transkriptom- und DNA-Methylierungskarten, die genomweite epigenetische Veränderungen in AT2-Zellen während COPD aufzeigen und die mit globalen Genexpressionsveränderungen in Zusammenhang stehen. Integrierte Datenanalysen zeigten eine starke negative Korrelation zwischen Genexpression und Promotor-Methylierung, was darauf hinweist, dass die Dysregulation von COPD-assoziierten Signalwegen in AT2-Zellen durch DNA-Methylierung reguliert wird. Der Interferon(IFN)-Signalweg, der mit dem Verlust der Promotor-DNA-Methylierung verbunden ist, war am stärksten hochreguliert. Die epigenetische Regulation des IFN-Signalwegs wurde in globalen und gezielten DNA-Demethylierungsassays in A549-Zellen validiert. Bemerkenswerterweise führte gezielte DNA-Demethylierung von IRF9 zu einer Hochregulierung des IFN-Signalwegs, die die in COPD AT2-Zellen beobachteten Effekte in den Profildaten nachahmte. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass COPD bedingte epigenetische Veränderungen in AT2-Zellen interne Regenerationsprogramme im menschlichen Lungenparenchym beeinträchtigen. (Llamazares Prada*, Schwartz*, et al, submitted).

Krankheitsbereich Lungenkrebs

LC-1.1: Rolle der zellulären Plastizität (Makrophagen, Fibrozyten, Neutrophile, CD4+ / CD8+ T-Zellen Subpopulationen, Mastzellen) und zelluläre Elemente der Tumormikroumgebung (extrazelluläre Matrix) für die Initiierung von Lungentumoren, Progression und Metastasen -

AG Sotillo

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) können das Wachstum von Lungenkrebs fördern, indem sie die tumorizide Immunaktivierung unterdrücken. Sie können auch in Richtung eines Anti-Tumor-Phänotyps programmiert werden, was für die Therapieentwicklung von großem Interesse ist. Die Eisenbelastung von TAMs kann eine solche Umprogrammierung bewirken und korreliert mit einer verbesserten Prognose bei Lungenkrebspatienten. In Zusammenarbeit mit Martina Muckenthaler (Partner UKHD) haben wir gezeigt, dass die Anwendung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIONs) auf TAMs die Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen stimuliert, die eine pro-tumorizide Aktivität ausüben. Wir zeigen außerdem, dass SPIONs die Tumormikroumgebung (TME) von Mäusen in Richtung eines zytotoxischen Profils umgestalten, indem sie CD3+CD8+ T-Zellen rekrutieren, was auf einen multifaktoriellen Nutzen der SPION-Anwendung hindeutet. In einem nächsten Schritt haben wir auch Mäusen mit Eml4-Alk-Lungenkrebs intratracheal SPIONs injiziert, entweder allein oder in Kombination mit modernsten Lungenkrebstherapien, was zu einer signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums von rezidivierenden Tumoren führte. Die Datenanalyse wurden in 2023 abgeschlossen. Unsere Ergebnisse unterstützen die Rolle von SPIONs als Nanopartikel für eine neuartige Form der adjuvanten Therapie bei Lungenkrebs. Das Manuskript wurde von dem Fachjournal ACS Nano akzeptiert (Horvat NK#, Chocarro S#, Marques O, Bauer T, Qiu R, Diaz-Jimenez A, Helm B, Chen Y, Sawall S, Sparla R, Klingmueller U, Barz M, Hentze MW, Sotillo R#, Muckenthaler MU#. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles reprogram the tumor microenvironment and reduce lung cancer regrowth after crizotinib treatment. # equal contribution, in press).

AG Klingmüller

Das Klingmüller-Team entwickelte beständig Methoden zur zuverlässigen Analyse von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) mittels Massenspektrometrie basierten quantitativen Proteomik weiter und evaluiert kontinuierlich die Optimierung. Initial wurden Gewebeprobe von 26 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) an der Thoraxklinik Heidelberg gesammelt und analysiert, wodurch wichtige Grundlagen für die Etablierung der ECM-Gewebeaufbereitung und Proteinextraktionsprozesse getestet wurden, um eine effektive Aufarbeitung und Homogenisierung der ECM sicherzustellen. Der Einsatz des Bioruptors und dessen Implementierung in den Probenpräparationsprozess spielte eine entscheidende Rolle für die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Zudem wurden die massenspektrometrischen Analyse Methoden kontinuierlich weiter optimiert (Chakraborty et al., Cell Reports, 2022). Ein weiterer wesentlicher Schritt war die Implementierung der Data Independent Akquisition (DIA) Methode, um Proteom in komplexen Gemischen hochauflösend und reproduzierbar analysieren zu können. In 2023 wurde deshalb eine erneute Analyse der ECM-Proben im DIA-Modus nach Anwendung des neu etablierten Bioruptor-basierten Protokolls durchgeführt. Dadurch konnten wir 1002 Proteine in der ECM innerhalb der Tumorgewebe und 815 Proteine der ECM im tumorfreien Gewebe identifizieren und quantifizieren. Die Ergebnisse und die Zusammensetzung des Proteoms der ECM war im Tumor- und tumorfreien Gewebe deutlich unterschiedlich, was auf strukturelle Veränderungen in der ECM des Tumorgewebes hinweist. Angesichts der Komplexität der ECM und ihrer Rolle bei der Signal Transduktion innerhalb der Zelle, Migration und Adhäsion sind jedoch weitere technische Fortschritte erforderlich. Diese stehen jetzt durch den Aufbau einer integrierten Proteomikpipeline für die effiziente Analyse von komplexen Gewebeprobe zur Verfügung und wir konnten bereits demonstrieren, dass mit unseren Entwicklung Proteomdaten von höchster Genauigkeit und mit großer Auflösung generiert werden können (Burbano de Lara et al., Molecular Systems Biology, akzeptiert). Außerdem wurde die systematische Optimierung der proteomischen Methoden, insbesondere mit Augenmerk auf die Wahl von Lysepuffern, in einem Methodenpaper zusammengefasst und zur Veröffentlichung eingereicht (Helm et al., Molecular & Cellular Proteomics, eingereicht). Mit diesen Optimierungen unserer Proteomikpipeline für herausfordernde Proben, wollen wir im Verlauf der DZL4.0 Förderphase entschlüsseln auf welche Weise ECM Veränderungen zur Lungenkrebsprogression beitragen.

AG Sültmann

Es wurden konditionierte Medien aus 3D-Fibroblasten-Kulturen produziert, und es wurde gezeigt, dass auch diese Medien eine verminderte Resistenz der Tumorzell-Sphäroide gegenüber den eingesetzten Inhibitoren vermitteln. Hierbei spielen auch Komponenten der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. In 2023 wurden aus gesunden Spendern isolierte Monozyten mittels Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) in den M1-Subtyp und durch Inkubation mit Interleukin-4 (IL-4) in den M2a-Subtyp differenziert. Hierbei zeigte sich jedoch eine ausgeprägte Heterogenität der Expression von M1- und M2-Markern auf den Zellen, was die Nutzung dieser Zellen in Kokultursystemen erschwert. In der DZL4.0 Förderperiode soll daher die Strategie geändert werden, indem der Schwerpunkt auf andere Immunzellen gelegt wird.

AG Plass

Bei Patienten sind Lungenkrebstumoren multifokal und werden von einem umprogrammierten Stroma unterstützt, das die therapeutische Reaktion beeinflusst. Darüber hinaus haben mehr als 50% der Patienten keine genomischen Veränderungen für die zielgerichtete Therapien existieren. Außerdem führen personalisierte Therapien häufig zur Entwicklung von Resistenzen. Diese Lücken in der Lungenkrebstherapie unterstreichen die dringende Notwendigkeit für ein besseres molekulares Verständnis von NSCLC. Innerhalb unserer DKFZ/DZL-Kollaboration mit den Gruppen von Ursula Klingmüller, Rocio Sotillo, Felix Hartmann und der Thoraxklinik in Heidelberg, haben wir -Omics-Profilierung mit Multi-Region Single-Cell RNA-Seq, Whole-Genome-Sequenzierung (WGS) und array-basierter DNA-Methylierung von sieben Adenokarzinom-Patienten, 4 Männern und 3 Frauen, im Jahr 2022 initiiert. Die WGS-Analyse zeigte die heterogene genetische Landschaft der 7 Adenokarzinome, hinsichtlich

onkogener Treiber, Kopienzahlvariationen (CNVs) und struktureller Variationen. KRAS-Mutationen waren bei 4 von 7 Patienten vorhanden, und 3 männliche Ex-Raucher mit einer Rauchgeschichte von ≥ 40 Packungsjahren zeigten viele strukturelle und chromosomale Kopienzahlvariationen. Darüber hinaus hatten 2 Patienten einen subklonalen Verlust des Y-Chromosoms in ihren Tumoren. scRNA-seq ermöglichte die Auflösung der zellulären Heterogenität in kryokonservierten Lungen- und Tumorproben. 50.000 Einzelzellen bestanden die Qualitätskontrollkriterien: 29.000 Immunzellen wurden insgesamt und mindestens 15.000 Zellen aus jeder Region gewonnen. Die Zusammensetzung der Immunzellen änderte sich in den räumlichen Proben, mit einer deutlichen Zunahme der B- und CD4+ T-Zellen und einer Abnahme der natürlichen Killerzellen in den Tumorregionen. Verschiedene CD8+ T-Zell-Subpopulationen zeigten Veränderungen in ihrer Häufigkeit. Die Clusterbildung bei den Epithelzellen ergab 11 wichtige Epithelzelltypen, darunter 4 Tumorzellcluster. AT2-Zellen sind signifikant vermindert, während Becher- und Tumorzellen in den Tumorregionen vermehrt auftreten.

In 2023 konnten wir ein weiteres Projekt in Zusammenarbeit mit Juliane S. Walz (DKTK) erfolgreich abschließen. Immuntherapien, die auf krebsspezifische Neoantigene abzielen, haben die Landschaft der Krebsbehandlung grundlegend verändert. Jüngste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass epigenetische Therapien die Wirksamkeit von Immuntherapien erhöhen können, indem sie die Aktivierung von endogenen retroviralen Elementen (ERV) kodierten Promotoren und die anschließende Transkriptionsinitiierung induzieren. In Zusammenarbeit mit Juliane S. Walz haben wir mittels Deep RNA Sequencing von Krebszelllinien, die mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMTi) und/oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) behandelt wurden, ein umfassendes Transkriptom erstellt und zahlreiche neue behandlungsinduzierte polyadenylierte Transkripte (TINPATs) identifiziert. Mithilfe der Immunoepitidomik validierten wir die Präsentation von 45 behandlungsinduzierten Neopeptiden (t-Neopeptide) durch menschliches Leukozytenantigen (HLA), das von TINPATs abgeleitet ist. Wir zeigen, dass diese identifizierten t-Neopeptide das Potenzial haben, eine T-Zell-Antwort auszulösen, die Krebszellen wirksam bekämpft. Außerdem haben wir das Vorhandensein von t-Neopeptiden in Proben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nach einer In-vivo-Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor Decitabin bestätigt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von ERV-abgeleiteten Neoantigenen im Zusammenhang mit epigenetischen und Immuntherapien. Diese Arbeit hat zu einer Veröffentlichung geführt (Goyal*, Bauer*, Hey* et al, Nat Comm, 2023) und wir haben die folgende Patentanmeldung eingereicht: "Neopeptide immunogene Peptide für die Krebsbehandlung und -diagnose" (EP23170469.3).

LC-1.2: Einfluss der genetischen Merkmale des Tumors (CIN; Co-Mutationen) auf die Zusammensetzung der Tumormikroumgebung (Nanostring, Massenspektrometrie, Epigenetik) in ausgewählten klinischen Kohorten auf Basis der Untersuchung von FFPE Material

AG Klingmüller

Um die Analyse von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben zu verbessern, testete und validierten wir verschiedene Protokolle. Der Fokus lag dabei auf der Gewinnung von qualitativ und quantitativ hochwertigen Messungen, was auf Grund der Heterogenität des Crosslinking im Gewebe eine große Herausforderung ist. In 2023 wurde die Probenpräparationsmethode, die derzeit für die Analyse von FFPE-Material von Lungenkrebspatienten verwendet wird, auf der Bravo Pipettier-Roboter-Plattform implementiert, um durch Automatisierung von Arbeitsschritten die Reproduzierbarkeit der Resultate zu erhöhen. Wir testen zurzeit in welchem Umfang sich die Proteomanalyse durch den Einsatz der hochauflösenden datenunabhängigen Akquisitionsmethode (DIA) in Kombination mit dem neu implementierten Probenpräparations-Workflow verbessern lässt (Burbano de Lara et al., Molecular Systems Biology, akzeptiert; Helm et al., eingereicht). Ziel ist es mit dem neuen Protokoll die Anzahl gemessener Proteine zu maximieren und zuverlässige Informationen aus den komplexen FFPE-Proben zu erhalten.

LC-1.3: Nicht-invasives Monitoring des Immunsystems (Durchflusszytometer; molekulare Analysen) und neuartige quantitative bildbasierte Biomarker für die Charakterisierung von Patientenkohorten (T, C)

AG Sültmann

Auf Basis der in DZL2.0 gewonnenen Daten wurden miRNAs für die Quantifizierung in Serumproben der longitudinalen Kohorte ALK-positiver Patienten ausgewählt. Die Experimente wurden mit Proben der Thoraxklinik Heidelberg in Q4/2021 begonnen. In analoger Weise wurde der Projektplan für die Durchflusszytometrie-basierte Analyse (Fireplex) von Zytokinen in denselben Proben für das Jahr 2022 erstellt. Ziel dieser Analysen war es, die prognostische Relevanz von miRNAs und Zytokinen im Vergleich zu SNVs und CNVs zu überprüfen und ggf. ein Multimarker-Panel zu etablieren (Dissertation Lisa Gu, eingereicht, 2023).

Prof. Christopoulos (Thoraxklinik) hat mit unserer Beteiligung eine Analyse von Zytokinen bei Immuntherapierten Patient*innen durchgeführt (Schindler et al., 2022; s. Bericht der Thoraxklinik). In Kooperation mit Prof. Christopoulos wurden außerdem sequenzbasierte Methoden zur Analyse des T-Zell-Rezeptor-Repertoires von NSCLC Patienten vorgenommen (s. Bericht ebd.). Die Genotypen konnten nicht mit klinischen (v.a. Response) Daten assoziiert werden.

Die Durchflusszytometrie-basierten Analysen von Zytokinen wurden an der ALK-Kohorte durchgeführt, die auch schon für die Liquid Biopsy Experimente (CNVs, CNVs, 5mC; s. LC-2.2) genutzt worden war. Es ergab sich ein additiver prädiktiver Wert einiger Zytokine für die Vorhersagegenauigkeit des Tumorstatus. Diese Ergebnisse wurden im Jahr 2023 publiziert (Angeles et al., Br. J Cancer, 2023). Dieses und weitere Projekte führten zur Auszeichnung von Dr. Angeles mit dem Takeda Oncology Forschungspreis 2022 (1st).

Bedingt durch die in 2022 erfolgte Einstellung des Fireplex-Systems zur Messung von Zytokinen seitens der Firma Abcam war es in 2023 nicht möglich, die geplanten Zytokinmessungen in Patientenproben durchzuführen. Es wurden (in 2023) Alternativen getestet (Bioplex), die jedoch für die Anwendung in diesen Proben nur eine geringe Sensitivität aufwiesen. In der DZL4.0 Förderperiode werden wir daher versuchen, die Proteinbestimmung in Serumproben mittels Massenspektrometrie durchzuführen.

LC-1.5: Prädiktive Signaturen und Behandlungsstrategien zur Charakterisierung dynamischer Interaktionen von Pirfenidone mit der Tumormicroumgebung um die Rolle von TGF- β , glycodelin, AXL, und p53 zusammen mit den Entwicklungsverläufen aufzuklären (B, T, C)

AG Klingmüller

Wir haben einen Proteomikansatz entwickelt, der darauf beruht Isotopen-markierte rekombinante Proteine als Referenz einzusetzen, um Proteine in komplexen Proteingemischen mittels Parallel Reaction Monitoring (PRM) zu quantifizieren. Eine entsprechende Analyse wurde für essentielle Transmembranrezeptoren, wie EGFR und MET, entwickelt, die bei der Tumorprogression eine wesentliche Rolle spielen und Zielstrukturen für therapeutischen Interventionen sind. Außerdem wurde dieser Ansatz für die absolute Quantifizierung der TGFbeta Signaltransduktionskaskade, einschließlich Typ 1 und Typ2 Rezeptoren, verwendet. In 2023 wurde weiterhin die gezielte Proteomik für die Quantifizierung von EGFR, MET und die TGFbeta Signaltransduktionskaskade in in-vitro-Experimenten mit verschiedenen Lungenkrebszelllinien und primären Gewebeproben von Adenokarzinom-Patienten genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Ansatz eine umfassende Erforschung der Rezeptordynamik und der Dynamik der Aktivierung von Signalkaskaden in verschiedenen experimentellen Setups ermöglicht. In Zusammenarbeit mit M. Schneider (Partner Thoraxklinik) entwickelten wir einen „Spike-in“-Proteinstandard für die quantitative massenspektrometrische Analyse von Glycodelin (NSCLC biomarker; Schneider et al., 2018). In 2023 wurde dieser Proteinstandard getestet, um seine Anwendbarkeit bei der absoluten Quantifizierung von Glycodelin in verschiedenen Probenotypen zu etablieren, mit dem Ziel Glycodelin in Überstandproben aus kultivierten Zellen, Blutplasma-proben und Precision-Cut Lung Slices (PCLS) quantifizieren zu können.

Des Weiteren haben wir in 2023 einen automatisierten Phospho-Anreicherungsworkflow für die Analyse von Phosphoproteomen implementiert, der lediglich kleinste Mengen an Ausgangsmaterial benötigt und in Zusammenarbeit mit der Sotillo-Gruppe getestet (Alberto Diaz-Jimenez*, Maria Ramos*, Barbara Helm, Sara Chocarro, Dario Lucas Frey, Shubham Agrawal, Kalman Somogyi, Ursula Klingmüller, Junyan Lu, Rocio Sotillo. In Revision).). Mit diesem Ansatz wird es nicht nur möglich Veränderungen in spezifischen Phosphorylierungsstellen akkurat zu erfassen und dynamische Veränderungen zu adressieren, sondern auch unser Verständnis der dynamischen Regulation der EGFR-, MET- und TGFβ-Signalkaskaden beim Lungenkrebs deutlich verbessern. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die Wiedereinreichung des Manuskripts Salopiata et al. vorgesehen. Außerdem wurde die entwickelte Proteomikpipeline erfolgreich für die Analyse der Wirkung von Langzeitbehandlungen mit Interferon alpha, was ein wesentlicher Faktor in der Tumorumgebung ist und eine wichtige Rolle bei COPD (Hiebinger et al., Cancer Cell International 2023), so dass diese Vorarbeiten einen wichtigen Beitrag leisten in DZL4.0 Mechanismen der Tumormikroumgebung weiter zu entschlüsseln.

LC-1.7: Gezielter Angriff auf den Tumor und seine Mikroumgebung mit klein-molekularischen Inhibitoren der Tyrosinkinase, Phosphodiesterase, TGFβ und Inhibitoren der DNA Methylierung (B, T)

AG Klingmüller

Die Progression eines Tumors ist durch deregulierte Proliferation und schrittweise epithelial-mesenchymale Transition (EMT) gekennzeichnet. Durch den Einsatz von globalen Proteomik-Methoden haben wir ein Panel an nicht-kleinzelligen Lungenadenokarzinom (LUAD) Zelllinien als potenzielle Modellsysteme charakterisiert. Die Cluster basierend auf Proteinen, die im Zusammenhang mit EMT stehen, zeigten, dass die Zelllinie H1650 einen überwiegend epithelialen Phänotyp aufweist, während H1975-Zellen einen intermediären Zustand und H838-Zellen ein eher mesenchymales Profil zeigen. Transforming Growth Factor Beta (TGFβ) spielt eine duale Rolle in der Krebsentwicklung: In frühen Stadien wirkt er als Tumorsuppressor mit antiproliferativen Effekten, während er in fortgeschrittenen Stadien ein Hauptauslöser von EMT ist. Bei Lungenkrebspatienten korrelieren erhöhte TGFβ-Spiegel mit einer besonders schlechten Prognose der Patienten. Daher ist es von großer Bedeutung molekulare Mechanismen der TGFβ-Wirkweise im Lungenkrebs aufzuklären. Mit der quantitativen Proteomuntersuchung und Entwicklung eines dynamischen Signaltransduktionsmodells konnten wir zeigen, dass eine Veränderung der Expression der TGFβ Rezeptoren eine Schlüsselrolle spielt. In 2023 konzentrierten sich die Arbeiten auf die Weiterentwicklung des mathematischen Modells der TGFβ-Signaltransduktion basierend auf der Analyse der Dynamik der TGFβ Signaltransduktion in ausgewählten LUAD Zelllinien und der von M. Schneider (Thoraxklinik) zur Verfügung gestellten Patientenproben. Entsprechend wurde die massenspektrometrische zielgerichtete Proteomik mittels Parallel Reaction Monitoring (PRM) und globale proteomische (DDA und DIA) Ansätze weiterentwickelt, so dass es jetzt möglich ist alle wesentlichen Signalwegskomponenten sehr akkurat in Lungenkrebszelllinien und Patientengewebe zu messen. Die Analyse bestätigte Unterschiede in der Expression von TGFβ Typ 1 (TGFB1) und Typ2 (TGFB2) Rezeptoren zwischen den ausgewählten LUAD Zelllinien. Für die Validierung der Bedeutung dieser Beobachtung stellte M. Schneider (Thoraxklinik) Lungengewebsproben von 19 Patienten aus der Biobank zur Verfügung. Für jeden Patienten wurden entsprechende Proben aus tumorfreiem Gewebe, dem Tumorrand sowie aus dem Tumorkern zur Verfügung gestellt. Mittels gezielter Proteomik wurde bestätigt, dass moderate Zunahme der TGFB1 Konzentration und eine signifikante Abnahme der TGFB2 Konzentration im Tumor zu beobachten ist, was darauf hindeutet, dass das Verhältnis der Menge beider Rezeptoren potenzielle Marker für die Klassifizierung und Stratifizierung von Lungenkrebspatienten sein könnten. In Anbetracht der Tatsache, dass TGFB2 im Tumorgewebe weniger exprimiert ist und dass eine etablierte Assoziation zwischen erhöhten TGFβ-Spiegeln bei Patienten und einer schlechten Prognose besteht, wurde eine Korrelation zwischen TGFβ Konzentrationen und der Herabregulierung von TGFB2 vermutet. Dies konnte in 2023 in In-vitro-Untersuchungen unter Verwendung der NSCLC-Zellen weiter bestätigt werden. Zusammen mit den Patientendaten deuten die Ergebnisse auf einen Zusammenhang

zwischen der Verfügbarkeit des TGF β -Liganden und der Herabregulierung von TGFBR2 hin und unterstützen die Hypothese, dass niedrigere TGFBR2 Konzentration für die Krebszellen in einem bestimmten Stadium der EMT vorteilhaft sind. Für die Untersuchung der Verknüpfung mit der zellulären Antwort wurden phänotypische Assays für Zellinvasion und Zellproliferation etabliert. In 2023 wurde der Effekt einer Veränderten Expression der TGF β Rezeptoren auf das TGF β induzierte Invasionsverhalten untersucht. Eine Kombination der phänotypischen und massenspektrometrischen Ansätze wurde genutzt, um zu überprüfen, wie sich die Manipulation der Rezeptorkonzentration durch Überexpression oder siRNA-Knockdown auf die Aktivität des TGF β -Signalwegs auswirkt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Manipulation der Rezeptorexpression die Signalwegaktivierung, die Expression von Zielgenen sowie die phänotypische Antwort beeinflusst, was die entscheidende Rolle der Rezeptoren bestätigt. Darüber hinaus konnten diese Beobachtungen in einer separaten Patientenkohorte bestätigt werden. Derzeit wird an der Finalisierung eines Manuskripts gearbeitet, das wesentliche Aspekte der Rolle von TGF β bei der Entwicklung von Lungenkrebs entschlüsselt.

Des Weiteren wurde in Zusammenarbeit mit den Gruppen von Martina Muckenthaler und Rocio Sotillo die Anwendung von super-paramagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIONs) als vielversprechende adjuvante Therapie zur Reduktion von Tumorwachstum im Lungenkrebs untersucht. Hierfür wurden SPIONs genutzt, um Makrophagen mit Eisen zu beladen und diese Makrophagen trugen dann wiederum zur Reduzierung des Tumorzellwachstums bei durch die Erzeugung von oxidativem Stress. Wir konnten durch Proteomuntersuchungen dazu beitragen, festzustellen, dass die SPION-Behandlung zu einer entscheidenden Umstrukturierung der Tumormikroumgebung führte, welche weniger attraktiv für Tumorwachstum ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SPIONs den Effekt einer Crizotinib-Behandlung zur Verlangsamung des Tumorwachstums additiv verstärken können (Horvat*, Chocarro*, Marques O, Bauer T, Qiu R, Diaz-Jimenez A, Helm B, Chen Y, Sawall S, Sparla R, Klingmueller U, Barz M, Hentze MW, Sotillo R*, Muckenthaler MU* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles reprogram the tumor microenvironment and reduce lung cancer regrowth after crizotinib treatment. equal contribution*, akzeptiert in ASC Nano).

LC-2.1: Auf FFPE-Gewebe basierte breite molekulare Profilerstellung verschiedener NSCLC Populationen (i.e. EGFR+, EGFR Exon 20, ALK+ und KRAS+) zur Herausarbeitung der Faktoren, die einen Behandlungserfolg verhindern (T, C)

AG Klingmüller

Gewebeproben von Patienten werden in der Regel als FFPE-Proben gelagert und für histologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Analyse dieser Proben mittels Massenspektrometrie ist auf Grund des Cross-Linking aber sehr herausfordernd und eine Quantifizierung von Proteinen ist bisher nur eingeschränkt möglich bzw. muss erst die Methodik optimiert werden bevor wir auf Patientenmaterial zugreifen. In 2023 wurde die datenunabhängigen-Akquisition (DIA) umfänglich getestet und es stellte sich heraus, dass diese Method, die Effizienz und Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Analyse von zukünftigen Proben aus größeren klinischen Kohorten deutlich verbessert (Burbano de Lara et al., Molecular Systems Biology 2023). Daher wird dieser Ansatz genutzt die Proteomanalyse von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben weiter zu optimieren und ist daher Bestandteil des in LC1.2 beschriebenen neuen Protokolls zur Verarbeitung von FFPE Proben. Darüber hinaus wurde in 2023 die Pipeline zur standardisierten Auswertung von massenspektrometrischen Proteomedaten MSPypeline (Hemings et al., Bioinformatics Advanced 2022) erweitert, um auch eine Analyse von DIA-Daten zu ermöglichen, was eine vielseitigere Anwendbarkeit eröffnet, und für die Analyse der FFPE-Proben wesentlich ist.

LC-2.2: Weiterentwicklung existierender Plattformen (Bildgebung; molekular; immunologisch) zur longitudinalen Nachverfolgung Treiber-abhängiger NSCLC Resistenzmechanismen (T, C)

AG Sültmann

Nach der Panel-basierten Analyse longitudinaler Plasmaproben von ALK+ NSCLC-Patienten wurde die Technologie der MeDIP-Seq (5mC, 5-Methylcytosin) auf eine Untergruppe derselben Proben (N= 80) etabliert und angewendet. Hierbei ergaben sich hohe Korrelationen zwischen den mittels MeDIP-Seq und den (in früheren Analysen) durch sWGS erhaltenen Kopienzahlveränderungen. Darüber hinaus wurde die Methode der Anreicherungs-basierten 5hmC (hydroxymethylierte Cytosine) etabliert. Die 5mC MeDIP-Seq Methode wurde darüber hinaus zur Analyse der Methylierung von ctDNA in einer Kohorte von 54 NSCLC Patienten (136 Proben) unter Immun-Checkpoint-Inhibitor (ICI) Therapie (Kooperation mit Prof. Christopoulos, Thoraxklinik) genutzt. Um den hohen Anteil von DNA aus Blutzellen in der ctDNA zu reduzieren wurde eine bioinformatische Methode zur Dekonvolution von 5mC-Stellen aus Blutzellen entwickelt und auf die Daten angewendet. In Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass dieser Algorithmus in der Lage ist, die 5mC-ctDNA anzureichern (Janke et al, Clin. Epigenet., 2022). Die Daten aus diesem Projekt stehen für zukünftige Analysen im DZL zur Verfügung.

LC-2.3: Einfluss dynamischer Interaktionen in der Tumormikroumgebung (z.B. Rolle von TGFbeta, AXL, p53, und β -catenin) auf die Pathogenese und Behandlung von Resistenzen des molekular getriebenen NSCLC (B, T, C)

AG Klingmüller

Wesentliche Komponenten der Tumormikroumgebung sind TGF β und GAS6, welches an den AXL Rezeptor bindet. Ein Zusammenspiel beider Faktoren könnte einen entscheidenden Einfluss auf Lungenkrebsbildung und -progression haben. Deshalb entwickeln wir eine gezielte Proteomikmethode mittels Parallel Reaction Monitoring (PRM), die auf dem Einsatz von isotoopenmarkierten Proteinen als „Spike-in“-Referenzen für die gezielte Quantifizierung von Proteinen in massenspektrometrischen Studien basiert. Diese Proteine, die in bekannter Konzentration dazugesetzt werden, dienen als Referenz für die absolute Quantifizierung. Dieser innovative Ansatz ermöglichte eine präzise Quantifizierung der TGF β Rezeptoren und wichtiger Komponenten des TGF β -Signalwegs sowohl in Lungenkrebszelllinien als auch in Patientenproben. In 2023 wurden diese Untersuchungen weiterausgebaut. Parallel zu den Quantifizierungen mittels Massenspektrometrie wurde die Dynamik und Dosisabhängigkeit der TGF β Signaltransduktion mittels quantitativem Immunoblotting hochauflösend in Lungenkrebszelllinien analysiert. Auf diese Weise steht jetzt ein sehr umfassender, qualitative hochwertiger Datensatz für die finale Kalibrierung des mathematischen Modells der TGF β Signaltransduktion zur Verfügung. Außerdem wurde der Effekt einer Verringerung und Steigerung der TGF β Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren adressiert. Zudem wurde ein mögliches Zusammenspiel der TGF β und GAS6/AXL Signaltransduktion Proteom-weit untersucht und erste Hinweise für ein Zusammenspiel beider Signalwege gefunden. Diese Methodik steht nun zur Quantifizierung dieser Komponenten bei Patienten zur Verfügung, was einen bedeutenden Fortschritt auf diesem Gebiet darstellt. Diese Arbeiten werden in 2024 zu einer Publikation zusammengefasst und bilden eine wichtige Grundlage, um in DZL4.0 das Zusammenspiel verschiedener Faktoren in der Tumormikroumgebung zu entschlüsseln.

AG Loges

Die AG Loges hat die TAMR MERTK und TYRO3 als neue therapeutische Zielstrukturen funktionell untersucht. Hier haben wir herausgefunden, dass MERTK ein onkogenes und gleichzeitig osteoanaboles Target repräsentiert. Wir konnten zeigen, dass unterschiedliche Tumorzellen einschließlich NSCLC den Rezeptor MERTK in den knochenaufbauenden Osteoblasten aktivieren. Dies geschieht durch Sekretierung seiner Liganden, v.a. von Protein S (PROS1) womit die Osteoblastendifferenzierung durch Aktivierung der VAV2-RHOA-ROCK Achse gehemmt wird. Durch diesen Mechanismus wird die tumor-induzierte Osteopenie, die mit großer Morbidität für die Patient:innen verbunden ist, verstärkt. Die genetische oder therapeutische Blockade von MERTK erhöht die Knochenmasse und Anzahl von Osteoblasten im Mausmodell von in den Knochen metastasierenden Tumorerkrankungen einschließlich

NSCLC (Engelmann et al., Nature Communications 2022). Der Erstautor der entsprechenden Publikation, Janik Engelmann, hat dafür den Forschungspreis der Hamburger Krebsgesellschaft 2023 erhalten.

Im Unterschied zu Tumor-Begleittherapien, die auf die Hemmung von knochenabbauenden Osteoklasten abzielen gibt es aktuell keine zugelassenen Therapien, die Knochenmasse über gesteigerte Osteoblastenaktivität aufbauen. Zusätzlich reduziert die Inhibition von MERTK die Tumorzelllast durch einen hemmenden Effekt auf die Tumorzellen. Deswegen liegt in der Blockade von MERTK insgesamt großes therapeutisches Potenzial und wir entwickeln aktuell einen funktionsblockierenden Antikörper, den wir im Hinblick auf die Verminderung von Therapieresistenz untersuchen (Kollaboration Ilse Hoffmann, DKFZ).

Zusätzlich zur Rolle in Osteoblasten haben wir in einem weiteren zusätzlichen Projekt in 2023 die Rolle von MERTK und TYRO3 in Osteoklasten untersucht. Die spezifische Lysosom-M-vermittelte Deletion von Mertk in Osteoklasten Vorläuferzellen führte zu einer erhöhten Knochenmasse bei Mäusen. In den frühen Stadien der RANKL-induzierten Osteoklastogenese fördert MERTK den amoeboiden Migrationsmodus der Progenitorzellen, indem es den RHOA-Cofilin-MLC2-Weg induziert, was zu einer erhöhten Osteoklastenbildung führt. Im Gegensatz dazu hemmt TYRO3 die RHOA-ROCK-Signalgebung in Vorläuferzellen der Osteoklasten und hemmt dadurch diese Prozesse. Darüber hinaus haben wir eine hemmende Rolle von MERTK sowie TYRO3 in der Differenzierung und Funktion von Osteoklasten aufgedeckt. Konsekutiv zeigten Mäuse mit Kathepsin K-vermittelter Deletion von Mertk und Tyro3 einen osteopenen Knochenphänotyp. Durch die Verwendung von syngenem, metastasenbedingtem Osteolysemodell identifizierten wir TYRO3 als einen knochenprotektiven Rezeptor, während eine therapeutische Zielstruktur darstellt, um die Bildung von Osteoklasten zu hemmen, da seine stimulierenden Effekte auf Vorläuferzellen von Osteoklasten die hemmenden Effekte auf reife OC überwiegen. Neben der kürzlich aufgedeckten Rolle von MERTK als Ziel für osteoanabole Therapie könnte MERTK eine Ein-Medikament-Zwei-Ziel-Behandlungsstrategie darstellen, um die Funktion von Osteoblasten zu erhöhen und die Bildung von Osteoklasten zur Bekämpfung von osteolytischen Lungenkrebsmetastasen zu reduzieren. Diese Arbeit unterstreicht die Wichtigkeit von MERTK als therapeutisches Target bei Lungenkrebskrankungen (Manuskript in Vorbereitung). In der nächsten Förderperiode werden wir einen Schwerpunkt auf die Untersuchung der Effekte von Osteoblasten und Osteoklasten auf Immunantworten gegen metastatische NSCLC Zellen im Knochen und die Rolle der TAMR-Ligandenachsen in diesem Zusammenhang untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt unserer Arbeit wird die Rolle von Blutgefäßen in der Regulation von anti-NSCLC Immunantworten darstellen

LC-2.4: Tumor Biologie und Einfluss der vielfältigen p53-Mutationen, EML4-ALK Varianten und EGFR auf die Entwicklung von Resistenzen in molekular definierten NSCLC (B, T)

AG Sotillo

Die rasche Entwicklung zielgerichteter Therapien hat die klinische Prognose für ALK-positive Patienten zwar verbessert, doch sprechen die Patienten auf ALK-Inhibitoren der zweiten und dritten Generation nur begrenzt an. Die SRC-Aktivierung ist ein Umgehungsmechanismus der EGFR-Hemmung. Seine Aktivierung wurde auch in ALK-resistenten Zellen beobachtet. Ob SRC-Inhibitoren mit ALK-Tyrosinkinase-Inhibitoren als Erstlinientherapie zusammenarbeiten können, wurde jedoch nie untersucht. Daher haben wir die Vorteile der Verwendung von SRC-Inhibitoren in Kombination mit dem ALK-Inhibitor Brigatinib sowohl in vitro als auch in vivo untersucht. Brigatinib allein oder Dasatinib (ein SRC-Kinase-Inhibitor) allein verringerten das Gesamtwachstum von Eml4-Alk-Zellen nicht in einer dosisabhängigen Weise. Durch die kombinierte Behandlung wurde jedoch die Zellproliferation stark gehemmt und die klonogene Kapazität der doppelt behandelten Zellen drastisch reduziert. Darüber hinaus zeigte die doppelte pharmakologische Hemmung eine signifikante Schrumpfung des Tumors und ein anhaltend niedriges Tumervolumen auch nach Absetzen der Medikamente. In 2023 haben wir in Zusammenarbeit mit der AG Klingmüller phosphoproteomische und globale Proteinmessungen für dieses Projekt abgeschlossen und die synergistische Wirkung der gleichzeitigen ALK- und SRC-Hemmung auf die mTOR-Achse gezeigt, was zu einer erhöhten

Empfindlichkeit von ALK-Zellen gegenüber mTOR-Hemmern führt. Unsere Ergebnisse belegen nicht nur, dass die mTOR-Achse ein zentraler Treiber der ALK-Tumorentstehung ist, sondern liefern auch eine überzeugende Begründung für den Einsatz von Kombinationstherapien bei EML4-ALK-Patienten. Das Manuskript befindet sich zurzeit in der Begutachtung durch die Fachzeitschrift Drug Resistance Update (Alberto Diaz-Jimenez†, Maria Ramost†, Barbara Helm, Sara Chocarro, Dario Lucas Frey, Shubham Agrawal, Kalman Somogyi, Ursula Klingmüller, Junyan Lu, Rocio Sotillo. Concurrent inhibition of ALK and SRC kinases disrupts the ALK tumor cell proteome.)

Wir haben auch bei Mäusen die Eml4-Alk-Variante 1 und die Variante 3 in Kombination mit dem Verlust des Tumorsuppressorgens p53 zelltypspezifisch entweder in Club- oder AT2-Zellen eingesetzt. Der Verlust von p53 beschleunigte zusammen mit Variante 1 die Tumorbildung, während dieser Effekt bei Mäusen mit der Variante 3 nicht beobachtet wurde. Vorläufige Analysen dieser Mäuse zu frühen Zeitpunkten nach der Tumorinduktion deuten darauf hin, dass mit Variante 1 modifizierte Zellen vermehrt DNA-Schäden aufweisen und die p53-abhängige Apoptose aktivieren, so dass die Eliminierung von p53 ein schnelles Tumorwachstum ermöglicht. In 2023 wurden Einzelzell-RNA-Sequenzierungsexperimente (10x Genomics) durchgeführt, die jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Zellen keine interessanten Ergebnisse erbrachten. Die Rolle der Mikroumgebung des Tumors in diesem Zusammenhang wird derzeit untersucht und in DZL4.0 fortgeführt, um festzustellen, ob der Verlust von p53 eine Auswirkung auf die Mikroumgebung von V1-Tumoren hat, nicht aber auf V3-Tumore.

EML4-ALK-Translokationen werden bei etwa 7 % der LUAD beobachtet. Bislang wurden 15 verschiedene Varianten dieser onkogenen Fusion beschrieben, die die gleiche ALK-Sequenz aufweisen, sich aber in der Fusionsstelle mit dem EML4-Gen unterscheiden. Ob EML4-ALK-Patienten eine variantenspezifische Prognose aufweisen, ist nach wie vor sehr umstritten. Retrospektive Studien deuten darauf hin, dass die ALK-Fusionsvariante das klinische Ergebnis beeinflussen kann. Studien an Patienten mit EML4-ALK-Tumoren mit V1- und V3-Variante deuten darauf hin, dass in Patienten mit V3-Variante ein Therapieversagen häufiger auftritt. Dennoch ist die vorhandene Evidenz hinsichtlich der Aggressivität der Variante begrenzt und umstritten. Wir haben die CRISPR-Cas9-Technologie eingesetzt und sie mit Tumor-Barcoding und Hochdurchsatz-Barcode-Sequenzierung kombiniert, um 7 verschiedene Eml4-ALK-Varianten in Mäusen zu induzieren.

Die ersten Tumore dieser Mäuse wurden in 2023 untersucht. Diese Arbeiten zu den Auswirkungen der einzelnen Eml4-Alk-Varianten auf das Wachstum und die Metastasierungsfähigkeit von Lungentumoren werden in der DZL4.0 Förderphase fortgesetzt.

Kürzlich haben groß angelegte Genomsequenzierungsstudien gezeigt, dass APOBEC3-Enzyme an der somatischen Mutagenese beteiligt sind und die Mutationssignaturen 2 und 13 vermitteln. Der Zeitpunkt und die Folgen der APOBEC3B-Induktion während der Krebsentwicklung sind jedoch derzeit unklar. Wir haben daraufhin ein transgenes Mausmodell entwickelt, in dem Apobec3B (KH2-TetO-A3B,LSL-CAGs-rtTA-mKate) nach Verabreichung von Doxycyclin überexprimiert wird. Erhöhte und anhaltende Konzentrationen von APOBEC3B führten bei den Mäusen zu einer raschen Veränderung der zellulären Fitness, zu schwerwiegenden Funktionsstörungen von Organen und schließlich zur Sterblichkeit. Wichtig ist, dass die RNA-Sequenzierung von Mäusegeweben, die hohe APOBEC3B-Konzentrationen aufweisen, häufige UCC-zu-UUC-RNA-Editing-Ereignisse zeigt, die in der entsprechenden genomischen DNA nicht erkennbar sind. Diese Arbeiten wurden in 2023 zu einer ersten Publikation zusammengefasst. Unsere Ergebnisse zeigen zum ersten Mal eine neue, von der Deaminase abhängige Funktion von APOBEC3B beim RNA-Editing. Des Weiteren haben wir ein präklinisches Instrument entwickelt, das zum Verständnis der sich abzeichnenden Rolle von APOBEC3B als Treiber der Krebsentstehung beiträgt (de la Vega et al, 2023).

In 2023 fokussierten sich unsere Arbeiten auf die Initiierung von Lungentumoren mit Adeno-Cre bei gleichzeitiger Verabreichung von Doxycyclin in dem konditionierten Mausmodell LSL-Kras G12D/+;p53 flox/flox;A3B. Nach 20 Wochen Tumorentstehung stellten wir fest, dass A3B in Kras-gesteuerten Tumoren stark exprimiert wird und durch die Aktivität der Deaminase voll funktionsfähig ist. Obwohl die Charakterisierung der Rolle von A3B bei Krebs noch unvollständig ist, könnte unsere Fähigkeit, die A3B-Expression räumlich und zeitlich zu

regulieren, dieses Modell zu einem nützlichen Modell für die Untersuchung von Krebsentwicklung und Therapieresistenz machen. Wir haben die A3B-Mäuse auch mit Doxycyclin-induzierbaren KrasG12D-Mäusen gekreuzt und die Rolle von APOBEC3B in der Mutations- und RNA-Editing-Landschaft dieser Lungentumore charakterisiert. Des Weiteren wurde der Effekt der APOBEC3B-Expression auf die Bildung von Neoantigenen und die Mikroumgebung des Tumors untersucht. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die APOBEC3B-Aktivität während der Kras-gesteuerten Lungenadenokarzinom-Evolution als zweischneidiges Schwert wirken kann, indem sie einerseits als enzymatische Quelle der Mutagenese, der chromosomalen Instabilität und des RNA-Editierens fungiert, die den malignen Prozess und die Diversifizierung des Tumors vorantreiben, und andererseits durch die Verschlimmerung tödlicher DNA-Schäden und die Erzeugung subklonaler Neoantigene, die die Immunumgehung des Tumors begünstigen. Die Arbeiten werden voraussichtlich in 2024 zur Publikation eingereicht.

AG Klingmüller

Ein wichtiger Mechanismus, der für die Resistenz gegen EGFR Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) verantwortlich sein kann, ist der MET Rezeptor. Jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar. Wir entwickelten eine gezielte Proteomikmethode basierend auf PRM für die absolute Quantifizierung von EGFR- und MET-Rezeptoren. Hierfür wurden isotope-markierte rekombinante Proteine der Rezeptoren hergestellt und in bekannten Mengen als „Spike-in“-Standards eingesetzt. Mit dieser Methode wurden Gewebeproben von 10 Lungenkrebspatienten, die von M. Schneider (Thoraxklinik), sowohl mit als auch ohne aktivierende EGFR-Mutation, untersucht und die Menge an EGFR und MET Rezeptor quantifiziert. In 2023 wurden von L. Klotz und M. Schneider (Thoraxklinik) Tumorproben von 10 Lungenkrebspatienten zur Verfügung gestellt, die über einen kurzen oder längeren Zeitraum auf die Therapie mit EGFR Tyrosin Kinase Inhibitoren (TKI) ansprachen. Die massenspektrometrische Analyse der Patientenproben wurde abgeschlossen und zeigte deutliche Unterschiede in der Menge beider Rezeptoren. Die Dynamik der EGFR und MET Rezeptor Signaltransduktion wurde mittels quantitativem Immunoblotting in LUAD-Zelllinien untersucht und Hinweise erhalten, dass eine Stimulation des EGFR die MET-Rezeptor Signaltransduktion in einigen Zelllinien beeinflussen kann. In Zeitverlaufsexperimenten mit fünf verschiedenen LUAD Zelllinien wurde die Dynamik der EGFR und MET Rezeptor Signaltransduktion und das Zusammenspiel beider detaillierter untersucht. Dabei wurde die Phosphorylierungsdynamik einerseits als Goldstandard mittels quantitativem Immunoblotting untersucht und andererseits parallel mittels neu entwickelter Phosphoproteomikpipeline analysiert. Die Ergebnisse sind vielversprechend und zeigen, dass jetzt eine neue Methode zur Verfügung steht die eine globale Analyse der Veränderungen in Phosphorylierungsstellen erlaubt. Die zeitaufgelösten Daten wurden zur Weiterentwicklung eines mathematischen Modells des Zusammenspiels von EGFR und MET Rezeptor Signaltransduktion und Vorhersage von TKI Wirkung genutzt. Es zeigte sich, dass das Verhältnis der Menge beider Rezeptoren entscheidend ist, ob ein Zusammenspiel der Rezeptoren nachgewiesen werden kann oder ob beide Rezeptoren sich nicht beeinflussen und damit bestimmend für eine Resistenz gegen EGFR TKI. Weiterführende Dosis-Wirkungs-Studien mit klinisch relevanter TKIs werden durchgeführt, um eine weitere Ebene an Informationen hinzuzufügen und um besser zu verstehen, ob eine Ko-Inhibition vorteilhaft sein könnte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die finale Wiedereinreichung des Manuskripts vorgesehen (Salopiata, et al., In Revision). Diese Arbeiten legen eine wichtige Basis, um in DZL4.0 durch Ko-Inhibition von MET die Wirkung von EGFR TKIs zu steigern und mittels gezielter Proteomik Patienten zu identifizieren, die von einer Mono- oder eine Kombinationstherapie besonders profitieren könnten.

In einer Subgruppe an LUAD Patienten liegt ein EML4-ALK Fusionsprotein vor. In Zusammenarbeit mit der Sotillo Gruppe, die ein Mausmodell hierfür entwickelte, wurden Analysen des Proteoms von Tumorproben durchgeführt, um Veränderungen während der Behandlung mit ALK-Inhibitoren aufzuklären. Interessanterweise führte die Behandlung mit Brigatinib zu einer Hochregulation der SRC-Kinase, einem bekannten Onkogen. Die Ko-Inhibition von ALK und SRC zeigte signifikant gesteigerte inhibitorische Effekte sowohl im EML4-ALK Mausmodell als auch in Tumorzellen, die von ALK Fusionsprotein-positiven

Patienten stammten. Die Kombinationstherapie führte durch verschiedene Mechanismen zu einer Induktion der Apoptose wie zum Beispiel einer synergistischen Unterdrückung des mTOR-Signalwegs. Diese Kombinationstherapie könnte helfen Therapieresistenz zu überwinden, wie sie häufig bei ALK-positiven Lungenkrebspatienten beobachtet wird (Diaz-Jimenez et al. In Revision).

AG Sültmann

Die Untersuchung der Rolle von Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAF) bei der Therapieresistenz in 3D Sphäroid Modellen mittels scRNA-Seq wurde durch die biochemische Validierung von priorisierten Genen und Proteinen fortgesetzt. Das wesentliche neue Ergebnis der Kokulturanalysen war die Identifizierung der Rolle von Cholesterol- (Dissertationsschrift von Ann-Kathrin Daum) und Fettsäuremetabolismus bei der Entwicklung der TKI-Resistenz von ALK+ Tumorzelllinien. Bedingt durch die Elternzeit von Frau Daum konnte jedoch in 2022 noch keine Publikation fertiggestellt bzw. eingereicht werden. Die Arbeiten wurden im Sept. 2022 wieder aufgenommen. Zur Vervollständigung des Publikationskonzeptes wurde eine Kooperation mit einer Abteilung am DKFZ begonnen, die Expertise im Metabolismus von Krebszellen hat. In 2023 wurde nach Vervollständigung der Daten eine Publikation eingereicht und begutachtet. Sie befindet sich zum Ende der Förderphase in Revision (Daum et al., bioRxiv 2023.08.08.552439; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.08.08.552439>).

Ihre Arbeiten führten ebenfalls zur Auszeichnung von Dr. Daum mit dem Takeda Oncology Forschungspreis 2023 (2nd). Ferner war Frau Dr. Daum erfolgreich bei der Einwerbung eines in-house Stipendiums (CancerTRAX, Women in Science Track) im DKFZ, welche auch die Kooperation mit Dr. Ruth Scherz-Shouval (Weizmann Institut of Science, Israel) beinhaltet. Da das primäre Ziel der Arbeiten die Identifizierung des Beitrags verschiedener Fibroblasten-Subtypen auf die Progression von Tumorzellen ist, sind wir in einer hervorragenden Ausgangsposition für die Weiterführung des Projektes. Vorarbeiten hierfür wurden in 2023 begonnen; das Projekt selbst wird in der nächsten DZL Förderphase durchgeführt.

In 2023 starteten wir zudem die Ausweitung der von uns etablierten Protokolle auf primäre Zelllinien sowie andere molekulare Alterationen. Hierzu wurden die Kulturbedingungen für eine Reihe von Zelllinien etabliert. Schließlich wurde mit Dr. Marc Schneider (Thoraxklinik) ein Konzept zur komplementären Nutzung der von ihm etablierten Methode der „Precision Cut Lung Slices“ (PLCS) ausgearbeitet. Diese Arbeiten werden in der DZL4.0 Förderperiode fortgeführt.

AG Loges

Wir konnten die Analyse des Ansprechens von Patienten mit seltenen EGFR Mutationen auf unterschiedliche Therapieformen abschließen (Janning et al., Annals of Oncology 2022). In Deutschland werden jedes Jahr circa 400-500 Patienten mit seltenen EGFR Mutationen erstdiagnostiziert und es gibt unterschiedliche zugelassenen EGFR Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI), die jedoch fast ausschließlich an Patienten mit typischen EGFR Mutationen getestet worden sind. Unsere analysierte Kohorte stellt die weltweit größte Kohorte von Patienten mit seltenen EGFR Mutationen dar, die mit unterschiedlichen Therapieformen einschließlich EGFR TKI, Immun- und Chemotherapien behandelt wurden. Die eingehende Analyse des Therapieansprechens hat uns erlaubt, eine neue Klassifikation der seltenen EGFR Mutationen mit Therapieempfehlungen zu erarbeiten, die wesentlich zur Therapieentscheidung beitragen können und in die Onkopedia Leitlinie eingegangen sind. Wir entwickeln aktuell durch Integration dieses klinischen Datensatzes mit zellbasierten- und in silico Methoden (dynamische molekulare Modellierung) Prädiktionsalgorithmen zur Resistenz oder Sensitivität seltener EGFR Mutationen gegenüber den zugelassenen EGFR TKI.

(<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nslcl/@@guideline/html/index.html>).

Zusätzlich haben wir aufbauend auf diesen Arbeiten in 2023 eine klinische Studie spezifisch für Patient:innen mit atypischen EGFR Mutationen konzipiert. Die Rationale für die Studie besteht darin, dass das klinische Outcome von Patient:innen mit klassischen EGFR Mutationen unter TKI Therapie deutlich besser ist als das von Patient:innen mit atypischen EGFR Mutationen. Diese Annahme wird auch von unseren funktionellen Labordaten in zellbasierten BAF3 Modellen, in die wir klassischen und atypische Mutationen kloniert haben, bestätigt, denn die

Transformationsgeschwindigkeit der klassischen Mutationen ist deutlich höher. Daraus haben wir die zentrale Hypothese abgeleitet, dass Patient:innen mit klassischen EGFR Mutationen zusätzliche Chemotherapie benötigen, um die schwächere Effektivität der EGFR TKI auszugleichen. Deswegen planen wir eine Phase 2 Studie in Patient:innen mit atypischen EGFR Mutationen, denen Osimertinib in Kombination mit Cisplatin und Pemetrexed verabreicht werden soll. Neben dem PFS als primären Endpunkt der Studie werden wir per Liquid Biopsy Resistenzmechanismen gegenüber EGFR TKI Blockade untersuchen über die bis dato nichts bekannt ist. Diese Analysen werden wir in der nächsten Förderperiode durchführen.

In einem weiteren Projekt haben wir eine neue Plattformtechnologie entwickelt, die sich zum longitudinalen Monitoring von CTCs in Patient:innen mit Treibermutationen unter zielgerichteter Therapie eignet. Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bergen enormes Potenzial zur Entschlüsselung der Tumorheterogenität und des Verständnisses der Therapieresistenz. Allerdings liefern konventionelle Detektionsmethoden, insbesondere bei NSCLC, oft niedrige CTC-Zahlen, was umfassende Analysen behindert. Wir haben deswegen diagnostische Leukapherese (DLA) angewendet, um das gesamte Blutvolumen von Patient:innen zur CTC Anreicherung zu nutzen. Dafür haben wir einen zweistufigen Ansatz basierend auf der negativen Depletion von hämatopoetischen und anderen ungewünschten Zelltypen verwendet. Es wurde anschließend eine Einzelzell-Gesamttranskriptom-Sequenzierung durchgeführt, und CTCs wurden anhand von Gensignaturen und abgeleiteten Kopienzahlvariationen identifiziert. Dieser innovative Ansatz führte zur Identifizierung von bisher unerreichten 3.363 CTC-Transkriptomen aus Leukapheresaten von 6 Patient:innen. Wir haben eine bemerkenswerte Heterogenität der CTCs entdeckt mit unterschiedlichen Phänotypen in Bezug auf epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), Stammzeleigenschaften, Immunreaktivität und Metabolismus. Mit diesen Daten haben wir den ersten Einzelzell-Gesamttranskriptom-Atlas von NSCLC-CTCs erstellt. Die Ergebnisse bestätigen nicht nur den Stellenwert der CTCs zum Monitoring von Tumorheterogenität, sondern zeigten zusätzlich auch eine CTC-spezifische Signatur, die in Zukunft für gezielte CTC-gerichtete Therapien genutzt werden kann. Dieser umfassende Ansatz stellt einen großen Fortschritt dar zur Weiterentwicklung unseres Verständnisses der Krebsdynamik dar und ebnet den Weg für maßgeschneiderte therapeutische Interventionen (Rieckmann et al., in Revision). Für diese Arbeiten hat Melanie Janning 2023 den Rita Zamarchy Förderpreis der European Liquid Biopsy Society erhalten. In der nächsten Förderperiode werden wir DLA zum longitudinalen Monitoring von Patient:innen unter Therapie einsetzen.

LC-2.7: Identifizierung der sich ändernden Resistenzmuster und TME Eigenschaften in longitudinalen Kohorten mit prä-definierten molekularen Merkmalen unter Verwendung von Blut und FFPE-Gewebe sowie der Anwendung von Machine Learning Technologien im Bereich Bildgebung (T, C)

AG Sültmann

Unsere Daten und Protokolle aus den o.g. „Liquid Biopsy“ Projekten (v.a. SNVs, CNVs) wurden im Rahmen der TLRC Kooperation den klinischen Partnern an der Universitätsklinik Heidelberg (O. von Stackelberg) zur Verfügung gestellt, die über Expertise in ML und Bildgebung verfügen und eine Integration von molekularen (Liquid Biopsy) Daten mit Bilddaten derselben Patienten durchführen. Aufgrund des Ausscheidens des Radiologen (Partner UKHD), der diese Analysen fortführen sollte, wird das Projekt erst in 2024 fortgeführt.

LC-3.2: Strategien zur Früherkennung auf Basis von Nukleinsäuren (ctDNA, epigenetic and RNA expression-based markers) (C)

AG Sültmann

Wir haben gezeigt, dass sich die von uns etablierten Technologien für die Messung von miRNAs, Zytokinen, SNVs, CNVs und epigenomischen Signaturen zur früheren Erkennung der bevorstehender Tumorprogression in ALK-mutierten Adenokarzinomen (Angeles et al, 2021, Janke et al, 2022; Angeles et al., 2023; s.o.) eignen. Daher haben wir im Jahr 2022 unsere

Projekte im Rahmen von Kooperationen im DZL (Prof. Christopoulos, Prof. Thomas; Elsayed et al., 2021; Christopoulos et al., 2021; Wiedemann et al., 2022) sowie außerhalb der DZL-Förderung (PROMISE; Prof. Jäger; s.a. LC-2.2) auf die Analyse longitudinaler Liquid Biopsy Proben in Lungenkarzinom-Patienten unter ICI Therapie erweitert. Bis Ende 2022 wurden in diesen Projekten ca. 400 Proben mit Hilfe der 5mC-MeDIP-Seq bzw. der sWGS sequenziert. Die Sequenzierungen wurden in 2023 fortgesetzt, und die Daten sind analysiert. Bedingt durch die Publikationsstrategie dieses großen Konsortialprojektes sind die Manuskripte noch in Bearbeitung.

Da sich seit 2022 die Publikationslage für die Analyse zirkulierender RNA verbesserte, entschieden wir im Jahr 2023, die Analysen an dieser (ICI) Kohorte auf die Sequenzierung von cfRNA auszuweiten. Die hierfür notwendigen Bibliotheken wurden erstellt, und die Sequenzierung der Proben wird in der DZL4.0 Förderphase durchgeführt.

Als weitere Aktivität analysierten wir im Jahr 2023 ca. 150 Proben aus der NEOMUN-Studie (M. Eichhorn, Thoraxklinik) von ICI-therapierten NSCLC-Patienten mittels sWGS. Die Daten sind analysiert und werden voraussichtlich in 2024 in die Publikation der Daten der NEOMUN-Begleitforschung einfließen.

Unabhängig von ihrer Anwendung im NSCLC hatte die Förderung unserer Aktivitäten im DZL viele positive Auswirkungen auf Drittmittelanträge der Abteilung Krebsgenomforschung für die frühe Erkennung bzw. Heterogenitätsbestimmung in anderen Tumorentitäten (Brustkrebs, kolorektales Karzinom). So wurden auf Basis unserer vom DZL geförderten Ergebnisse im Jahr 2021 zwei Projekte in BMBF-Konsortialprojekten erfolgreich eingeworben. Darüber hinaus wird die von uns etablierte MeDIP Technologie in einer Klinischen Kooperationseinheit am Standort Heidelberg für ein Kooperationsprojekt zur Früherkennung von Prostatakarzinomen genutzt.

LC-3.3: Strategien zur Früherkennung auf Basis von CT Bildgebung (Eigenschaften pulmonaler Rundherde, Fibrose, COPD) und (C)

AG Klingmüller

Die Entwicklung einer optimierten Plattform zur Analyse von Proteomdaten aus Blutplasma ist für die Identifizierung von gut zugänglichen Markern und eine Implementierung in einem klinischen Umfeld von großer Bedeutung. Ziel war es daher eine optimierte Plattform zu etablieren, die eine standardisierte Analyse großer Probenkollektive ermöglicht und eine hohe Effizienz und Genauigkeit bei der Datenverarbeitung gewährleistet. Durch systematische Analysen wurden präanalytische Variablen Lagerbedingungen, Antikoagulanzen und Hämolyse, die die Analyse beeinflussen oder stören können, identifiziert (Gegner et al. 2022) und wurden in der Pipelineentwicklung berücksichtigt. Dabei zeigte sich, dass der Hämolysegrad die massenspektrometrische Analyse erheblich beeinflusst. Daher wurden in 2023 in Zusammenarbeit mit T. Muley und M. Schneider (Thoraxklinik) Tests zur Erfassung der Qualität der Plasmaproben und Hämolysegrad durchgeführt. Um die Komplexität der Plasmaproben zu reduzieren, wurde eine Fraktionierung durchgeführt und das Blutplasma von 63 NSCLC-Patienten und 54 Kontrollpersonen mit gutartigen Lungenerkrankungen untersucht. Die vorläufige Analyse ergab Hinweise, dass das Plasmaproteom von NSCLC Patienten sich deutlich von dem von Patienten mit einer benignen Lungenerkrankung unterscheidet. Bemerkenswert war, dass insbesondere Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen NSCLC Patienten gefunden und damit erste Hinweise für geschlechtsspezifische Signaturen entdeckt wurden. Diese Arbeiten werden in 2024 in einer Publikation zusammengefasst und stellen eine wesentliche Basis dar Plasmaproteom-basierte Marker für die Früherkennung von Lungenkrebs zu etablieren.

AG Kaaks

Unsere Arbeiten beschäftigen sich mit der Optimierung eines Screening-Programms zur Früherkennung von Lungenkrebs. Auf der Basis von Daten und Serumproben aus der deutschen Lungenscreening-Studie (LUSI), konnten wir zeigen, dass ein weithin empfohlener und kommerziell erhältlicher, blutbasierter Autoantikörper-Assay (EarlyCDT-Lung") nicht die erforderliche Sensitivität für den Einsatz als Vortest vor dem Screening aufweist, und die

Lungenkrebsfrüherkennung im Vergleich zu CT-basierten Standard-Erkennungsalgorithmen allein nicht verbessert (Gonzalez-Maldonado 2021). Die geringe Sensitivität des EarlyCDT-Tests für die frühzeitige Erkennung von LC wurde durch eine Gemeinschaftsstudie in der europäischen EPIC-Kohorte bestätigt (Wu 2023). Im Gegensatz dazu bestätigten Analysen der LUSI-Daten die Nützlichkeit mehrerer multivariabler Modelle zur Vorhersage des Lungenkrebsrisikos, die auf einer Kombination von CT-basierten Merkmalen (Vorhandensein von Lungenknötchen, Emphysem) mit dem Alter und der Rauchergeschichte für die personalisierte Zuweisung der optimalen Screening-Häufigkeit basieren (González-Maldonado, 2021). Neben diesen Modell-Validierungen haben wir LUSI-Daten und Blutproben verwendet, um zu zeigen, dass unabhängig von CT-basierten Merkmalen (Emphysem, Lungenrundherden) spirometrische Messungen (COPD, PRISm) (Kaaks 2022) und Serummessungen von GDF-15 und IL-6 (Cortès-Ibañez 2023) nützliche zusätzliche Indikatoren für die Vorhersage des LC-Risikos sowie des Todesrisikos durch konkurrierende Ursachen bei Langzeitrauchern sein können. Des Weiteren wurden die LUSI-Daten dazu verwendet, um die mittlere präklinische Verweildauer (MPST) von früh nachweisbaren Tumoren (5,38 Jahre, alle histologischen Subtypen zusammen) und eine Screening-Test-Sensitivität von 81,6 % zu ermitteln. Damit konnten wir zeigen, dass ein hoher Anteil von Tumoren eine relativ lange Vorlaufzeit für die Früherkennung haben kann, was das Risiko der Überdiagnose für Personen mit einer vergleichsweise geringen verbleibenden Lebenserwartung (< 6 Jahre) erhöht. Zu den in 2023 fortgeführten Arbeiten gehört die Erweiterung des bereits etablierten PLCO2013-Lungenkrebsrisikomodells um CT-basierte Risikomerkmale (Emphysem, Konsolidierung, Anzahl und Merkmale von Lungenrundherden), für die Daten der US-amerikanischen National Lung Screening Trial (NLST), der LUSI-Studie, der italienischen (Toskana) Lungenscreening-Studie (ITALUNG, PI Mario Mascalchi) und der deutschen HANSE-Studie (PI Jens Vogel-Claussen) zur Modellentwicklung und -validierung verwendet werden. Darüber hinaus wurden in Zusammenarbeit mit der DKFZ-Abteilung Medizinische Bildverarbeitung (Tobias Norajitra, Silvia Almeida-Dias, Klaus Maier-Hein) und der DKFZ-Abteilung Radiologie (Stefan Delorme) alle in LUSI gewonnenen Original-CT-Bilder (N>10.000) aus bildgebenden Archiven abgerufen und werden derzeit für weitere explorative, KI-basierte Analysen aufbereitet und qualitätsgeprüft, um (scanbasierte) Modelle zur Optimierung der Zeitintervalle zwischen aufeinanderfolgenden Screenings, des Todesrisikos durch konkurrierende Ursachen, und zur Früherkennung maligner Rundherde weiter zu verbessern.

LC-3.4: Heterogenität, epigenetische und proteom-basierte Veränderungen in Geweben als Indikatoren für die Krebsentwicklung in Patientenkohorten mit erhöhtem Risiko zur Transition zum Lungenkrebs (z.B. IPF) (B, C)

AG Klingmüller

Wesentliche Indikatoren für einen Übergang von einer chronischen Erkrankung wie z.B. chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) zu Lungenkrebs, könnte durch eine Veränderung im Phosphoproteom diagnostiziert werden. In 2023 wurde der Phosphoenrichment-Workflow automatisiert und nutzt jetzt ein 96-Well-Platten-Format mit dem Bravo-Pipettierroboter. Diese Automatisierung verbessert nicht nur die Effizienz, sondern erleichtert auch den erforderlichen Durchsatz für Zeitverlaufexperimente, was den Ansatz praktikabel und skalierbar macht. Darüber hinaus werden für die Methode nur relativ geringen Mengen Ausgangsmaterial benötigt, so dass sie breit einsetzbar ist. Außerdem haben wir zur Entwicklung einer Softwarelösung beigetragen, die eine Analyse der komplexen zeitlich aufgelösten Daten standardisiert erlaubt (Lu*, Helm* et al, in Vorbereitung). Das Tool ist darauf ausgelegt, die Datenanalyse zu optimieren und dynamische Informationen zu visualisieren. Des Weiteren wurde gemeinsam mit H. Winter, L. Klotz und M. Schneider (Thoraxklinik) die d Analyse von Lungengewebe von COPD-Patienten initiiert, mit dem Ziel Veränderungen im Proteom/Phosphoproteom zu identifizieren, die mit der Transition zu Lungenkrebs in Verbindung stehen könnten (Diaz-Jimenez et al. In Revision). Des Weiteren wurde damit begonnen Methoden für Einzelzellproteomik und räumlich aufgelöster Proteomik zu testen. Hierfür wurden Proben von Marc Schneider (Thoraxklinik) zur Verfügung gestellt. Diese Technologie ist entscheidend, um in DZL4.0 die Heterogenität im Gewebe, die für die Transition von COPD zu Lungenkrebs eine Rolle spielen könnte, zu adressieren.

AG Plass

Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) ist weltweit die führende Ursache für krebserkrankte Todesfälle. Eine späte Diagnose und hohe inter- und intratumorale Heterogenität führen oft zu einer schlechten Prognose, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 15%. Die Initiierung und Progression von Krebs resultieren aus der Akkumulation und Interaktion genetischer Mutationen und dynamischer epigenetischer Veränderungen. Veränderte epigenetische Landschaften liefern wertvolle Einblicke für die molekulare Charakterisierung von NSCLC, da sie tumor- und zellherkunftsspezifische Signaturen enthalten. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Rocio Sotillo haben wir murine Lungen-Tumormodelle mit Eml4-Alk-Translokationen verwendet, um die Zellherkunft bei Lungenadenokarzinomen zu identifizieren. Lineage-Tracing und epigenetisches Profiling zeigten, dass sowohl Club- als auch AT2-Zellen Adenokarzinome hervorrufen können. Bei der Untersuchung von durch Club-Zellen abgeleiteten Tumoren beobachteten wir einen epigenetischen Wechsel, bei dem sie ihre Linienzugehörigkeit verloren und nach der onkogenen Transformation ein AT2-ähnlichen Phänotyp erlangten. Einzelzell-transkriptomische Analysen identifizierten zwei Entwicklungswege von Club-Zellen, die denen ähneln, die während der Lungenregeneration nachgewiesen werden können. Dies legt nahe, dass die epithelialen Zellen der Lunge ihre Plastizität und intrinsischen Regenerationsmechanismen nutzen, um Tumore zu erzeugen. Diese Studie betonte die Rolle von Club-Zellen bei der Initiierung von LUAD, identifizierte den Mechanismus der Linienuntreue von Club-Zellen, bestätigte die Existenz dieser Merkmale in menschlichen Tumoren und entdeckte Schlüsselmechanismen, die zur Heterogenität von LUAD beitragen (Chen*, Toth*, Chocarro*, et al, Nat Comm, 2022).

In einem nächsten Schritt suchten wir nach epigenetischen Veränderungen in Kohorten, die für NSCLC klinisch relevant sein könnten, und initiierten drei unabhängige Studien unter anderem mit der Gruppe von Rudolf Kaaks und der Thoraxklinik Heidelberg:

1. Wir untersuchten die am stärksten differentiell methylierten Positionen, die aus epigenomweiten Assoziationsstudien (EWAS) mit erhöhtem Lungenkrebsrisiko identifiziert wurden, einschließlich einer mutmaßlichen regulatorischen Region von NHLRC1 (Faltus et al, Int J Mol Sci, 2022). HumanMethylation450 BeadChip-Array-Analyse (450K) an 66 Lungenkrebs-Fall-Kontroll-Paaren aus der European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Heidelberg Lung Cancer EWAS (EPIC HD) Kohorte. Differenziell methylierte Positionen (DMPs), die in diesen prädiagnostischen Blutproben identifiziert wurden, wurden auf unterschiedliche DNA-Methylierung in Lungenkrebs im Vergleich zu benachbartem normalen Lungengewebe aus The Cancer Genome Atlas (TCGA) gescreent und in zwei unabhängigen Replikationssets mit MassARRAY repliziert. Die Hypomethylierung in der regulatorischen Region von NHLRC1 führte zu einer erhöhten Transkription von NHLRC1 in Lungenkrebstumoren. In funktionellen Assays zeigten wir eine gedämpfte Proliferation, verminderte Lebensfähigkeit, Migration und Invasion nach dem Ausschalten von NHLRC1 in Lungenkrebszellen. Diese Studie zeigte das große Potenzial zur Entdeckung neuer funktioneller Mechanismen in der Onkogenese basierend auf EWAS-DNA-Methylierungsdaten. NHLRC1 verspricht als neuer prognostischer Biomarker für das Überleben und die Prognose von Lungenkrebs sowie als Ziel für neuartige Behandlungsstrategien bei Lungenkrebspatienten.

2. Wir untersuchten DNA-Methylierungsveränderungen in Lungenkrebsrisikoregionen mit gezielter Bisulfit-Sequenzierung in 17 NSCLC und benachbarten normalen Gewebepaaren. Wir beobachteten Unterschiede in differentiell methylierten Regionen zwischen Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom. Unter den minimalen Regionen, die in mindestens 50% der Patienten differentiell methyliert waren, wurden 7 Kandidaten in 2 unabhängigen Kohorten repliziert (n = 27 und n = 87). 6 dieser Kandidaten wurden in funktionellen Assays als methylierungsabhängige regulatorische Elemente (Enhancers) bestätigt, was zum Verständnis der an der Initiierung und Progression von Lungenkrebs beteiligten Signalwege beitrug und neue potenzielle Ziele für die Krebsbehandlung lieferte (Laplana et al, Epigenetics, 2022).

3. Wir untersuchten entzündungsbedingte aberrante DNA-Methylierung bei Zystischer Fibrose (CF)-Zwillingen um festzustellen, inwieweit erworbene Methylierungsänderungen mit Lungenkrebs in Verbindung gebracht werden können. Eine genomweite DNA-

Methylierungsanalyse im Blut wurde durchgeführt, um die DNA-Methylome von monozygoten Zwillingen aus der European CF Twin and Sibling Study mit unterschiedlichem Krankheitsgrad zu vergleichen. Entzündungsbedingte und differentiell methylierte Positionen wurden aus einer großen Fall-Kontroll-Studie zu Lungenkrebs ausgewählt und im Blut mittels gezielter Bisulfit-Nächste-Generation-Sequenzierung untersucht. Ein entzündungsbedingter Locus im Plakophilin-3 (PKP3)-Gen wurde funktional auf Promotor- und Enhancer-Aktivität mittels Luciferase-Reporter-Assays analysiert. Wir bestätigten in einer einzigartigen Kohorte, dass monozygote Zwillinge, selbst wenn klinisch unterschiedlich, nur geringfügige Unterschiede in den globalen DNA-Methylierungsmustern und der Blutzusammensetzung aufweisen. Wir identifizierten weiterhin die am stärksten differentiell methylierten Positionen, von denen eine hohe Proportion blutzellspezifisch ist, während andere erworben sein können und somit im Zusammenhang mit Entzündungen als Risikofaktor für Lungenkrebs von Bedeutung sein können. Wir identifizierten eine Sequenz im PKP3-Gen, die im Blut von CF-Zwillingen mit schwerem Phänotyp hypermethyliert ist und in Blutkrebspatienten und Kontrollen, unabhängig von bekannten klinischen Parametern, hoch differentiell methyliert ist. Wir zeigten, dass diese Region methylierungsabhängige Promotoraktivität in Lungenepithelzellen aufweist (Schamschula et al, Epigenetics 2022).

Als nächstes haben wir uns vorgenommen, einen Human Lung Cell Methylome, Transcriptome und Proteome Atlas mit zellulärer Auflösung zu erstellen, um die translationale Lungenkrebsforschung voranzutreiben, indem wir eine Datenressource von Lungenzellen aus gesunder Lunge, NSCLC und tumoradjazenter Normalgewebe bereitstellen. Im Januar 2021 haben wir mit Renata Jurkowska's Team eine Sammlung von kryokonservierten Lungenkrebs- und benachbarten Normalgewebeproben nach einem Protokoll initiiert, das speziell für die vorgeschlagenen Profilierungsstudien entwickelt wurde, in Zusammenarbeit mit den Gruppen von Ursula Klingmüller, Rocio Sotillo, Felix Hartmann und der Thoraxklinik in Heidelberg. Mehrere repräsentative Stücke aus verschiedenen Teilen des Gewebes wurden gesammelt und in Formalin fixiert, um anschließend histologisch analysiert und räumlich charakterisiert zu werden. Insgesamt kryokonservierten wir 54 tumoradjazente normale Lungengewebe und 3 Pleuraproben sowie 45 Tumoren, darunter 18 Lungenadenokarzinome, 14 Plattenepithelkarzinome der Lunge und 6 Pleuramesotheliome.

Für die unter LC-1.1 beschriebenen sieben Adenokarzinom Patienten zeigte die in 2023 durchgeführte Analyse der multi-regionalen single-cell-transkriptomischen Daten, Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung und Genexpression über die räumlichen Proben hinweg. Wir identifizierten auch vier Tumorzellcluster in sechs von sieben Spendern, was auf eine hohe intratumorale Heterogenität hinweist. Die differentielle Expressionsanalyse zeigte die Deregulation von 23 epigenetischen Regulatoren in den 4 Tumorklustern und 144 in 13 verschiedenen Zelltypen beim Vergleich von Tumorregionen mit benachbartem distalem Lungengewebe. Interessanterweise waren einige der epigenetischen Enzyme in mehreren Zelltypen verändert, was auf eine mögliche panzelluläre epigenetische Regulation des Tumormikroumfelds (TME) hinweist (Llamazares Prada, Chen et al, Manuskript in Bearbeitung).. Darüber hinaus stellten wir fest, dass die DNA-Methylierungslandschaften der Tumoren heterogener sind als die der gepaarten distalen Normalgewebe, was die Heterogenität des Tumors und des TME widerspiegelt. Die Integration der Methylierungsdaten mit 505 Lungenadenokarzinomproben aus TCGA ermöglichte es uns, die Tumormethylome in 15 verschiedene latente Methylierungskomponenten (LMCs) zu dekonvolvieren. Zur Unterstützung der Charakterisierung der Tumore wurden die LMCs mit immunologischer Infiltration, Aneuploidie und der Belastung durch Tumor-Mutationen korreliert. Als nächstes wird dieser Multi-omic-Atlas durch proteomische Profile erweitert und durch räumliche epigenetische Analysen ergänzt. Dieser umfassende Atlas hat zum Ziel eine solide Grundlage für ein besseres molekulares Verständnis von NSCLC zu schaffen.

Schließlich haben wir in 2022 und 2023, in Zusammenarbeit mit Sonja Loges und der Thoraxklinik Heidelberg, array-basierte Methylierungsassays eingesetzt, um Lungenorganoide zu untersuchen und mit Primärtumoren zu vergleichen. In Lungenkrebs-Organoiden spiegeln die DNA-Methylierungsmuster den Tumorgehalt wider. In Organoiden mit hohem Tumorzellgehalt war die Chromosomenanzahl vergleichbar zu denen von Primärtumoren. Wir werden die Probenkohorte in der nächsten Förderperiode erweitern und die epigenetisch

charakterisierten Lungenkrebs-Organoiden verwenden, um therapeutische Ansatzpunkte bei NSCLC zu identifizieren.

LC-3.6: Identifizierung von Biomarkern in Plasma und Atemwegskondensat in Fällen von wiederauftretendem Krebs nach kurativer Entfernung und in Erkrankungen mit hohem Risiko zur Transition zum Lungenkrebs, um diese auf Effektivität für Screening-Ansätze zu prüfen (B, C)

AG Klingmüller

Biomarker, die aus Blutplasma oder Atemwegskondensaten gewonnen werden können, sind vergleichsweise einfach zugänglich und könnten daher für Screening Ansätze geeignet sein. Dabei ist von großem Interesse z.B. Lungenkrebspatienten, die ein erhöhtes Risiko haben einen Rückfall der Erkrankung zu erleiden, rechtzeitig zu identifizieren. Wie unter LC3.3 beschrieben haben wir eine Massenspektrometrie-basierte Strategie zur Untersuchung des Blutplasma-Proteoms entwickelt. In 2023 wurde begonnen diese Methode dazu zu nutzen, Plasmaproben von NSCLC Patienten zu untersuchen, bei denen eine kurative Resektion des Tumorgewebes durchgeführt wurde. Ziel ist Proteine zu identifizieren, die große signifikante Unterschiede in der Expression zwischen der Gruppe Patienten, die einen Rückfall der Erkrankung erlitten haben versus derer, bei denen dies nicht der Fall war, zeigen. Basierend auf diesem Wissen soll ein gezielter Proteomikansatz mittels PRM entwickelt werden, um die Marker Proteine zu quantifizieren damit ein gezieltes Monitoring der Patienten zu ermöglichen. Die erhaltenen Ergebnisse sollen in 2024 zu einem Manuskript zusammengefasst werden. Darüber hinaus hat die Klingmüller Gruppe in 2023 begonnen in Kontakt mit M. Polke (Thoraxklinik) und H. Golpon (MHH) aufzunehmen, um eine neue Kohorte von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (IPF) in die Analyse aufzunehmen. Dies bildet eine wichtige Basis für die Untersuchungen in DZL4.0 und ermöglicht einen Vergleich zwischen NSCLC-Patienten und denen mit IPF. Die Einbeziehung verschiedener Patientengruppen erhöht das Potenzial zur Identifizierung spezifischer Proteine oder Muster, die die Diagnose und Prognose verbessern und damit auch in der Früherkennung von Lungenkrebs eingesetzt werden könnten.

AG Sültmann

Die Technologien für die Messung von miRNAs, Zytokinen, SNVs, CNVs und epigenomischen Signaturen eignen sich grundsätzlich auch für die frühere Erkennung kleiner Tumoren in entsprechenden Lungenkrebs-Risikokohorten. Daher wurde mit verschiedenen klinischen Partnern die Verfügbarkeit geeigneter Risikokohorten (COPD, IPF, CT-basiert) erörtert. Neuere wissenschaftliche Daten zeigen jedoch, dass die Menge an zirkulierender DNA im Plasma meist zu niedrig ist, um die Anwesenheit eines Tumors mit hoher Sensitivität nachzuweisen. In verschiedenen Diskussionen mit Partnern aus dem Bereich Epidemiologie mit Zugriff auf Plasmaproben aus epidemiologischen Studien (LUSI, 4-in-the lung-run) wurde daher entschieden, diese wertvollen Proben nicht für den vorgesehenen Ansatz zu verwenden. Eine verbesserte Identifizierung von Risikogruppen wäre notwendig, um diesen Ansatz weiter zu verfolgen.

Ferner wurde in Gesprächen mit den Partnern an der Thoraxklinik deutlich, dass die Sammlung von Atemwegskondensaten nur sehr schwer zu standardisieren ist, was einerseits von Änderungen an den für die Gewinnung dieser Proben notwendigen Geräten seitens der Herstellerfirmen, andererseits auch an den bisher nicht optimierten Lagerungsbedingungen der Proben liegt. Angesichts dieser Umstände wurde diese Aktivität nicht fortgesetzt.

– **Notwendigkeit und Angemessenheit der Projektarbeiten**

Lungenerkrankungen stellen ein weltweit signifikantes Gesundheitsproblem dar. Die WHO listet vier Lungenerkrankungen unter den ersten zehn Todesursachen. Sie sind damit etwa für ein Sechstel aller Todesfälle verantwortlich. Die ERS schätzt, dass die resultierenden indirekten Kosten allein für Westeuropa mehr als 380 Milliarden Euro betragen. Diese Kosten sollen zukünftig noch steigen. Für die meisten Lungenerkrankungen gibt es jedoch lediglich

Behandlungen, die die Symptome bessern. Solche, die zur Heilung führen, fehlen oftmals. Daher ist es angemessen und notwendiger denn je, durch Forschung neue Ansätze zur Bekämpfung von Lungenerkrankungen zu entwickeln – insbesondere Optionen für Prävention, Diagnose und Therapie. Das DZL ist ein Zusammenschluss von führenden Institutionen Deutschlands, die sich der Lungenforschung widmen. Mit seiner Mission, translational zu forschen, um weitverbreitete Lungenerkrankungen zu bekämpfen, strebt das DZL an, gemeinsam neue Ansätze für Prävention, Diagnose und Therapie schwerer Lungenerkrankungen zu entwickeln. Die Gesamtschau der oben dargestellten Ergebnisse zeigt, dass das DZL hierzu einen signifikanten Beitrag geleistet hat.

- **Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen und deren Effekt auf das Vorhaben**

Literaturrecherchen erfolgten regelmäßig. Nach unserem Wissen sind keine neuen Erkenntnisse bekannt geworden, die zu einer Änderung der Zielsetzungen oder anderen Effekten veranlasst hätten.

Falls ja, bitte auflisten.

- **Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 5 der NABF**

Siehe Appendix 2.

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

- Kooperation von insgesamt **29 führenden deutschen Forschungseinrichtungen** an den fünf DZL-Standorten (ARCN, BREATH, CPC-M, TLRC, UGMLC) und durch Anbindung weiterer Institutionen, Kohorten und Register als assoziierte DZL-Partner (BIH, CAPNETZ-Stiftung, COSYCONET, NAKO, PRI, PROGNOSIS, PROGRESS, RKI, UKSH)
- Einbindung von über **270 forschenden Wissenschaftlerinnen und Ärzten** in das DZL-Netzwerk
- **18 DZL-finanzierte Professuren und Nachwuchsgruppenleitungen**; davon 33 % weiblich
- DZL-finanzierte **Beschäftigung von 528 Personen** (315 VZÄ im Jahr 2022); davon 71 % weiblich
- Mehr als **1.400 hochrangige Publikationen mit Impact Factor > 10** in wissenschaftlichen internationalen Journalen der Lungenforschung und für die Lungenforschung relevanten wissenschaftlichen Journalen der Grundlagenforschung (*peer-reviewed*) seit der Gründung des DZL
- Über **50 Patente** aus DZL-mitfinanzierten Projekten
- Beteiligung von DZL-PIs an mehr als **300 klinischen Studien** aller Phasen (I-IV)
- Kooperationen von DZL-PIs mit rund **300 internationalen Industriepartnern** in den Bereichen der Grundlagen-, Translationalen und Klinischen Forschung
- Assoziierung großer **Thorax-Kliniken** (ARCN, TLRC, CPC-M)
- Erfolgreiche **Rekrutierung von international ausgewiesenen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern** aus dem In- und Ausland
- Durchführung von **Jahrestreffen** mit bis zu 600 Lungenforscherinnen und -forschern
- **Förderung aus kompetitiven Mitteln** für frühe klinische Studien (*investigator initiated*) und zur Erstellung von Anträgen für solche Studien beim DZL und weiteren öffentlichen Förderern (BMBF, DFG)
- Erreichen der vollen **Betriebsfähigkeit des zentralen DZL Data Warehouse** als Voll-Implementierung eines zentralisierten, automatisierten, pseudonymisierten Patienten-, Biomaterial-, und Bilddaten-Registers mit einheitlichen SOPs
- Einschluss von **mehr als 40.000 Patientinnen und Patienten** mit mehr als 5 Mio. Parametern auf Grundlage von **harmonisierten Broad Informed Consents** im Bereich der Erwachsenen- und Kinder-Pneumologie
- Volle Implementierung der **DZL Academy** als erfolgreiche Superstruktur eines Ausbildungs- und Karriereentwicklungsprogramms für Doktoranden, Post-Doktoranden und Nachwuchsgruppenleitungen mit mehr als **400 angemeldeten Fellows**
- **DZL-Öffentlichkeitsarbeit** mit interner und externer Kommunikation durch **Online-Portal** (www.dzl.de) mit **über 400 News** seit Gründung), halbjährliche **Newsletter** („DZL Inside“ mit fast 700 Empfängern) und Social Media (u. a. **LinkedIn mit mehr als 1.200 Followern**)

- Bereitstellung aktueller, leicht verständlicher und unabhängiger Informationen für Patientinnen und Patienten und deren Angehörigen über den **Lungeninformationsdienst** des DZL durch Online-Portal (www.lungeninformationsdienst.de mit **etwa 160.000 eindeutigen Besucherinnen und Besuchern pro Monat**), Social Media (u. a. Facebook mit **rund 4.900 Followern**), **Patientenveranstaltungen** und Publikationen (z. B. **Fact Sheets**)
- **Vernetzung der Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung** im Bereich der übergeordneten strategischen Aufgaben (DZG Board und Forum, virtuelle DZG Geschäftsstelle), gemeinsamer wissenschaftlicher Projekte (AGs, **DZG Innovation Fund**) und Public Relations (u. a. **DZG-Magazin Synergie**, Patientenbeteiligung)

Im Bereich der **Translation** (vom Forschungsergebnis zum Patienten) wurden in der dritten Förderperiode (DZL 3.0/2021–2023) exemplarisch folgende Ergebnisse erzielt:

- ***Krankheitsbereich Asthma & Allergien:*** Identifizierung von B-Zellen als Schlüsselakteure in der Asthma-Pathogenese; Charakterisierung von Typ-2-Entzündungen nach Alter und Prüfung von Medikamenten gegen Typ-2-Entzündungen für die Behandlung von Vorschulkindern mit Asthma; Adressierung der Inflammation/IL-1-Zytokin-Achse durch zwei neuartige therapeutische Inhibitoren; Optimierung des Basophilen-Aktivierungstests als diagnostisches Werkzeug; Identifikation entzündungshemmender Mechanismen der subkutanen allergenspezifischen Immuntherapie in den Atemwegen; Identifizierung eines Serum-Neo-Epitop-Biomarkers.
- ***Krankheitsbereich Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD):*** Epidemiologische Untersuchungen zu Risikofaktoren und Interaktionen bei COPD-Multimorbidität; Identifikation des Oxysterol-Metabolismus, der Lymphotoxin-Signalkaskade, der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und der NADPH-Oxidase Organisationsfaktor 1 (NOXO1) als vielversprechende therapeutische Targets; Entwicklung und Validierung der 2D- und 3D-Phase-Resolved Functional Lung Imaging (PREFUL) für die klinische Anwendung; Nutzen-Nachweis für den Anti-IL-33-Antikörper Itepekimab für ehemalige Raucherinnen und Raucher mit COPD.
- ***Krankheitsbereich Cystische Fibrose:*** DZL-weite Portfolio-Entwicklung von Biomarkern zur Bewertung der Expression und Funktion des CFTR sowie nicht-invasiver Endpunkte zur quantitativen Bewertung der Lungenstruktur und -funktion bei CF; Identifizierung wesentlicher Elemente der Atemwegsdysbiose bei früher und fortgeschrittener CF durch die Etablierung einer umfassenden mikrobiellen Metagenomik- und Metatranskriptomik-Pipeline; Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze mit Schwerpunkt auf der zellulären Präzisionstherapie; Translationale Studien zur Aufschlüsselung der komplexen Beziehung zwischen CFTR-Dysfunktion, Schleimstau, Atemwegsentzündung und mikrobieller Infektion.
- ***Krankheitsbereich Pneumonie & Akutes Lungenversagen:*** Neuartige Konzepte zur Impfstoffentwicklung gegen bakteriell-induzierte Pneumonien; Entwicklung innovativer zellbasierter Immuntherapien mithilfe iPSC-abgeleiteter Makrophagen; Nachweis der Gewebereparatur durch bronchioalveoläre Stammzellen (BASCs) und Entwicklung komplexer bronchioalveolärer Lungenorganoide; Phänotypisierung von COVID-19 auf Einzelzellenebene und Entwicklung und Nutzung humaner *ex vivo/in vitro* (Lungenorganoide; hPCLS) und *In-vivo*-Mausmodelle: Arbeiten zur Epithel-Immunzell-Interaktion, CD136+-Lungenmakrophagen, vaskulären Angiogenese, Glykokalix-Schädigung von Endothelzellen; Klinische Studien zu inhalativem liposomalem Cyclosporin A (Phase-II), inhalativem GM-CSF (II), Trimodulin (III) und der Wirkung der Plasmapherese bei Sepsis; zahlreiche weitere Arbeiten u. a. zu COP/Fibrose und immunologischen Langzeitveränderungen nach COVID-19 sowie Biomarkern (2 Patente), Epidemiologie, Risikofaktoren, Mikrobiologie und Management der CAP.

- *Krankheitsbereich Interstitielle Lungenerkrankung:* Genexpression von BAL-Zellen als Marker für den Verlauf und die Beteiligung von Basalzellen der Atemwege bei der idiopathischen Lungenfibrose nachgewiesen; Nachweis eines Übergangszustands von Stammzellen (Krt8+) bei der Alveolaren Regeneration und dessen Persistenz bei Lungenfibrose; Nutzung der metformin-induzierten lipogenen Differenzierung in Myofibroblasten zur Umkehrung der Lungenfibrose; früher Nachweis der Broncho-Pulmonalen Dysplasie mittels neuartiger Biomarker durch proteomisches Screening; Nachweis der Progressionsabschwächung bei Patienten und Patientinnen mit progressiver fibrotischer interstitieller Lungenerkrankung durch Pirfenidon (Phase-IIa).
- *Krankheitsbereich Pulmonale Hypertonie:* Aufklärung epigenetischer Mechanismen bei pulmonaler Hypertonie und Entwicklung neuartiger Interventionsstrategien (u. a. lange nicht-kodierende RNAs); Adressierung der Dysregulation zentraler nachgeschalteter Signalmoleküle, die die Umgestaltung der pulmonalen Blutgefäße vorantreiben (u. a. CDKs, RASSF1A-HIF-Achse, NFkB, FOXO, iNOS, NOXO1, NO-cGMP-Pfad); Klinische Studien u. a. zu Sotatercept (Phase-II/III) und Seralutinib (II); Nutznachweis von inhalativem Iloprost auf Rechtsherz-Kontraktilität (Initiation zu Patent für „spray in the pocket“).
- *Krankheitsbereich Lungenerkrankungen im Endstadium:* Bedeutende Fortschritte bei der Definition der Rolle verschiedener gewebsresidenter Stamm- und Vorläuferzellen in der Lungenbiologie und -krankheit und zum Einsatz humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSC) und primärer muriner Stammzellen für zell- und organoid-basierte Therapien, biohybride Organe, bioingenieurwissenschaftliches Lungengewebe und Krankheitsmodellierung; erfolgreiche Anwendung von ECMO/ECCO2R in der Unterstützung von Patientinnen und Patienten mit schwerem COVID-19-ARDS sowie in der Vorbereitung und Durchführung von Lungentransplantationen; Erfolgreiche LTx bei Kindern und 12 Jahren; Erforschung der Auswirkungen von Hyperkapnie auf endständige Lungenerkrankungen und Nutzung von Nierenersatztherapieplattformen als effiziente Mittel zur ECCO2R; Identifizierung von Cathepsin B als Biomarker u. a. bei humaner CLAD und harmonisierter Kriterien für die Definition von CLAD; multizentrische Studien zur Sicherheit und Effektivität von Immunsuppression durch virales Monitoring bei LTx; Nachweis der protektiven Rolle von *antigen-primed* regulatorischen T-Zellen im Tiermodell und der Klinik.
- *Krankheitsbereich Lungenkrebs:* Klinische Studie zur Heterogenität und Bewältigung von Medikamentenresistenzen bei molekular definiertem Lungenkrebs (Phase II); Untersuchungen zur Vorhersage der Immuntherapieantwort bei Lungenkrebs; Untersuchung der zellulären Interaktion und Signalwege als zentrale Merkmale des Tumor-Mikroenvironments und ihres therapeutischen Nutzen; Adressierung gemeinsamer und unterschiedlicher pathogenetischer Mechanismen von Komorbiditäten und Lungenkrebs; Entwicklung und Beteiligung an Strategien der Krebsfrüherkennung durch Populationsscreenings.
- *Plattform Biobanking & Datenmanagement:* Vollständige Implementierung des DZL Data Warehouse als zentralisiertes, automatisiertes, pseudonymisiertes Register für Patienten-Forschungsdaten und -Bioproben mit einheitlichen SOPs; Bereitstellung hochwertiger Proben und Daten, Einschluss von > 40.000 Patientinnen und Patienten mit > 5 Mio. Parametern auf Grundlage von harmonisierten *Broad Informed Consents* im Bereich der Erwachsenen- und Kinder-Pneumologie, einschließlich Follow-Ups von mehr als 5.000 COVID-19-Patienten und -Patientinnen; Entwicklung eines harmonisierten Katalogs klinischer Parameter.
- *Plattform Imaging:* Wesentliche Verbesserung des Verständnisses der Atemwegsstruktur durch den Einsatz fortgeschrittener mikroskopischer Techniken, u. a. Identifikation von epithelialen Bürstenzellen in den Atemwegen und Lipofibroblasten in der humanen Lunge sowie der Visualisierung von Nanopartikelverteilungen in der gesamten Mauslunge oder des Mucus-Transports im Menschen; Etablierung von Machine Learning und AI in den Bereichen von phänotypischen Wirkstoff-Screening-Plattformen und integrierter Multi-Omics- und quantitativer Mikroskopie-Anwendungen; Einsatz von MRI als strahlungsfreie Bildgebungstechnologie bei Patienten und Patientinnen mit CF und COPD zur

Früherkennung und Verlaufskontrolle; erfolgreiche Anwendung der Niedrig-Dosis-CT zum Lungenkrebs-Screening; Nachweis von Veränderungen im bronchialen und pulmonalen Gefäßsystem bei COVID-19-Patientinnen und -Patienten.

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

Krankheitsbereich COPD

- Genomweite epigenetische Profile von murinen Atemwegsmakrophagen (AM), humanen Lungenfibroblasten (HLF) und humanen alveolären Typ-2-Zellen (AT2).
- Veröffentlichung erster genomweiter DNA-Methylierungskarten für einzelne CpGs von primären menschlichen Lungenfibroblasten (HLFs), die signifikante Methylierungsveränderungen im frühen COPD Krankheitsstadium erkennen lassen.
- Erste Hinweise, dass durch COPD verursachte epigenetische Veränderungen in AT2-Zellen interne Regenerationsprogramme im menschlichen Lungenparenchym beeinträchtigen.

Krankheitsbereich Lungenkrebs

- Etablierung eines präklinischen Instruments zur Untersuchung der Rolle von APOBEC3-Enzymen in der Tumorentwicklung und Nachweis, dass anhaltend hohe Konzentrationen von APOBEC3B bei Mäusen die zelluläre Fitness verringern, schwerwiegende Funktionsstörungen von Organen verursachen und die Sterblichkeit erhöhen (LC-2.4)
- Unsere Ergebnisse im prä-klinischen Modell unterstützen den Einsatz von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (SPIONs) in der adjuvanten Therapie bei Lungenkrebs (Zusammenarbeit mit Partner UKHD; LC-1.1).
- Identifizierung der Bedeutung des Fettsäurestoffwechsels für die nicht-genetische Therapieresistenz von NSCLC Tumorzellen (LC1-1, LC-2.4).
- Untersuchungen in Lungenkrebszelllinien deuten darauf hin, dass eine Kombinationstherapie von SRC-Inhibitoren und ALK-Tyrosinkinase-Inhibitoren durch verschiedene Mechanismen zu einer Induktion der Apoptose führen und damit die Prognose für ALK-positive Patienten verbessern könnte (LC-2.4).
- Identifizierung von Neoepitopen infolge einer Behandlung von Lungenkrebszelllinien mit epigenetisch wirkenden Medikamenten, welche die Wirksamkeit von Krebsimmuntherapien steigern könnten (LC-1.1). Diese Arbeiten haben zu einer Patentanmeldung geführt: "Neoepitope immunogene Peptide für die Krebsbehandlung und -diagnose" (EP23170469.3).
- Etablierung und Anwendung von Liquid Biopsy Technologien (SNVs, CNVs, 5mC, miRNA, Zytokine, DLA) für das Longitudinale Monitoring von Patienten mit NSCLC (LC-1.3, LC-2.2, LC-2.4, LC-3.2); Exploration der Anwendung dieser Technologien für die Früherkennung kleiner Tumoren (LC-3.6).
- Etablierung eines auf dem Methylom, Transkriptom und Proteom basierten humanen Lungenzellatlas (LC-3.4), der in der Förderperiode DZL4.0 ausgebaut wird.
- Multi-omisches und multiregionales Profiling von sieben humanen Lungenadenokarzinomproben, mit denen neue Erkenntnisse zu Regulatoren der intra-tumoralen Heterogenität gewonnen wurden (LC-1.1, LC-3.4).

- Aufbau einer optimierten Pipeline für Massenspektrometrie basierte klinische Proteomik, mit der es ermöglicht krankheitsrelevante Veränderungen im Gewebe von Lungenkrebspatienten wie z.B. die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu identifizieren und Plasma und Serummarker für die Lungenkrebsfrüherkennung zu etablieren (LC1.1, 1.5, 3.2, 3.3, 3.4, 3.6).
- Identifizierung der Rolle der Mengenverhältnisse von EGFR und MET mittels quantitativer Proteomik als entscheidend für das Ansprechen auf EGFR TKIs im Lungenkrebs. (LC2.4)
- Nachweis einer charakteristischen Veränderung des Mengenverhältnis der TGFbeta Rezeptoren im Lungenkrebs mittels gezielter quantitativer Proteomik. (LC1.5, LC1.7, LC2.3)
- Etablierung eines Transkriptom-basierten NSCLC CTC Atlas (LC 2.4) den wir in der Förderperiode DZL4.0 weiter ausbauen werden (Hinzunahme von Proteomik) Loges
- Nachweis der Nützlichkeit mehrerer multivariabler Modelle zur Vorhersage des Lungenkrebsrisikos, die auf einer Kombination von CT-basierten Merkmalen (Vorhandensein von Lungenknötchen, Emphysem) mit dem Alter und der Rauchergeschichte für die personalisierte Zuweisung der optimalen Screening-Häufigkeit basieren (LC-3.9)

Im Rahmen der DZL3.0 Förderperiode haben die DZL Wissenschaftler des DKFZ insgesamt 72 Publikationen veröffentlicht, davon 61 (85%) mit Nennung der DZL Affiliation, was aufgrund von Journal Vorschriften bzw. Begrenzung der Anzahl Affiliationen nicht immer möglich ist. Unsere zahlreichen - größtenteils im Open-Access-Verfahren veröffentlichten - Publikationen stehen der wissenschaftlichen Community zur Verfügung und bilden die Grundlage für darauf aufbauende Forschungsprojekte.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans.

- **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: EP23170469.3 (2023) "Neoepitope immunogene Peptide für die Krebsbehandlung und -diagnose" (Gleichberechtigte Erfinder: Ashish Goyal, Jens Bauer, Joschka Hey, Juliane S Walz und Christoph Plass; LC-1.1).

- **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 Netzwerke, Transferstellen etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Forschungsstellen, Netzwerken oder Institutionen u.a. einzubeziehen.

- Das Kryokonservierungsprotokoll der AG Plass sowie die epigenetische und Einzelzell-RNA-seq-Analyse haben eine fruchtbare Zusammenarbeit und sehr interessante Datensätze (noch aus einer kleinen Kohorte) mit mehreren Gruppen am DKFZ (AG Sotillo, AG Klingmüller, AG Loges) und der Thoraxklinik Heidelberg ermöglicht. Diese Zusammenarbeit wurde nun auf weitere DZL-Zentren ausgeweitet, wo Einzelzelltechnologien einsetzen werden, um verschiedene Lungenerkrankungen wie COPD, IPF und Lungenkrebs zu verstehen.

- In 2023 wurde in einem kompetitiven Verfahren vom DZL-Vorstand ein Antrag von Arbeitsgruppen der Standorte TLRC, BREATH, UGMLC und CPC-M für die harmonisierte Entwicklung von Einzelzellanalysen bei Lungenerkrankungen genehmigt.

Dies wird in DZL4.0 zu einer Vereinheitlichung der Protokolle für zelluläre Modelle führen, wovon nicht nur der wissenschaftliche Fortschritt profitiert, sondern worin auch erhebliches wirtschaftliches Potential besteht, da so im DZL gemeinsame Strategien für neue therapeutische Angriffspunkte und Interventionen entwickelt werden können. Letztendlich legen die Entwicklungen in DZL3.0 eine wichtige Basis hinzu einer personalisierten Therapie und Früherkennung von Lungenkrebs, was für den einzelnen Patienten, die Gesellschaft und die Wirtschaft von großer Bedeutung ist.

- Einbringung der neuen Klassifikation für seltene EGFR Mutationen in der zentralen Wissensplattform MURIPEDIA des nationalen Netzwerks genomische Medizin Lungenkrebs (nNGM) und in der Onkopedia Leitlinie NSCLC.
- **Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit** für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung und Verwertung der Ergebnisse
 - Die Ergebnisse der Ko-inhibition von ALK und SRC (AG Sotillo) können noch nicht in die klinische Umsetzung einfließen, aber weitere Ergebnisse in präklinischen Modellen könnten zu einer klinischen Studie für ALK-positive Patienten führen.
 - Die Arbeit im Bereich der Nanotechnologie mit der Verwendung von SPIONs (AG Muckenthaler und UKHD) in vivo hat zu einer Zusammenarbeit und dem Erhalt eines Horizon 2020 Zuschusses geführt, bei dem extrazelluläre Vesikel zur Behandlung von Lungenkrebsmodellen verwendet werden, die von der Sotillo-Gruppe entwickelt wurden.
 - Die Ergebnisse der Arbeiten im Bereich Liquid Biopsy (AG Sültmann) können bisher noch nicht in die klinische Translation eingebracht werden, liefern aber neue Erkenntnisse zum nicht-invasiven Monitoring von Tumoren. Die Arbeiten im Themenfeld 3D Sphäroide könnten neue Erkenntnisse zur Therapieresistenz von Tumoren und ggf. neue synthetisch letale Interaktionen erbringen, sind jedoch derzeit ebenfalls noch der Forschung zuzuordnen und werden in der DZL4.0 Förderperiode fortgeführt.
 - In DZL3.0 wurden neuste Technologien der Proteomik wie z.B. hochauflösende globale Proteomik, gezielte Proteomik, Phosphoproteomik und Plasmaproteomik etabliert. Mit dieser Technologie Entwicklung wurden erste Hinweise erhalten, dass die Menge an Zelloberflächenrezeptoren wie EGFR, AXL, MET, TGFbeta Rezeptoren im Lungenkrebs verändert ist und eine entscheidende Rolle für das Therapieansprechen haben könnte. Dies ist nicht nur für den wissenschaftlichen Erfolg von Bedeutung, sondern auch wirtschaftlich von großem Interesse. Dieses Wissen soll in DZL4.0 genutzt werden, um Strategien für Kombinationsbehandlungen zu testen was für die Stratifizierung von Patienten für ein besseres Ansprechen auf die Therapie ausschlaggebend ist.
 - Einzelzell- und Spatial Omics-Technologien bieten beispiellose Auflösung auf Zellebene, jedoch mangelt es an wichtigen Informationen zum genomischen Profil. Die bisher erreichten Fortschritte der AG Plass mit Dekonvolutionsverfahren zur Analyse von Epigenomdaten aus Zellverbünden unter Verwendung von Referenzdaten und Integration von Einzelzell-Omics-Daten und Zellsignaturen, ermöglichen den Einsatz dieser Verfahren zur Analyse von größeren Patientendatensätzen in der DZL4.0 Förderperiode. In Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern am TLRC, CPC-M und BREATH streben wir an, einzigartige Datenressourcen zu nutzen, um neuartige multimodale Integrationsmethoden zu entwickeln und zu evaluieren, mit denen neue Erkenntnisse zur Prädisposition für Lungenkrebs und andere Lungenerkrankungen gewonnen werden können.
 - Konzeption einer Phase 2 Studie in Patient:innen mit atypischen EGFR Mutationen, denen Osimertinib in Kombination mit Cisplatin und Pemetrexed verabreicht werden soll (IIT FLAURARE, externes Funding eingeworben).

- Wir haben wichtige Grundlagen für die Fortführung umfassenderer Analysen von CT-Bildern durch KI-Technologien und die Integration relevanter CT-basierter Merkmale in ein gut kalibriertes Modell wie PLCO2013 geschaffen, das wir als eines der am besten kalibrierten Lungenkrebs-Risikomodelle für die deutsche Bevölkerung identifizieren konnten (Kooperation mit DZL-BREATH und der DZL-kofinanzierten HANSE Studie).

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

In 2021 wurde ein Projekt für die Immunpräzipitation von Nukleosomen mittels Antikörper gegen Histon-Modifizierungen begonnen. Ziel dieser Analysen war die molekulare Unterscheidung zwischen verschiedenen Lungenerkrankungen (COPD, SCLC, NSCLC) und gesunden Probanden auf Basis der Histonmodifikationen in ctDNA. Jedoch konnte eine spezifische Anreicherung von Fragmenten nicht erreicht werden, was auf eine nicht ausreichende Spezifität der Antikörper zurückgeführt werden konnte. Dieses Projekt wurde daher nicht fortgesetzt. Stattdessen wurden die freiwerdenden Ressourcen für die Weiterentwicklung und Anwendung der MeDIP-Seq Plattform verwendet (siehe LC-2.2)

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

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde im Allgemeinen eingehalten (vgl. Meilenstein- und Verwertungsplan im Anhang). Innerhalb des Berichtszeitraums gab es wissenschaftlich begründete Mittelverschiebungen, die durch entsprechende Umwidmungsanträge vorab durch das Fördermittelmanagement am HelmholtzZentrum München bewilligt wurden.

Heidelberg den, 25.03.2024

Prof. Ursula Klingmüller (Projektleiterin)

Anlage

- Appendix 1 Meilensteintabellen mit Verwertungskodierung
Appendix 2 Publikationsverzeichnis

Appendix Meilensteintabellen mit Verwertungskodierung

Meilensteinplanung COPD

basic (B), translational (T), clinical (C); Cross Area Activity: Microbiome-Metagenome/Single Cell Analysis/Lung Environment Interaction

	2021	2022	2023	VK
COPD-1 Transition from lung health to COPD: Combining population-based and clinical cohorts including cohort-associated basic research and health economics (T, C) (funding: all DZL sites)				
COPD-1.1: Overarching assessments to study disease trajectories, driving mechanisms and predictors for transition from respiratory health to COPD and its progression in population-based (KORA, HCHS, NAKO) and clinical cohorts (COSYCONET-1 & -2) and data analysis. ARCN (Goldmann, Rabe, Watz, Waschki), BREATH (Kuhlmann[Budget für LC]), CPC-M (Leidl, Schwarzkopf), TLRC (Kauczor, Trinkmann), UGMLC (Vogelmeier)				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
COPD-2 To elucidate the molecular mechanisms and biomarkers of preventing, treating and curing COPD (B,T) (funding: all DZL sites)				
COPD-2.1: Early life origins and subsequent risk factors, the identification of and validation to provide novel functional and mechanistic targets as well as study of the relationship between disease progression/severity with the lung microbiome Microbiome-Metagenome ARCN (Fehrenbach, Goldmann, Krauss-Etschmann, Watz), BREATH (Janciauskiene, Ringshausen), CPC-M (Hilgendorff, Meiners, Yildirim), TLRC (Boutin), UGMLC (Ahlbrecht, Morty, Schmeck, Weissmann)				
COPD-2.2: Identify and functionally characterize age-related defective cell function, tissue repair capacity and epigenetic programming ARCN (Roeder, Fehrenbach), CPC-M (Meiners, Yildirim), UGMLC (Schmeck, Weissmann)				
COPD-2.3: Utilizing cohorts (COSYCONET) for deep phenotyping of the immune response, disease progression and exacerbation BREATH (Hohlfeld, Holz), CPC-M (Königshoff, Meiners), TLRC (Paulsen, Plass), UGMLC (Kenn, Koczulla, Schmeck, Vogelmeier) – Verwertung: 1				
TLRC – DKFZ: Plass	€	€	€	1
COPD-2.4: Innovative experimental (<i>Drosophila</i>) model system will be utilized as compound and genetic ARCN (Krauss-Etschmann, Roeder), CPC-M (Meiners, Yildirim)				

COPD-3 Clinical trials: focus on trials with a high potential for innovation and translation (T) (funding: TLRC, CTB)				
COPD-3.1: COPD progression and adaptive immunity: targeting immunometabolism to reverse COPD Interventional treatment <i>CPC-M (Yildirim), UGMLC (Weissmann)</i>				
COPD-3.2: Interventional treatment <i>TLRC (Herth, Heußel, Trinkmann)</i>				
COPD-3.3: Proof-of-concept study on inhaled surfactant preparation (BREATH and further DZL partners) <i>BREATH (Hohlfeld)</i>				
COPD-4 Imaging biomarkers (T) (funding: BREATH, CPC-M, TLRC)				
COPD-4.1: Translation of established Imaging biomarkers for COPD <i>ARCN (NN), BREATH (Vogel-Claussen), TLRC (Biederer, Heußel, Kauczor, Wielpütz)</i>				
COPD-4.2: Novel MRI-based Imaging Biomarkers for COPD <i>BREATH (Vogel-Claussen), CPC-M, TLRC (Biederer, Heußel, Kauczor, Wielpütz)</i>				
COPD-4.3: Machine Learning and Artificial Intelligence <i>ARCN (NN), BREATH (Vogel-Claussen), CPC-M, TLRC (Biederer, Heußel, Kauczor, Wielpütz)</i>				
COPD-4.4: Novel CT-based Imaging Biomarkers for COPD <i>TLRC (Biederer, Heußel, Kauczor, Wielpütz) + others</i>				
COPD-4.5: Darkfield radiography <i>ARCN (NN), BREATH (Vogel-Claussen), CPC-M, TLRC (Biederer, Heußel, Kauczor, Wielpütz), UGMLC (NN)</i>				

Meilensteinplanung LC

basic (B), translational (T), clinical (C); Cross Area Activity: Microbiome-Metagenome/Single Cell

Analysis/Lung Environment Interaction

Milestone	2021	2022	2023	VK
LC-1 Deciphering diversity and plasticity of the microenvironment to improve immunotherapeutic strategies (B, T, C) (funding: all DZL sites)				
LC-1.1 Role of cellular plasticity (macrophages, fibrocytes, neutrophils, CD4+/ CD8+ T-cell subpopulations, mast cells) and cellular TME elements (extracellular matrix) in lung tumor initiation, progression and metastasis (B, T) – Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC- DKFZ: Klingmüller, Plass, Sotillo, Sültmann	€	€	€	1, 2
UGMLC				
LC-1.2: Impact of the tumor genetic background (CIN; Co-mutations) on the composition of TME (nanosttring, mass spectrometry, epigenetics) in well-defined clinical cohorts by dissection of FFPE material (C) Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller	€	€	€	1
UGMLC				
LC-1.3: Noninvasive immunomonitoring (flow cytometry; molecular analysis) and novel quantitative imaging biomarkers for cohort-based deciphering (T, C) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Sültmann	€	€	€	1
UGMLC				
LC-1.4: Metabolic control of lung cancer metastasis growth in microenvironment by the use of complex model systems and focus on promising targets (IL22, alpha Ketoglutarate) (B, T)				
ARCN				
TLRC				
UGMLC				
LC-1.5: Predictive signatures and treatment strategies to characterize dynamic interactions of pirfenidone with TME to unravel the role of TGF- β , glycodeilin, AXL, and p53 along with developmental pathways (B, T, C) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC-DKFZ: Klingmüller	€	€	€	1
UGMLC				
LC-1.6: Efficacy of re-education/re-programming of TAMs, fibrocytes and CD4+/ CD8+ T cells subpopulations to treat lung cancer (B, T, C)				
ARCN				
TLRC				

UGMLC				
LC-1.7: Targeting of tumor and its microenvironment with small molecule inhibitors of tyrosine kinase, phosphodiesterase, TGFβ and DNA methylation inhibitors (B, T) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller	€	€	€	1
UGMLC				
LC-1.8: Novel Platforms of Multiplexed Immunofluorescence for molecular and immune profiling in lung cancer (C)				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
LC-1.9: In-depth phenotyping of mesothelioma as a model disease to explore and characterize mechanisms of immune suppression in the tumor microenvironment (T, C)				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
LC-1.10: Prospective ICI- cohorts for interrogation of responders vs. non-responders based on deep phenotyping, imaging and biomaterial collection (epigenome, genetics, transcriptomics) (T, C)				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ:				
UGMLC				
LC-1.11: In depth analyses of biomaterials according to pre-defined immuno oncology intervention and treatment settings (C)				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
LC-2 Dissecting treatment resistance in molecular driver-dependent NSCLC (funding: all DZL sites)				
LC-2.1: FFPE tissue based broad molecular profiling of different driver dependent NSCLC populations (i.e. EGFR+, EGFR Exon 20, ALK+ and KRAS+) to identify factors critical for treatment failure (T, C) - - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller	€	€	€	1
UGMLC				
LC-2.2: Advancement of existing platforms (imaging; molecular; immunologic) for longitudinal tracking of resistance mechanisms in molecular driver-dependent NSCLC (T, C) - - Verwertung: 1				
ARCN				

BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Sültmann	€	€	€	1
UGMLC				
LC-2.3: Impact of dynamic interactions in the tumor microenvironment (e.g. Role of TGFbeta, AXL, p53, and β -catenin signaling) in the pathogenesis of treatment resistance and molecularly driven NSCLC (B, T, C) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller, Loges (ab 2022)	€	€	€	1,3
UGMLC				
LC-2.4: Tumor biology and impact of p53 variety, EML4-ALK variants and EGFR on driving resistance in molecularly defined NSCLC (B, T) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller, Loges (ab 2022), Sotillo, Sültmann	€	€	€	1, 5
UGMLC				
LC-2.5: Role of integrin-signaling driven phenotypic transformation (EGFR-NSCLC into SCLC) for developing resistance (B, T)				
ARCN				
TLRC				
UGMLC				
LC-2.6: Overcoming drug resistance in driver dependent lung cancer by phosphodiesterase 5/10 and metabolic inhibitors (B, T)				
ARCN				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
LC-2.7: Changing resistance patterns and TME properties longitudinally in cohorts with predefined molecular features using blood- and FFPE tissue-based assessments and imaging machine learning technologies (T, C) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Sültmann	€	€	€	0
UGMLC				
LC-3 Early detection of lung tumors and recurrences (funding: all DZL sites)				
LC-3.1: Exploration of epigenetic and microbiome patterns and machine learning imaging exploration strategies, utilizing the EMOLung cohort, to decipher interrelations preventing or facilitating relapse (C)				
ARCN				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
LC-3.2: Early detection strategies and Nucleic acids (ctDNA, epigenetic and RNA expression-based markers) (C) - Verwertung: 1				
ARCN				

BREATH				
CPC-M				
TLRC- DKFZ: Sültmann	€	€	€	1
UGMLC				
LC-3.3: Early detection strategies and CT Imaging (pulmonary nodule characteristics, fibrosis, COPD) (C) – Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller, Kaaks	€	€	€	1
UGMLC				
LC-3.4: Heterogeneity, epigenetic and proteomic alterations in the tissue from patient populations with defined transition risk to lung cancer (e.g. IPF) as indicators for lung cancer development (B, C) – Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller, Plass	€	€	€	1
UGMLC				
LC-3.5: Epigenomic editing of tumor-related genes (Epigening) and exploration of methylation patterns along with genetic alterations (ONT-sequencing) in defined cohorts picking candidate loci impacting on outcome with consecutive functional evaluation (B, C)				
ARCN				
CPC-M				
TLRC				
UGMLC				
LC-3.6: Biomarkers in plasma and breath exhalates indicating relapse in lung cancer with curative resection and in comorbid conditions with lung cancer transition risk to elucidate suitability for screening approaches (B, C) - Verwertung: 1				
ARCN				
BREATH				
CPC-M				
TLRC – DKFZ: Klingmüller, Sültmann	€	€	€	0
UGMLC				

Appendix 2: Publikationen 2021-2023 (in alphabetischer Reihenfolge)

1. Adlung L, Stapor P, Tonsing C, Schmiester L, Schwarzmuller LE, Postawa L, Wang D, Timmer J, Klingmuller U, Hasenauer J, Schilling M. Cell-to-cell variability in JAK2/STAT5 pathway components and cytoplasmic volumes defines survival threshold in erythroid progenitor cells. *Cell Rep* 2021; 36: 109507.
2. Alikhanyan K, Chen Y, Somogyi K, Kraut S, Sotillo R. Mad2 Induced Aneuploidy Contributes to Eml4-Alk Driven Lung Cancer by Generating an Immunosuppressive Environment. *Cancers (Basel)* 2021; 13.
3. Alonso de la Vega A, Temiz NA, Tasakis R, Somogyi K, Salgueiro L, Zimmer E, Ramos M, Diaz-Jimenez A, Chocarro S, Fernandez-Vaquero M, Stefanovska B, Reuveni E, Ben-David U, Stenzinger A, Poth T, Heikenwalder M, Papavasiliou N, Harris RS, Sotillo R. Acute expression of human APOBEC3B in mice results in RNA editing and lethality. *Genome Biol* 2023; 24: 267.
4. Angeles AK, Christopoulos P, Yuan Z, Bauer S, Janke F, Ogradnik SJ, Reck M, Schlesner M, Meister M, Schneider MA, Dietz S, Stenzinger A, Thomas M, Sultmann H. Early identification of disease progression in ALK-rearranged lung cancer using circulating tumor DNA analysis. *NPJ Precis Oncol* 2021; 5: 100.
5. Angeles AK, Janke F, Bauer S, Christopoulos P, Riediger AL, Sultmann H. Liquid Biopsies beyond Mutation Calling: Genomic and Epigenomic Features of Cell-Free DNA in Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13.
6. Angeles AK, Janke F, Daum AK, Reck M, Schneider MA, Thomas M, Christopoulos P, Sultmann H. Integrated circulating tumour DNA and cytokine analysis for therapy monitoring of ALK-rearranged lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2023.
7. Aredo JV, Luo SJ, Gardner RM, Sanyal N, Choi E, Hickey TP, Riley TL, Huang WY, Kurian AW, Leung AN, Wilkens LR, Robbins HA, Riboli E, Kaaks R, Tjonneland A, Vermeulen RCH, Panico S, Le Marchand L, Amos CI, Hung RJ, Freedman ND, Johansson M, Cheng I, Wakelee HA, Han SS. Tobacco Smoking and Risk of Second Primary Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2021; 16: 968-979.
8. Bauer TA, Horvat NK, Marques O, Chocarro S, Mertens C, Colucci S, Schmitt S, Carrella LM, Morsbach S, Koynov K, Fenaroli F, Blumler P, Jung M, Sotillo R, Hentze MW, Muckenthaler MU, Barz M. Core Cross-Linked Polymeric Micelles for Specific Iron Delivery: Inducing Sterile Inflammation in Macrophages. *Adv Healthc Mater* 2021; 10: e2100385.
9. Bischoff P, Reck M, Overbeck T, Christopoulos P, Rittmeyer A, Luders H, Kollmeier J, Kulhavy J, Kemper M, Reinmuth N, Roper J, Janning M, Sommer L, Aguinarte L, Koch M, Wiesweg M, Wesseler C, Waller CF, Kauffmann-Guerrero D, Stenzinger A, Stephan-Falkenau S, Trautmann M, Lassmann S, Tiemann M, Klauschen F, Sebastian M, Griesinger F, Wolf J, Loges S, Frost N, National Network Genomic Medicine Lung Cancer collaborator g. Outcome of first-line treatment with pembrolizumab according to KRAS/TP53 mutational status for non-squamous PD-L1 high ($\geq 50\%$) NSCLC in the German National Network Genomic Medicine Lung Cancer (nNGM). *J Thorac Oncol* 2023.
10. Blum TG, Vogel-Claussen J, Andreas S, Bauer TT, Barkhausen J, Harth V, Kauczor HU, Pankow W, Welcker K, Kaaks R, Hoffmann H, Deutsche R, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und B, Deutsche Gesellschaft für T, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin: Prof. Dr. med. Wolfram Windisch PDMCTPDMTTBPDmAP, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie: Dr. med. Katrin Welcker DmLHPDmH-SHPDDmHRSdM, Vorstand der Deutschen Röntgengesellschaft: Prof. Dr. med. Konstantin Nikolaou PDMJBPDmCKDrnFADmSNP. [Statement paper on the implementation of a national organized program in Germany for the early detection of lung cancer in risk populations using low-dose CT screening including management of screening findings]. *Pneumologie* 2023.
11. Boch T, Frost N, Sommer L, Overbeck TR, Michaeli CT, Szuszi CJ, Rieckmann LM, Beumer N, Imbusch CD, Winter H, Thomas M, Roeper J, Janning M, Griesinger F, Wermke M, Loges S. Pathologic responses in oligometastatic NSCLC patients treated with neoadjuvant immune checkpoint blockade with and without chemotherapy followed by surgery. *Lung Cancer* 2022; 164: 46-51.
12. Boch T, Kohler J, Janning M, Loges S. Targeting the EGF receptor family in non-small cell lung cancer-increased complexity and future perspectives. *Cancer Biol Med* 2022; 19: 1543-1564.
13. Chen Y, Toth R, Chocarro S, Weichenhan D, Hey J, Lutsik P, Sawall S, Stathopoulos GT, Plass C, Sotillo R. Club cells employ regeneration mechanisms during lung tumorigenesis. *Nat Commun* 2022; 13: 4557.

14. Christopoulos P, Dietz S, Angeles AK, Rheinheimer S, Kazdal D, Volckmar AL, Janke F, Endris V, Meister M, Kriegsmann M, Zemojtel T, Reck M, Stenzinger A, Thomas M, Sultmann H. Earlier extracranial progression and shorter survival in ALK-rearranged lung cancer with positive liquid rebiopsies. *Transl Lung Cancer Res* 2021; 10: 2118-2131.
15. Christopoulos P, Kluck K, Kirchner M, Lüders H, Roeper J, Falkenstein-Ge RF, Szewczyk M, Sticht F, Saalfeld FC, Wesseler C, Hackanson B, Dintner S, Faehling M, Kuon J, Janning M, Kauffmann-Guerrero D, Kazdal D, Kurz S, Eichhorn F, Bozorgmehr F, Shah R, Tufman A, Wermke M, Loges S, Brueckl WM, Schulz C, Misch D, Frost N, Kollmeier J, Reck M, Griesinger F, Grohé C, Hong JL, Lin HM, Budczies J, Stenzinger A, Thomas M. The impact of TP53 co-mutations and immunologic microenvironment on outcome of lung cancer with EGFR exon 20 insertions. *Eur J Cancer* 2022; 170: 106-118.
16. Delorme S, Kaaks R. Lung Cancer Screening by Low-Dose Computed Tomography: Part 2 - Key Elements for Programmatic Implementation of Lung Cancer Screening. *Rofo* 2021; 193: 644-651.
17. Dendl K, Koerber SA, Tamburini K, Mori Y, Cardinale J, Haberkorn U, Giesel FL. Advancement and Future Perspective of FAPI PET/CT In Gynecological Malignancies. *Semin Nucl Med* 2022; 52: 628-634.
18. Durfee C, Temiz NA, Levin-Klein R, Argyris PP, Alsoe L, Carracedo S, Alonso de la Vega A, Proehl J, Holzhauer AM, Seeman ZJ, Liu X, Lin YT, Vogel RI, Sotillo R, Nilsen H, Harris RS. Human APOBEC3B promotes tumor development in vivo including signature mutations and metastases. *Cell Rep Med* 2023; 101211.
19. Elsayed M, Bozorgmehr F, Kazdal D, Volckmar AL, Sultmann H, Fischer JR, Kriegsmann M, Stenzinger A, Thomas M, Christopoulos P. Feasibility and Challenges for Sequential Treatments in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 2021; 11: 670483.
20. Engelmann J, Zarrer J, Gensch V, Riecken K, Berenbrok N, Luu TV, Beitzel-Heineke A, Vargas-Delgado ME, Pantel K, Bokemeyer C, Bhamidipati S, Darwish IS, Masuda E, Burstyn-Cohen T, Alberto EJ, Ghosh S, Rothlin C, Hesse E, Taipaleenmaki H, Ben-Batalla I, Loges S. Regulation of bone homeostasis by MERTK and TYRO3. *Nat Commun* 2022; 13: 7689.
21. Erukashvily NI, Ponomartsev NV, Ketkar A, Suezov R, Chubar AV, Prijbelski AD, Shafranskaya DD, Elmshauser S, Keber CU, Stefanova VN, Akopov AL, Klingmuller U, Pfefferle PI, Stiewe T, Lauth M, Brichkina AI. Pericentromeric satellite lncRNAs are induced in cancer-associated fibroblasts and regulate their functions in lung tumorigenesis. *Cell Death Dis* 2023; 14: 19.
22. Faltus C, Lahnsteiner A, Barndahl M, Assenov Y, Husing A, Bogatyrova O, Laplana M, Johnson T, Muley T, Meister M, Warth A, Thomas M, Plass C, Kaaks R, Risch A. Identification of NHLRC1 as a Novel AKT Activator from a Lung Cancer Epigenome-Wide Association Study (EWAS). *Int J Mol Sci* 2022; 23.
23. Fink MA, Kades K, Bischoff A, Moll M, Schnell M, Küchler M, Köhler G, Sellner J, Heussel CP, Kauczor HU, Schlemmer HP, Maier-Hein K, Weber TF, Kleesiek J. Deep Learning-based Assessment of Oncologic Outcomes from Natural Language Processing of Structured Radiology Reports. *Radiol Artif Intell* 2022; 4: e220055.
24. Frost N, Roeper J, Velthaus JL, Raspe M, Olive E, Schmitt A, Schmidt B, Wasilewski D, Onken J, Lüders H, Witzenrath M, Senger C, Bohmer D, Loges S, Griesinger F, Modest DP, Grohe C. Recurrence patterns and impact of brain metastases in synchronous single organ oligometastatic lung cancer following local ablative treatment - A multicenter analysis. *Lung Cancer* 2022; 170: 165-175.
25. Glatting FM, Hoppner J, Kauczor HU, Huber PE, Kratochwil C, Giesel FL, Haberkorn U, Rohrich M. Subclass Analysis of Malignant, Inflammatory and Degenerative Pathologies Based on Multiple Timepoint FAPI-PET Acquisitions Using FAPI-02, FAPI-46 and FAPI-74. *Cancers (Basel)* 2022; 14.
26. Gonzalez Maldonado S, Hynes LC, Motsch E, Heussel CP, Kauczor HU, Robbins HA, Delorme S, Kaaks R. Validation of multivariable lung cancer risk prediction models for the personalized assignment of optimal screening frequency: a retrospective analysis of data from the German Lung Cancer Screening Intervention Trial (LUSI). *Transl Lung Cancer Res* 2021; 10: 1305-1317.
27. Gonzalez Maldonado S, Johnson T, Motsch E, Delorme S, Kaaks R. Can autoantibody tests enhance lung cancer screening?-an evaluation of EarlyCDT((R))-Lung in context of the German Lung Cancer Screening Intervention Trial (LUSI). *Transl Lung Cancer Res* 2021; 10: 233-242.
28. Goyal A, Bauer J, Hey J, Papageorgiou DN, Stepanova E, Daskalakis M, Scheid J, Dubbelaar M, Klimovich B, Schwarz D, Marklin M, Roerden M, Lin YY, Ma T, Mucke O, Rammensee HG, Lubbert M, Loayza-Puch F, Krijgsvelde J, Walz JS, Plass C. DNMT and HDAC inhibition induces immunogenic neoantigens from human endogenous retroviral element-derived transcripts. *Nat Commun* 2023; 14: 6731.

29. Gründig AR, Schneider MA, Richtmann S, Kriegsmann M, Winter H, Martinez-Delgado B, Varona S, Liu B, DeLuca DS, Held J, Wrenger S, Muley T, Meister M, Welte T, Janciauskiene S. Lung Adenocarcinoma Cell Sensitivity to Chemotherapies: A Spotlight on Lipid Droplets and SREBF1 Gene. *Cancers (Basel)* 2022; 14.
30. Heitzer E, van den Broek D, Denis MG, Hofman P, Hubank M, Mouliere F, Paz-Ares L, Schuurin E, Sultmann H, Vainer G, Verstraaten E, de Visser L, Cortinovis D. Recommendations for a practical implementation of circulating tumor DNA mutation testing in metastatic non-small-cell lung cancer. *ESMO Open* 2022; 7: 100399.
31. Hey J, Llamazares Prada M, Plass C. HDAC6 score: to treat or not to treat? *Nat Cancer* 2023; 4: 156-158.
32. Hey J, Paulsen M, Toth R, Weichenhan D, Butz S, Schatterny J, Liebers R, Lutsik P, Plass C, Mall MA. Epigenetic reprogramming of airway macrophages promotes polarization and inflammation in muco-obstructive lung disease. *Nat Commun* 2021; 12: 6520.
33. Hoffmann H, Kaaks R, Andreas S, Bauer TT, Barkhausen J, Harth V, Kauczor HU, Pankow W, Welcker K, Vogel-Claussen J, Blum TG, Deutsche Röntgengesellschaft - Vorstand der Deutschen Röntgengesellschaft: Prof. Dr. med. Konstantin Nikolaou PDMJBPDmCKDrnFADm, Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin - Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin: Prof. Dr. med. Wolfram Windisch PDMCTPDmT, Deutsche Gesellschaft für Thoraxchirurgie - Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Thoraxchirurgie: Dr. med. Katrin Welcker DmLHPDmH-SHPDDm. [Statement Paper on the Implementation of a National Organized Program in Germany for the Early Detection of Lung Cancer in Risk Populations Using Low-dose CT Screening Including Management of Screening Findings]. *Zentralbl Chir* 2023.
34. Hofmann J, Borchering K, Thiel K, Lingner T, Sommer U, Haberkorn U, Bewersdorf TN, Schmidmaier G, Grossner T. (99m)Tc-HDP Labeling-A Non-Destructive Method for Real-Time Surveillance of the Osteogenic Differentiation Potential of hMSC during Ongoing Cell Cultures. *Int J Mol Sci* 2022; 23.
35. Janke F, Angeles AK, Riediger AL, Bauer S, Reck M, Stenzinger A, Schneider MA, Muley T, Thomas M, Christopoulos P, Sultmann H. Longitudinal monitoring of cell-free DNA methylation in ALK-positive non-small cell lung cancer patients. *Clin Epigenetics* 2022; 14: 163.
36. Janning M, Suptitz J, Albers-Leischner C, Delpy P, Tufman A, Velthaus-Rusik JL, Reck M, Jung A, Kauffmann-Guerrero D, Bonzheim I, Brandlein S, Hummel HD, Wiesweg M, Schildhaus HU, Stratmann JA, Sebastian M, Alt J, Buth J, Esposito I, Berger J, Togel L, Saalfeld FC, Wermke M, Merkelbach-Bruse S, Hillmer AM, Klauschen F, Bokemeyer C, Buettner R, Wolf J, Loges S, National Network Genomic Medicine Lung C. Treatment outcome of atypical EGFR mutations in the German National Network Genomic Medicine Lung Cancer (nNGM). *Ann Oncol* 2022; 33: 602-615.
37. Kaaks R, Christodoulou E, Motsch E, Katzke V, Wielpütz MO, Kauczor HU, Heussel CP, Eichinger M, Delorme S. Lung function impairment in the German Lung Cancer Screening Intervention Study (LUSI): prevalence, symptoms, and associations with lung cancer risk, tumor histology and all-cause mortality. *Transl Lung Cancer Res* 2022; 11: 1896-1911.
38. Kaaks R, Delorme S. Lung Cancer Screening by Low-Dose Computed Tomography - Part 1: Expected Benefits, Possible Harms, and Criteria for Eligibility and Population Targeting. *Rofo* 2021; 193: 527-536.
39. Kadouri N, Givony T, Nevo S, Hey J, Ben Dor S, Damari G, Dassa B, Dobes J, Weichenhan D, Bahr M, Paulsen M, Haffner-Krausz R, Mall MA, Plass C, Goldfarb Y, Abramson J. Transcriptional regulation of the thymus master regulator Foxn1. *Sci Immunol* 2022; 7: eabn8144.
40. Lamort AS, Kaiser JC, Pepe MAA, Lilis I, Ntaliarda G, Somogyi K, Spella M, Behrend SJ, Giotopoulou GA, Kujawa W, Lindner M, Koch I, Hatz RA, Behr J, Sotillo R, Schamberger AC, Stathopoulos GT. Prognostic phenotypes of early-stage lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 2022; 60.
41. Laplana M, Bieg M, Faltus C, Melnik S, Bogatyrova O, Gu Z, Muley T, Meister M, Dienemann H, Herpel E, Amos CI, Schlesner M, Eils R, Plass C, Risch A. Differentially methylated regions within lung cancer risk loci are enriched in deregulated enhancers. *Epigenetics* 2022; 17: 117-132.
42. Ley-Zaporozhan J, Giannakis A, Norajitra T, Weinheimer O, Kehler L, Dinkel J, Ganter C, Ley S, Van Lunteren C, Eichinger M, Heussel G, Kauczor HU, Maier-Hein KH, Kreuter M, Heussel CP. Fully Automated Segmentation of Pulmonary Fibrosis Using Different Software Tools. *Respiration* 2021; 100: 580-587.
43. Li M, Zhang L, Charvat H, Callister ME, Sasieni P, Christodoulou E, Kaaks R, Johansson M, Carvalho AL, Vaccarella S, Robbins HA. The influence of postscreening follow-up time and participant

- characteristics on estimates of overdiagnosis from lung cancer screening trials. *Int J Cancer* 2022; 151: 1491-1501.
44. Liew DP, Rohrich M, Loi L, Adeberg S, Syed M, Gutjahr E, Schlemmer HP, Giesel FL, Bendszus M, Haberkorn U, Paech D. FAP-Specific Signalling Is an Independent Diagnostic Approach in ACC and Not a Surrogate Marker of MRI Sequences. *Cancers (Basel)* 2022; 14.
 45. Liu CS, Toth R, Bakr A, Goyal A, Islam MS, Breuer K, Mayakonda A, Lin YY, Stepper P, Jurkowski TP, Veldwijk MR, Sperk E, Herskind C, Lutsik P, Weichenhan D, Plass C, Schmezer P, Popanda O. Epigenetic Modulation of Radiation-Induced Diacylglycerol Kinase Alpha Expression Prevents Pro-Fibrotic Fibroblast Response. *Cancers (Basel)* 2021; 13.
 46. Llamazares-Prada M, Espinet E, Mijosek V, Schwartz U, Lutsik P, Tamas R, Richter M, Behrendt A, Pohl ST, Benz NP, Muley T, Warth A, Heussel CP, Winter H, Landry JJM, Herth FJ, Mertens TC, Karmouty-Quintana H, Koch I, Benes V, Korbel JO, Waszak SM, Trumpp A, Wyatt DM, Stahl HF, Plass C, Jurkowska RZ. Versatile workflow for cell type-resolved transcriptional and epigenetic profiles from cryopreserved human lung. *JCI Insight* 2021; 6.
 47. Mancarella D, Plass C. Epigenetic signatures in cancer: proper controls, current challenges and the potential for clinical translation. *Genome Med* 2021; 13: 23.
 48. Palm V, Norajitra T, von Stackelberg O, Heussel CP, Skornitzke S, Weinheimer O, Kopytova T, Klein A, Almeida SD, Baumgartner M, Bounias D, Scherer J, Kades K, Gao H, Jäger P, Nolden M, Tong E, Eckl K, Nattenmüller J, Nonnenmacher T, Naas O, Reuter J, Bischoff A, Kroschke J, Rengier F, Schlamp K, Debic M, Kauczor HU, Maier-Hein K, Wielpütz MO. AI-Supported Comprehensive Detection and Quantification of Biomarkers of Subclinical Widespread Diseases at Chest CT for Preventive Medicine. *Healthcare (Basel)* 2022; 10.
 49. Pan F, Chocarro S, Ramos M, Chen Y, Alonso de la Vega A, Somogyi K, Sotillo R. FOXM1 is critical for the fitness recovery of chromosomally unstable cells. *Cell Death Dis* 2023; 14: 430.
 50. Pohl ST, Prada ML, Espinet E, Jurkowska R. Practical Considerations for Complex Tissue Dissociation for Single-Cell Transcriptomics. *Methods Mol Biol* 2023; 2584: 371-387.
 51. Raach B, Bundgaard N, Haase MJ, Starruss J, Sotillo R, Stanifer ML, Graw F. Influence of cell type specific infectivity and tissue composition on SARS-CoV-2 infection dynamics within human airway epithelium. *PLoS Comput Biol* 2023; 19: e1011356.
 52. Reck M, Dettmer S, Kauczor HU, Kaaks R, Reinmuth N, Vogel-Claussen J. Lung Cancer Screening With Low-Dose Computed Tomography. *Dtsch Arztebl Int* 2023; 120: 387-392.
 53. Salgueiro L, Kummer S, Sonntag-Buck V, Weiß A, Schneider MA, Kräusslich HG, Sotillo R. Generation of Human Lung Organoid Cultures from Healthy and Tumor Tissue to Study Infectious Diseases. *J Virol* 2022; 96: e0009822.
 54. Samarin J, Fabrowski P, Kurilov R, Nuskova H, Hummel-Eisenbeiss J, Pink H, Li N, Weru V, Alborzinia H, Yildiz U, Grob L, Taubert M, Czech M, Morgen M, Brandstadter C, Becker K, Mao L, Jayavelu AK, Goncalves A, Uhrig U, Seiler J, Lyu Y, Diederichs S, Klingmüller U, Muckenthaler M, Kopp-Schneider A, Teleman A, Miller AK, Gunkel N. Low level of antioxidant capacity biomarkers but not target overexpression predicts vulnerability to ROS-inducing drugs. *Redox Biol* 2023; 62: 102639.
 55. Schamschula E, Hagmann W, Assenov Y, Hedtfeld S, Farag AK, Roesner LM, Wiehlmann L, Stanke F, Fischer S, Risch A, Tümmler B. Immunotyping of clinically divergent p.Phe508del homozygous monozygous cystic fibrosis twins. *J Cyst Fibros* 2021; 20: 149-153.
 56. Schamschula E, Lahnsteiner A, Assenov Y, Hagmann W, Zaborsky N, Wiederstein M, Strobl A, Stanke F, Muley T, Plass C, Tümmler B, Risch A. Disease-related blood-based differential methylation in cystic fibrosis and its representation in lung cancer revealed a regulatory locus in PKP3 in lung epithelial cells. *Epigenetics* 2022; 17: 837-860.
 57. Schindler H, Lusky F, Daniello L, Elshiaty M, Gaissmaier L, Benesova K, Souto-Carneiro M, Angeles AK, Janke F, Eichhorn F, Kazdal D, Schneider M, Liersch S, Klemm S, Schnitzler P, Stenzinger A, Sülthmann H, Thomas M, Christopoulos P. Serum cytokines predict efficacy and toxicity, but are not useful for disease monitoring in lung cancer treated with PD-(L)1 inhibitors. *Front Oncol* 2022; 12: 1010660.
 58. Schwartz U, Llamazares Prada M, Pohl ST, Richter M, Tamas R, Schuler M, Keller C, Mijosek V, Muley T, Schneider MA, Quast K, Hey J, Heussel CP, Warth A, Winter H, Sercin O, Karmouty-Quintana H, Jyothula SS, Patel MK, Herth F, Koch I, Petrosino G, Titimeau A, Mardin BR, Weichenhan D, Jurkowski TP, Imbusch CD, Brors B, Benes V, Jung B, Wyatt D, Stahl HF, Plass C, Jurkowska RZ. High-resolution transcriptomic and epigenetic profiling identifies novel regulators of COPD. *EMBO J* 2023: e111272.

59. Sedlmeier AM, Viallon V, Ferrari P, Peruchet-Noray L, Fontvieille E, Amadou A, Seyed Khoei N, Weber A, Baurecht H, Heath AK, Tsilidis K, Kaaks R, Katzke V, Inan-Eroglu E, Schulze MB, Overvad K, Bonet C, Ubago-Guisado E, Chirlaque MD, Ardanaz E, Perez-Cornago A, Pala V, Tumino R, Sacerdote C, Pasanisi F, Borch KB, Rylander C, Weiderpass E, Gunter MJ, Fervers B, Leitzmann MF, Freisling H. Body shape phenotypes of multiple anthropometric traits and cancer risk: a multi-national cohort study. *Br J Cancer* 2023; 128: 594-605.
60. Skornitzke S, Vats N, Kopytova T, Tong EWY, Hofbauer T, Weber TF, Rehnitz C, von Stackelberg O, Maier-Hein K, Stiller W, Biederer J, Kauczor HU, Heussel CP, Wielputz M, Palm V. Asynchronous calibration of quantitative computed tomography bone mineral density assessment for opportunistic osteoporosis screening: phantom-based validation and parameter influence evaluation. *Sci Rep* 2022; 12: 20729.
61. Smith-Byrne K, Cerani A, Guida F, Zhou S, Agudo A, Aleksandrova K, Barricarte A, Barranco MR, Bochers CH, Gram IT, Han J, Amos CI, Hung RJ, Grankvist K, Nøst TH, Imaz L, Chirlaque-López MD, Johansson M, Kaaks R, Kühn T, Martin RM, McKay JD, Pala V, Robbins HA, Sandanger TM, Schibli D, Schulze MB, Travis RC, Vineis P, Weiderpass E, Brennan P, Johansson M, Richards JB. Circulating Isovalerylcarnitine and Lung Cancer Risk: Evidence from Mendelian Randomization and Prediagnostic Blood Measurements. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2022; 31: 1966-1974.
62. Srouf B, Kaaks R, Johnson T, Hynes LC, Kühn T, Katzke VA. Ageing-related markers and risks of cancer and cardiovascular disease: a prospective study in the EPIC-Heidelberg cohort. *Eur J Epidemiol* 2021.
63. Ten Haaf K, van der Aalst CM, de Koning HJ, Kaaks R, Tammemagi MC. Personalising lung cancer screening: An overview of risk-stratification opportunities and challenges. *Int J Cancer* 2021; 149: 250-263.
64. Theobald V, Benjamin N, Seyfarth HJ, Halank M, Schneider MA, Richtmann S, Hinderhofer K, Xanthouli P, Egenlauf B, Seeger R, Hoeper MM, Jonigk D, Grünig E, Eichstaedt CA. Reduction of BMPR2 mRNA Expression in Peripheral Blood of Pulmonary Arterial Hypertension Patients: A Marker for Disease Severity? *Genes (Basel)* 2022; 13.
65. Thurmann L, Klos M, Mackowiak SD, Bieg M, Bauer T, Ishaque N, Messingschlager M, Herrmann C, Roder S, Bauer M, Schauble S, Faessler E, Hahn U, Weichenhan D, Mucke O, Plass C, Borte M, von Mutius E, Stangl GI, Lauener R, Karvonen AM, Divaret-Chauveau A, Riedler J, Heinrich J, Standl M, von Berg A, Schaaf B, Herberth G, Kabesch M, Eils R, Trump S, Lehmann I. Global hypomethylation in childhood asthma identified by genome-wide DNA-methylation sequencing preferentially affects enhancer regions. *Allergy* 2023.
66. Vogel-Claussen J, Blum TG, Andreas S, Bauer TT, Barkhausen J, Harth V, Kauczor HU, Pankow W, Welcker K, Kaaks R, Hoffmann H, Deutsche R, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und B, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für T, Vorstand der Deutschen R. [Statement paper on the implementation of a national organized program in Germany for the early detection of lung cancer in risk populations using low-dose CT screening including management of screening findings]. *Rofo* 2023.
67. Weikert T, Jaeger PF, Yang S, Baumgartner M, Breit HC, Winkel DJ, Sommer G, Stieltjes B, Thaïss W, Bremerich J, Maier-Hein KH, Sauter AW. Automated lung cancer assessment on 18F-PET/CT using Retina U-Net and anatomical region segmentation. *Eur Radiol* 2023.
68. Wiedemann C, Kazdal D, Cvetkovic J, Kunz J, Fisch D, Kirchner M, Kriegsmann M, Sültmann H, Heussel CP, Bischoff H, Thomas M, Stenzinger A, Christopoulos P. Lorlatinib and compound mutations in ALK+ large-cell neuroendocrine lung carcinoma: a case report. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2022; 8.
69. Wu WY, Haider Z, Feng X, Heath AK, Tjønneland A, Agudo A, Masala G, Robbins HA, Huerta JM, Guevara M, Schulze MB, Rodriguez-Barranco M, Vineis P, Tumino R, Kaaks R, Fortner RT, Sieri S, Panico S, Nøst TH, Sandanger TM, Braaten T, Johansson M, Melin B, Johansson M. Assessment of the EarlyCDT-Lung test as an early biomarker of lung cancer in ever-smokers: A retrospective nested case-control study in two prospective cohorts. *Int J Cancer* 2023; 152: 2002-2010.
70. Yang JJ, Yu D, White E, Lee DH, Blot W, Robien K, Sinha R, Park Y, Takata Y, Gao YT, Smith-Byrne K, Monninkhof EM, Kaaks R, Langhammer A, Borch KB, Al-Shaar L, Lan Q, Sørgerd EP, Zhang X, Zhu C, Chirlaque MD, Severi G, Overvad K, Sacerdote C, Aune D, Johansson M, Smith-Warner SA, Zheng W, Shu XO. Prediagnosis Leisure-Time Physical Activity and Lung Cancer Survival: A Pooled Analysis of 11 Cohorts. *JNCI Cancer Spectr* 2022; 6.
71. Zhou W, Liu G, Hung RJ, Haycock PC, Aldrich MC, Andrew AS, Arnold SM, Bickeböller H, Bojesen SE, Brennan P, Brunnström H, Melander O, Caporaso NE, Landi MT, Chen C, Goodman GE, Christiani

DC, Cox A, Field JK, Johansson M, Kiemeny LA, Lam S, Lazarus P, Le Marchand L, Rennert G, Risch A, Schabath MB, Shete SS, Tardón A, Zienolddiny S, Shen H, Amos CI. Causal relationships between body mass index, smoking and lung cancer: Univariable and multivariable Mendelian randomization. *Int J Cancer* 2021; 148: 1077-1086.