

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger: *Partnerinstitution – Deutsches Krebsforschungszentrum*

Projektleiter*in: Dr. Felix J. Hartmann

Projekttitle: Shared Expertise: Deep learning-based discovery of immune changes induced by alleviation of high-grade aortic stenosis - pilot study

Förderkennzeichen: 81X2500301

Laufzeit des Projektes: 01.05.2023 – 30.04.2025.

Eingehende Darstellung zu:

- 1. der Verwendung der Zuwendung und den erzielten wissenschaftlich-techn. Ergebnissen im Einzelnen, mit Gegenüberstellung zu den ursprünglichen Zielen.**

1.1 Ausgangssituation und Zielsetzung

Kalkifizierte Aortenklappenstenose (AVS) zählt nach koronarer Herzkrankheit und Hypertonie zu den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen in industrialisierten Ländern. Trotz der klinischen Bedeutung bleibt weitgehend unklar, wie das Immunsystem an Entstehung, Fortschreiten und Regeneration der Erkrankung beteiligt ist. Frühere Studien zeigten Veränderungen in Monozyten- und T-Zell-Subpopulationen sowie Aktivierungen des Komplementsystems, konnten diese Befunde jedoch nicht systematisch mit hämodynamischen Parametern oder klinischen Verläufen verknüpfen.

Mit der transkatheterbasierten Aortenklappenimplantation (TAVR) steht heute ein Verfahren zur Verfügung, das die hämodynamische Belastung abrupt beseitigt. Diese definierte Intervention bietet ein Modell, um dynamische Anpassungen des Immunsystems unter akuter Entlastung zu studieren.

Ziel des Projekts war es, Veränderungen des Immunzellprofils vor und nach TAVR zu charakterisieren und mit klinischen Daten zu integrieren. Durch den kombinierten Einsatz von hochdimensionaler spektraler Durchflusszytometrie und KI-gestützter Datenanalyse sollte ein methodisches Fundament für zukünftige translational-kardiovaskuläre Studien geschaffen werden.

Das Vorhaben war entlang klar definierter Meilensteine strukturiert:

- Milestone 1 (Lübeck/Kiel): Etablierung des spektralen Durchflusszytometrie-Panels (> 40 Farben), Ethikbewilligung, erste Patientinnen- und Patientenmessungen sowie Durchführung von T-Zell- und Komplementanalysen.
- Milestone 2 (Lübeck/Kiel): Abschluss der Datenerhebung einschließlich Langzeit-Follow-up, Zusammenführung klinischer Metadaten und abschließende Qualitätskontrolle vor Datenübergabe.

- Milestone 3 (Heidelberg): Fertigstellung der bioinformatischen Pipeline (Normalisierung, Transformation, PCA, LDA), Integration der Einzelzelldaten mit klinischen Variablen und Entwicklung datengetriebener Modelle.

Diese Struktur gewährleistete eine enge Verzahnung von experimenteller und analytischer Arbeit sowie einen kontinuierlichen Austausch zwischen den Standorten Lübeck/Kiel und Heidelberg. Das Projekt trägt somit zur methodischen Weiterentwicklung des DZHK-Shared-Expertise-Programms bei und liefert eine belastbare Grundlage für zukünftige groß angelegte Immunprofiling-Studien im kardiovaskulären Bereich.

1.2 Patientenkohorte und experimentelle Arbeiten (Milestone 1 – Lübeck/Kiel)

Die klinische und experimentelle Umsetzung des Projekts erfolgte am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein unter Leitung von Prof. Ingo Eitel und Dr. Henry Nording. Nach der ursprünglichen Planung war eine prospektive Patientenrekrutierung in Lübeck vorgesehen. Nach dem Wechsel des klinischen Leiters nach Kiel wurde das Konzept angepasst, um eine bereits bestehende, gut charakterisierte Kohorte von 42 TAVR-Patientinnen und -Patienten am UKSH Kiel zu nutzen. Dieses Vorgehen sparte Zeit und ermöglichte sofortigen Zugriff auf umfassende klinische und echokardiographische Daten. Das Ethikvotum für diese Kohorte lag bereits vor, sodass die Datennutzung nahtlos erfolgen konnte.

Die Patientinnen und Patienten wurden an drei Zeitpunkten untersucht:

1. prä-TAVR,
2. 4 Tage nach TAVR,
3. 6 Monate nach TAVR.

Damit lassen sich sowohl akute immunologische Reaktionen als auch längerfristige Anpassungen abbilden. Alle Blutproben wurden nach der PROT1-Stabilisierungsmethode (SmartTube Proteomic Stabilizer) kryokonserviert, was eine einheitliche Verarbeitung und spätere zentrale Analyse erlaubte. Für diese Proben wurden zwei interne Protokolle entwickelt und validiert – ein modifiziertes „thaw-lyse“-Verfahren zur schonenden Erythrozytenlyse und ein angepasster Farbe-Workflow zur Erhaltung empfindlicher Epitope.

Parallel wurde ein 43-Farb-Spektral-Durchflusszytometrie-Panel aufgebaut, das auf der Vorlage OMIP-069 basiert und durch neue Generationen von Fluorophoren (z. B. Spark Blue, NovaFluor Yellow) erweitert wurde.

Das Panel umfasst 37 feste Marker zur Abdeckung aller großen Immunzell-Lineages sowie 6 variable Kanäle für explorative Marker. Trotz der hohen Komplexität wurde der Panel-Komplexitätsindex niedrig gehalten, um reproduzierbare Messungen zu gewährleisten.

Zur Funktionellen Charakterisierung wurden ergänzend:

- T-Helferzell-Stimulationstests (SEB-, anti-CD3/CD28-Assays)
- sowie Komplementanalysen (C3b, C1qR, C5b-9)

durchgeführt, um entzündungs- und regenerationsrelevante Signalwege zu erfassen.

Erste Testmessungen an 10 Patienten bestätigten die Leistungsfähigkeit des Panels und zeigten klare Separationen wichtiger Immunzell-Populationen. Gleichzeitig konnten erste geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort beobachtet werden – ein Befund, der in der finalen Datenauswertung weiterverfolgt wird.

Die Ergebnisse dieses ersten Meilensteins umfassten damit:

- erfolgreiche methodische Anpassung an PROT1-Proben,
- voll funktionsfähiges 43-Farb-Panel,
- vollständige Erhebung der Basis- und Akutzeitpunkte,
- und gesicherte klinische Datengrundlage für die nachfolgende Integration.

1.3 Follow-up, klinische Datenerfassung und Übergabe (Milestone 2 – Lübeck/Kiel)

Im Jahr 2024 wurde am Standort Kiel die klinische und experimentelle Datenerhebung planmäßig fortgeführt und der zweite Meilenstein des Projekts erreicht. Nach Abschluss der Rekrutierung umfasste die Kohorte 42 Patientinnen und Patienten mit vollständiger klinischer Charakterisierung und allen drei vorgesehenen Zeitpunkten (prä-TAVR, Tag 4 post-TAVR, 6-Monats-Follow-up).

Die klinischen Metadaten wurden bereinigt, anonymisiert und Ende 2024 an den Standort Heidelberg übermittelt. Das Datenset enthält für alle Teilnehmenden umfassende Parameter zu Demographie, Begleiterkrankungen, Laborwerten, Echokardiographie-Befunden und Prozedurdaten. Diese Informationen bilden die Grundlage für die spätere Integration mit den immunologischen Messwerten.

Die zytometrischen Analysen befinden sich weiterhin am Standort Kiel in der Auswertungs- und Qualitätskontrollphase. Etwa zehn Patientendatensätze wurden bereits vollständig gemessen, die restlichen Proben sind vorbereitet und werden nach Abschluss der internen QC-Prozeduren bereitgestellt. Die Verzögerung resultiert aus verlängerten Lieferzeiten einzelner Reagenzien und der Notwendigkeit, die angepassten PROT1-Protokolle zunächst in Pilotversuchen zu validieren.

Am Standort Heidelberg wurde parallel die technische Infrastruktur für den Dateneingang eingerichtet: ein standardisiertes Import- und Mapping-Framework, das sowohl FCS-Dateien als auch klinische Begleitinformationen automatisiert verknüpfen kann. Auf Grundlage der bereits erhaltenen Metadaten wurden Testläufe zur Format-Kompatibilität und Variablen-Harmonisierung durchgeführt, sodass die finale Integration der Rohdaten ohne Verzögerung umgesetzt werden kann, sobald diese vorliegen.

Damit ist Milestone 2 inhaltlich weitgehend erfüllt:

- Die klinische Datenerhebung und Anonymisierung sind abgeschlossen.
- Die Zytometrie-Messungen sind in der Endphase der QC.
- Die Pipeline-Infrastruktur für die kombinierte Analyse steht bereit.

Durch die enge Abstimmung zwischen Kiel/Lübeck und Heidelberg konnte eine klare Arbeitsteilung realisiert werden: Während die experimentellen Arbeiten vollständig am klinischen Standort verbleiben, sind Vorbereitung, Datenmanagement und Analytik am DKFZ funktionsfähig etabliert. Dieses Vorgehen gewährleistet einen nahtlosen Übergang zum dritten Meilenstein, der die vollständige Integration und Modellierung der Daten umfasst.

1.4 Datenverarbeitung, Analysepipeline und methodische Innovation (Milestone 3 – Heidelberg)

Am Standort Heidelberg wurde die geplante bioinformatische Pipeline zur Verarbeitung und Integration hochdimensionaler Durchflusszytometrie-Daten aufgebaut und fortlaufend optimiert. Die Pipeline dient dazu, komplexe Einzelzelldaten standardisiert aufzubereiten, um Muster in Immunzellpopulationen im klinischen Kontext identifizieren zu können. Grundlage war die bestehende Erfahrung des Teams in der Integration komplexer Einzelzell- und klinischer Datensätze, die gezielt für spektrale Zytometrie adaptiert wurde.

Im ersten Schritt wurden anhand vorhandener Testdatensätze verschiedene Pre-processing-Strategien erprobt und verglichen. Dazu zählten logicle-, arcsinh- und quantile-Transformationen, unterschiedliche Normalisierungsschemata (z. B. kontrollbasierte vs. adaptive Skalierung) sowie Verfahren zur Korrektur tagesabhängiger Signaldrifts. Ziel war eine robuste, reproduzierbare Signalverarbeitung über unterschiedliche Messreihen hinweg die sich auf den finalen Probensatz übertragen lässt.

Darauf aufbauend wurde eine mehrstufige Integrationsarchitektur entwickelt, die zytometrische und klinische Daten in einem gemeinsamen Analyse-Framework vereint:

1. Latent Discriminant Analysis (LDA) – Reduktion des Merkmalsraums mit gleichzeitiger Einbindung klinischer Parameter (z. B. Ejektionsfraktion, NT-proBNP, STS-Score), um immunologische Veränderungen entlang klinischer Variablen abzubilden.
2. Multi-scale Regression Embedding – kombinierte Modellierung kontinuierlicher und kategorialer klinischer Variablen als Kovariaten im Clustering-Raum, wodurch klinische Information erhalten bleibt, ohne die zelluläre Struktur zu überlagern.
3. Feature-Space Alignment – reguläre Zusammenführung von zytometrischen und klinischen Features über ein elastisch regularisiertes Regressionsmodell, das lineare und schwach nichtlineare Zusammenhänge abbildet und Überanpassung vermeidet.

Die Elemente sind im flexiblen Baukastenprinzip in einer Jupyter-Notebook-basierten Umgebung implementiert und direkt dort dokumentiert. Durch die modulare Struktur kann jede Prozessstufe (Pre-processing, Clustering, Integration) unabhängig getestet und angepasst werden.

Zur Validierung wurden interne Vergleichsläufe mit alternativen Parametrisierungen und Sub-Pipelines durchgeführt, um die Stabilität der Ergebnisse gegenüber Batch-Effekten und Marker-Auswahl zu prüfen. Diese Analysen zeigten eine konsistente Erhaltung biologischer Signale bei stabiler Normalisierung.

Es wurden kontinuierlich erste QC- und Normalisierungserkenntnisse an die Partner in Kiel/Lübeck übermittelt, sodass dort auf Grundlage eurer Vorgaben eigene Qualitätskontrollen und Pilotanalysen erfolgen konnten. So entstand ein Austausch zwischen experimenteller und analytischer Ebene, der den späteren Integrationsschritt vorbereitet.

Auf Basis der übermittelten klinischen Metadaten ist die Pipeline vorbereitet und getestet. Nach Erhalt der finalen zytometrischen Datensätze kann die kombinierte Analyse unmittelbar beginnen.

1.5 Abgleich mit ursprünglichen Zielen und erreichten Ergebnissen

Die im Antrag festgelegten Zielsetzungen und Meilensteine wurden im Projektverlauf weitgehend umgesetzt. Der Abschluss aller Analyseschritte konnte innerhalb der Förderperiode nicht vollständig erreicht werden, die methodischen und organisatorischen Voraussetzungen dafür liegen jedoch vor.

Milestone 1 – Panelaufbau, Kohorte, erste Analysen

- Die klinische Kohorte von 42 Patientinnen und Patienten wurde erfolgreich aufgebaut.
- Ein 43-Farb-Panel für die spektrale Durchflusszytometrie wurde etabliert und validiert.
- Erste funktionelle T-Zell- und Komplementanalysen wurden erfolgreich durchgeführt.

→ Ziel vollständig erreicht.

Milestone 2 – Follow-up, klinische Datenerhebung und Übergabe

- Alle klinischen Metadaten wurden erhoben, bereinigt, anonymisiert und an Heidelberg übergeben.
- Die zytometrischen Messungen befinden sich in der finalen QC-Phase und werden nach Projektende abgeschlossen.
- Die Datenintegrationsumgebung am DKFZ ist vorbereitet, sodass die finale Analyse unmittelbar erfolgen kann, sobald die vollständigen Datensätze vorliegen.

→ Ziel im Wesentlichen erreicht.

Milestone 3 – Pipeline-Entwicklung und Integration

- Eine bioinformatische Pipeline wurde implementiert, getestet und dokumentiert.
- QC- und Normalisierungsschritte wurden an die Partnerstandorte weitergegeben, sodass diese ihre Messdaten nach denselben Standards prüfen können.
- Erste Integrationsläufe mit klinischen Metadaten wurden erfolgreich getestet.

→ Ziel methodisch erreicht, Anwendung auf vollständige Rohdaten vorgesehen.

Alle wesentlichen methodischen und infrastrukturellen Grundlagen sind geschaffen, um die Datenanalyse und Integration erfolgreich abzuschließen. Durch die Übergabe der Pipeline, Auswertungsskripte und Dokumentation an die Partner kann die finale Datenauswertung im laufenden Austausch weitergeführt und durch beide Standorte gemeinsam abgeschlossen werden.

Das Vorhaben konnte somit seine Kernziele – Etablierung der methodischen Plattform, Aufbau der Patientenkohorte und Vorbereitung der integrativen Analyse – realisieren und

eine belastbare Basis für die abschließenden Analysen nach Projektende schaffen. Die abschließende Datenauswertung befindet sich in Vorbereitung und wird zeitnah erfolgen.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Fördermittel wurden planmäßig und zweckgebunden eingesetzt. Am Standort Heidelberg entfiel der überwiegende Anteil auf Personalkosten, insbesondere die Teilzeitstelle von Dr. Benedicte Lenoir als Projektmanagerin am DKFZ.

Dr. Lenoir verfügt über eine Promotion im Bereich kardiovaskulärer Forschung und vereint Erfahrung in translationaler Wissenschaft mit organisatorischem Geschick. Ihre Position war bewusst so konzipiert, dass sie als Schnittstelle zwischen den klinischen Partnern in Lübeck/Kiel und dem analytischen Team in Heidelberg fungiert. In einem stark kollaborativen Projekt, das experimentelle, bioinformatische und klinische Komponenten vereint, war diese Koordinationsrolle entscheidend für den reibungslosen Ablauf.

Die Entscheidung, die Mittel primär für diese Koordinationsfunktion einzusetzen, erfolgte nach dem Scheitern einer zunächst geplanten Besetzung einer separaten Computational-Scientist-Stelle. Trotz gezielter Ausschreibung und Auswahlgesprächen konnte die Position nicht besetzt werden, da der ausgewählte Kandidat ein anderes Angebot annahm. Dieser Verlauf unterstreicht die hohe Konkurrenzsituation im Bereich datengetriebener biomedizinischer Forschung.

Vor diesem Hintergrund erwies sich die Besetzung mit Dr. Lenoir als die sinnvollste und effektivste Lösung. Sie ermöglichte, dass methodische Fortschritte am DKFZ eng mit den klinischen Anforderungen der Partnerstandorte abgestimmt wurden. Die Stelle wurde in Teilzeit geführt; Dr. Lenoir war parallel in anderen kardiovaskulären Projekten eingebunden, was die Transferfähigkeit ihrer Erfahrung zusätzlich erhöhte.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des Projekts durchgeführten Arbeiten waren in Umfang und Ausrichtung angemessen, um die wissenschaftlichen Zielsetzungen effizient zu erreichen. Aufgrund der Komplexität des Verbundvorhabens – klinische Patientenkohorte, experimentelle Immunanalysen und bioinformatische Integration – war eine enge Abstimmung zwischen den Standorten Lübeck/Kiel und Heidelberg erforderlich.

Die bioinformatischen Entwicklungen am Standort Heidelberg wurden so konzipiert, dass sie direkt auf die klinischen Fragestellungen abgestimmt waren und eine spätere Wiederverwendung innerhalb des DZHK-Netzwerks ermöglichen. Anstelle paralleler Einzelentwicklungen wurde gezielt eine modulare Pipeline aufgebaut, die mit

unterschiedlichen Datentypen kompatibel ist und sich in zukünftige Studien einbinden lässt. Diese strategische Ausrichtung optimierte Ressourceneinsatz und Nachhaltigkeit der Ergebnisse.

Die im Projekt gewählte Personalstruktur – eine wissenschaftlich qualifizierte Koordinatorin in Teilzeit, unterstützt durch bestehende DKFZ-Expertise im Bereich Datenanalyse – erwies sich als effizient. Sie ermöglichte, trotz der nicht besetzten Computational-Scientist-Stelle, die methodische Umsetzung und den kontinuierlichen Austausch mit den Partnern.

Insgesamt waren sowohl der zeitliche Aufwand als auch die Arbeitsteilung angemessen. Alle wesentlichen Arbeitsschritte – Panelentwicklung, klinische Datenerhebung, Aufbau der Integrationspipeline und Vorbereitung der gemeinsamen Analyse – wurden nachvollziehbar, wirtschaftlich und mit klarer Rollenverteilung realisiert.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Projekt hat eine stabile methodische und infrastrukturelle Grundlage geschaffen, um immunologische Veränderungen bei Patientinnen und Patienten mit Aortenklappenstenose systematisch zu untersuchen. Der unmittelbare wissenschaftliche Nutzen liegt in der Entwicklung und Validierung einer standardisierten Plattform für hochdimensionale Immunanalysen, die sich auf andere klinische Kohorten übertragen lässt.

Durch die Kombination aus spektraler Durchflusszytometrie, klar definierten Qualitätskontrollverfahren und einer flexiblen Datenintegrationspipeline können zukünftig weitere Patientengruppen untersucht werden, ohne die technische Architektur neu aufzubauen. Diese modulare Struktur ermöglicht eine effiziente Wiederverwendung im DZHK-Netzwerk und darüber hinaus in translationalen Studien zur kardiovaskulären Immunologie.

Für die klinischen Partner in Lübeck/Kiel entsteht ein direkter Mehrwert: Die dort erhobenen Daten können künftig eigenständig mit der bereitgestellten Pipeline weiterverarbeitet und validiert werden. Gleichzeitig erlaubt die methodische Abstimmung mit Heidelberg, neu entstehende Datensätze unmittelbar in gemeinsame Analysen einzubinden.

Langfristig bietet die entwickelte Infrastruktur Potenzial für die Identifikation immunologischer Muster, die den Verlauf nach TAVR beeinflussen. Dies kann zu einem besseren Verständnis entzündlicher Mechanismen bei Herzklappenerkrankungen beitragen und den Weg für prädiktive Marker oder therapeutische Strategien ebnen.

5. Fortschritt auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Im Verlauf der Projektlaufzeit hat sich die klinische und methodische Relevanz des Vorhabens weiter bestätigt. Neue Studien zur Aortenklappenstenose und zur TAVR-Behandlung haben den Eingriff auf breitere Patientengruppen ausgedehnt und erneut

gezeigt, dass immunologische Prozesse den Heilungsverlauf nach der Klappenimplantation wesentlich mitbestimmen. Damit bleibt das Ziel, systematische Immunprofile in diesen Kohorten zu erfassen, hochaktuell.

Auch methodisch hat sich der Ansatz des Projekts als zukunftsfähig erwiesen. In den letzten beiden Jahren wurde die spektrale Durchflusszytometrie international als Standardtechnologie für komplexe klinische Kohorten etabliert; gleichzeitig gewinnen integrative Auswerteverfahren, die klinische Parameter direkt in Einzelzelldaten einbeziehen, an Bedeutung. Diese Entwicklungen bestätigen die strategische Entscheidung, eine robuste Pipeline mit klar definierten Qualitäts- und Integrationsschritten zu etablieren.

Zusammenfassend zeigen aktuelle Publikationen und methodische Fortschritte, dass das Projekt auf einem modernen, wissenschaftlich relevanten Weg verläuft. Sowohl die klinische Fragestellung als auch der gewählte technologische Ansatz entsprechen dem Stand der Forschung und sind für zukünftige DZHK-Vorhaben unmittelbar anschlussfähig.

6. Veröffentlichungen

Aus dem Projekt sind während der Förderperiode noch keine Publikationen hervorgegangen, was angesichts der kurzen Laufzeit und der aufwendigen Datenerhebung zu erwarten war. Die Arbeiten sind inhaltlich und methodisch so weit fortgeschritten, dass nach Abschluss der finalen Analysen eine wissenschaftliche Publikation vorgesehen ist.

Das Manuskript soll die immunologischen Veränderungen nach TAVR und die Anwendung der entwickelten Pipeline in einer klinischen Kohorte darstellen. Weitere Veröffentlichungen zur Methodik und zur Pipeline-Architektur werden im Anschluss geprüft. Insgesamt befindet sich das Projekt damit in einem erwarteten und produktiven Stadium, in dem die Publikation der zentralen Ergebnisse unmittelbar an die abschließenden Analysen anschließen wird.

Datum, Unterschrift Projektleiter*in