

Schlussbericht – Teilprojekt zum Verbundvorhaben „NADIM“: Erforschung von Detektionsreagenzien für den Nachweis von molekularen Markern der Alzheimer-Krankheit in Zellen des Blutes

Förderkennzeichen: 13GW0406A

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung:

Demenzielle Erkrankungen sind weltweit und insbesondere in den westlichen Industrienationen auch vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung auf dem Vormarsch. Die damit verbundenen Belastungen für die Angehörigen und Pflegenden sowie die Kosten für die Gesundheits- und sozialen Versorgungssysteme sind erheblich. Die häufigste Ursache von Demenz ist die Alzheimerkrankheit, für die es bis heute trotz zuletzt erzielter Fortschritte kaum Optionen für eine medikamentöse Behandlung gibt. Da im fortgeschrittenen Stadium auch unter Berücksichtigung der jüngsten Studienergebnisse kaum Aussicht auf eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Patienten besteht, kommt der Frühdiagnostik im prodromalen Stadium ein hoher Stellenwert zu. Diese stützt sich aktuell auf die Erfassung etablierter Marker unter Anwendung aufwändiger, teils invasiver Verfahren wie die Liquorpunktion bzw. das Amyloid-PET. Für eine verbreitete kostengünstige Testung zur frühzeitigen Feststellung einer sich entwickelnden Alzheimerkrankheit wäre ein Blut-basierter Test ein entscheidender Durchbruch.

Innerhalb des Verbundvorhabens „NADIM“ wurde ein neues, vielversprechendes Konzept für die Detektion von Alzheimersignaturen im Patientenblut verfolgt. Der gewählte Lösungsansatz fokussierte sich auf die Analyse phagozytotisch aktiver Zellen (Makrophagen). Die beteiligten Partner wollten die besonderen Eigenschaften und spezifischen Funktionen dieser Zellen nutzen, welche aus dem Blut in die verschiedenen Gewebe des Organismus einwandern können und dort als wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems Pathogene, Zelldebris und andere Ablagerungen in sich aufnehmen. Insbesondere die Fähigkeit, an der Blut-Hirnschranke in den engen Austausch mit den neuronalen Strukturen zu gehen und teilweise die Blut-Hirnschranke zu passieren, machen Makrophagen zu vielversprechenden potenziellen Informationsträgern, um im Hirn ablaufende Prozesse im Blut nachzuweisen. Eine mengenmäßig sehr kleine Zellpopulation des Blutes, in der auch aus den Geweben remigrierte Monozyten und Makrophagen zu erwarten sind, sollte hinsichtlich phagozytierter Alzheimer-Epitope untersucht werden, um auf diese Weise molekulare Profile, die mit der Krankheit korrelieren, festzustellen. Übergeordnetes Ziel des Forschungsverbundes war es, eine neue Strategie für ein künftiges, niederschwelliges diagnostisches Verfahren zur Früh- und Verlaufsdagnostik der Alzheimerkrankheit zu entwickeln, mit dem sich die eingangs beschriebenen Einschränkungen überwinden ließen.

Der INVIGATE GmbH kam innerhalb des Forschungsverbundes die Aufgabe zu, geeignete Antikörperreagenzien verfügbar zu machen, die den Nachweis der phagozytierten Alzheimer-assoziierten Epitope innerhalb der betreffenden Zellen ermöglichen. Um leistungsfähige und ausreichend definierte Antikörper hervorzubringen, sollten zu einem mit den Partnern abgestimmten Markerpanel Kollektionen an monoklonalen Antikörpern angelegt werden, aus denen diejenigen Antikörper identifiziert werden sollten, die sich als optimale Detektoren für die intrazellulär vorliegenden phagozytierten Alzheimer-Epitope auszeichnen. Die Antikörper sollten dann in Immunfärbeprotokolle münden, durch welche die molekularen Signaturen in erster Linie über einen Mikroskopie-gestützten Ansatz sichtbar gemacht werden können.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde:

Die aktuell eingesetzte laborchemische Diagnostik der Alzheimererkrankung beruht auf der sehr aufwendigen Liquordiagnostik. Dabei werden aus einer über eine Lumbalpunktion gewonnenen Liquorprobe mithilfe herkömmlicher Immunassays molekulare Marker der mit der Alzheimerkrankheit verbundenen Neurodegeneration wie hyperphosphoryliertes Tau-Protein oder bestimmte Amyloid- β -Peptide erfasst. Anhand der Ausprägung dieser Marker lassen sich zum Teil viele Jahre vor dem Einsetzen von Demenzsymptomen verhältnismäßig zuverlässig Aussagen über eine sich entwickelnde Alzheimerkrankheit treffen.

Für die beabsichtigte Untersuchung spezifischer zellulärer Komponenten des Blutes kommt seit etwa zwei Jahrzehnten die Durchflusszytometrie auch innerhalb diagnostischer Testungen immer häufiger zu Anwendung. Mit dieser sehr leistungsfähigen Technologie lassen sich innerhalb weniger Minuten mehrere Hunderttausend Zellen nach morphologischen Kriterien klassifizieren und für jede einzelne Zelle verschiedene Parameter mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper nachweisen. Vor einigen Jahren wurde ein auf der Durchflusszytometrie basierendes Konzept, die Epitopdetektion in Makrophagen (EDIM) vorgestellt [1]. Mit dieser Methodik ließen sich beachtliche Fortschritte für die Früherkennung von Krebs aus Blutproben erzielen.

Im Kontext der beabsichtigten Detektion phagozytierter Marker der Alzheimerkrankheit hat die Durchflusszytometrie allerdings einen entscheidenden Nachteil, da sie keine Differenzierung der subzellulären Verteilung der nachgewiesenen Epitope erlaubt. Insbesondere bei den adressierten Beta-Amyloid-Markern könnte es sich als schwierig erweisen, phagozytierte A β -Epitope von Zelloberflächen-assoziiertem Amyloid-Präkursorprotein zu unterscheiden. Um diese Einschränkung zu umgehen sollte innerhalb des Verbundes ein bildgebender Untersuchungsansatz entwickelt und für das beabsichtigte Nachweiskonzept der Alzheimerkrankheit erprobt werden.

An die für den Nachweis benötigten Antikörper stellen sich im vorliegenden Kontext sehr große Anforderung. Innerhalb des Teilprojekts setzt unser Labor daher die monoklonale Antikörpertechnologie ein, um Kollektionen an spezifischen Antikörpermolekülen zu erzeugen und hiervon diejenigen zu identifizieren, die sich für intrazelluläre Detektion der phagozytierten Epitope am besten eignen.

3. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Für die Entwicklung der beabsichtigten monoklonalen Antikörper als Detektoren für der Neurodegeneration zugeordnete Epitope konnte die INVIGATE GmbH auf umfassende Expertise im eigenen Labor zurückgreifen, die zum großen Teil aus einem zurückliegenden BMBF-geförderten Verbundvorhaben („CoDiRA“) hervorging.

Die beabsichtigte Erarbeitung von Antikörperdetektoren für die fluoreszenzmikroskopische Erfassung von der Alzheimerkrankheit zugeordneten Epitopen war für unser Unternehmen ein neuer Entwicklungsschritt. Die dafür benötigten Kompetenzen wurden innerhalb des Projektes sukzessive erworben. Ebenso lagen im Unternehmen noch keine Erfahrungen in der Erzeugung von Antikörpern zur spezifischen Detektion posttranslational modifizierter Proteinabschnitte vor. Auch hierin lag eine mit dem Projekt verbundene Weiterentwicklung.

4. Ablauf des Vorhabens:

Die Bearbeitung des Projektes wurde im März 2020 begonnen. Die Forschungs- und Entwicklungsarbeiten für die Erzeugung der Antikörper-Dektoren wurden weitestgehend wie

ursprünglich geplant durchgeführt. Die ersten FuE-Arbeiten zur Antikörpererzeugung waren in Abstimmung mit dem Partner am Universitätsklinikum in Erlangen auf bereits etablierte Alzheimer-Marker wie phospho-Tau Motive und Amyloid-Beta Peptide ausgerichtet, die sich bereits im Rahmen der Liquoruntersuchung bewährt haben. Dieser Projektabschnitt wurde sehr erfolgreich in der ursprünglichen Zeitplanung umgesetzt.

Für die anschließende Projektphase wurde mit dem Partner in Erlangen ein erweitertes Markerpanel für die Antikörperentwicklung abgestimmt, das neben modifizierten beta-Amyloidstrukturen auch synaptische Marker einschloss. Für diese Aktivitäten musste ein neuer Dienstleister für die benötigten Immunisierungsarbeiten gefunden werden, da das bisher beauftragte Labor seinen Betrieb eingestellt hat. Dies hatte erhebliche Auswirkungen auf die Antikörperentwicklung in unserem Labor. Erste Immunisierungsrunden konnten von uns nicht mit dem üblichen Ausbeuten in antikörperproduzierende Zellen überführt werden. Die dadurch notwendig gewordene detaillierte Abstimmung unserer Protokolle an die neuen Gegebenheiten der Immunisierung war sehr zeitaufwendig und resultierte in einer mehrmonatigen Verzögerung des Projektfortschritts und höheren Entwicklungskosten. Mit einer vom Projektträger gewährten kostenneutralen Verlängerung der Projektlaufzeit um 12 Monate konnte die Antikörperentwicklung für das erweiterte Markerpanel fortgeführt werden. Die daraus hervorgegangenen Antikörper standen damit leider erst sehr spät für die Untersuchungen zur Verfügung.

5. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen:

Das Teilprojekt konnte zum überwiegenden Teil wie geplant umgesetzt werden. Die im Antrag gefassten Ziele wurden weitestgehend erreicht:

- 1) Es konnten zahlreiche monoklonale Antikörper gegen etablierte Marker der Alzheimerkrankheit entwickelt werden, von denen eine Auswahl in die experimentellen Arbeiten zur Epitopdetektion in Makrophagen (EDIM) überführt werden konnte. Dabei wurden wie vorgesehen größere Kollektionen an monoklonalen Antikörpern gegen mehrere der höchstrelevanten phospho-Tau Epitope gewonnen und die ausgeprägte Phosphospezifität der Antikörper experimentell bestätigt. Des Weiteren sind einige monoklonale Antikörper gegen Alzheimer-assoziierte Amyloid-Beta (A β)-Peptide aus dem Teilprojekt hervorgegangen, von denen ein Antikörper für die spezifische Unterscheidung der besonders relevanten A β -42 und A β 1-40 Peptide identifiziert werden konnte.
- 2) Die Antikörper wurden innerhalb der durchflusszytometrischen und der fluoreszenzmikroskopischen Immunfärbung optimiert und erprobt. Ihre Funktionalität konnte in beiden Anwendungen bestätigt werden. Insbesondere für die phospho-Tau Antikörper sind in der Zusammenarbeit mit dem Uniklinikum Erlangen erste vielversprechende Ergebnisse hervorgegangen, die darauf hindeuten, dass mit dem gewählten Ansatz, Signaturen in den Makrophagen des Blutes vorzufinden sind, die mit der Präsenz von phospho-Tau im Liquor korrelieren.
- 3) Die weitere Antikörperentwicklung war auf das vom Uniklinikum Erlangen festgelegte erweiterte Markerpanel für eine künftige differenziertere AD-Diagnostik ausgerichtet. Hierbei handelte es sich im Wesentlichen um einige in der Literatur beschriebene post-translational modifizierte A β -Peptidstrukturen sowie einige Proteine, die potenziell eine Beteiligung der Synapsen an den neurodegenerativen Vorgängen abbilden. Es ist gelungen, einen Antikörper gegen ein beschriebenes A β -Peptidderivat mit N-terminalem Pyroglutamat zu entwickeln und dessen ausgeprägte Spezifität gegen die post-translational modifizierte Struktur experimentell zu bestätigen. Darüber hinaus wurde eine größere Kollektion von monoklonalen Antikörpern gegen das Protein Synaptophysin etabliert und einige ausgewählte Antikörper hiervon in die

weitere Testung an Primärmaterial einbezogen. Die Aussagekraft der diesbezüglichen experimentellen Daten war zum Laufzeitende leider noch etwas begrenzt.

- 4) Ein weiterer Entwicklungsabschnitt bestand in der methodischen Abstimmung der Immunfärbeprotokolle mit den erzeugten Antikörpern, um diese in den Workflow des Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer (RCMIA) des Verbundvorhabens einzubringen. Dies ist schließlich durch umfangreiche Anpassungen der Fixierungs- und Kopplungschemie sowie durch technische Adaptionen der mikrofluidischen Färbeporgänge gemeinsam mit den Kollegen der ImmunoTools GmbH und der Quantum Analysis GmbH gelungen. Damit steht nun ein automatisierbares System zur Immunfärbung und mikroskopischen Datenakquise zur Verfügung, das für die Detektion einer großen Zahl von Markern bzw. Antigenen an seltenen Zellen aus Liquor- und Blutproben zum Einsatz kommen kann.

Insgesamt wurden damit die wesentlichen Projektziele erreicht. Erste vielversprechende Daten geben Hinweise darauf, dass der Nachweis von molekularen Signaturen der Alzheimerkrankheit wie z.B. die beschriebenen phospho-Tau-Motive über die Epitopdetektion in Makrophagen des Blutes mit unseren entwickelten Antikörpern prinzipiell möglich ist. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese vorläufigen Ergebnisse zu konsolidieren.

Referenzen:

[1] Grimm M, Schmitt S, Teriete P, Biegner T, Stenzl A, Hennenlotter J, Muhs HJ, Munz A, Nadtofschi T, König K, Sängler J, Feyen O, Hofmann H, Reinert S, Coy JF. A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells. BMC Cancer. 2013 Dec 4;13:569

I. Eingehende Darstellung

1.) Detaillierte Darstellung der Projektergebnisse mit Gegenüberstellung zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

Die Aufgabenstellung der INVIGATE GmbH innerhalb des Verbundhabens „NADIM“ bestand darin, monoklonale Antikörper für potenzielle Marker der Alzheimerkrankheit-bedingten Neurodegeneration zu entwickeln und hiervon geeignete Detektoren für die Untersuchungen zur Nachweisbarkeit phagozytierter Alzheimersignaturen in Monozyten/Makrophagen des Blutes hervorzubringen. Für die Epitopdetektion in den betreffenden Zellen war es notwendig, geeignete Verfahren zur Zellpräparation und Immunfärbung insbesondere für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zu entwickeln. Hierbei galt es, mithilfe der Antikörper sowohl die betreffenden Zellen zu identifizieren als auch die intrazellulär vorliegenden phagozytierten Marker zu erfassen.

Aus den experimentellen Arbeiten sollte schließlich in der Zusammenarbeit mit den Partnern in Erlangen, Münster und Jena ein erstes Konzept hervorgehen, mit dem molekulare Veränderung, die mit der Alzheimerkrankheit einhergehen, anhand von Blutproben prinzipiell nachgewiesen werden können.

Unsere Projektaktivitäten waren innerhalb des Verbundvorhabens in den übergeordneten Arbeitspaketen

AP1: Entwicklung spezifischer Nachweisreagenzien für die Alzheimerkrankheit (AD)

AP5: Entwicklung Blut-basierte Demenz-Diagnostik mittels RCMA-Instrument

und AP6: Optimierte Auslegung des Verfahrens für die künftige Blut/Liquor-Diagnostik

angesiedelt, wobei der weit überwiegende Teil auf das AP1 entfallen ist. Die unserem Unternehmen zugeordneten Sub-Arbeitspakete waren jeweils mit spezifischen Entwicklungszielen verbunden, für die wir im Folgenden eine Gegenüberstellung zu den erreichten Ergebnissen vornehmen möchten.

AP1: Entwicklung spezifischer Nachweisreagenzien für die Alzheimerkrankheit (AD)

Entsprechend der Planung des Antrags sollten neben den in erster Linie verfolgten validierten Demenz-Markern der beta-Amyloidpeptide und phosphoryliertem Tau (pTau) für eine differenzierte Diagnostik ein erweitertes Marker-Panel adressiert und in Bezug auf die Antikörper-Reagenzien entsprechende Lösungen entwickelt werden.

Zunächst wurde in enger Abstimmung mit dem Verbundpartner in Erlangen das erste Panel an etablierten Markern für die Alzheimer Demenz definiert. Dies schloss insbesondere die Beta-Amyloid Peptide A β 1-40 und A β 1-42 sowie die phosphorylierten Motive des Tau-Proteins phospho-Tau181, phospho-Tau202/205 sowie phospho-Tau231 ein. Für die genannten Marker wurden geeignete Immunogenpräparationen entwickelt, mit denen sich gute Immunantworten in Mäusen erzielen lassen (AP1-INV02). Hierbei wurden synthetische Peptide so ausgelegt, dass eine zielgerichtete und effiziente chemische Konjugation auf das Trägerprotein Ovalbumin (OVA) erfolgen konnte. Des Weiteren wurden zwei Marker (u.a. Tau-Protein) als rekombinante Proteinpräparation in unserem Labor erstellt. Nach der Immunisierung von Mäusen bei einem qualifizierten Service-Anbieter wurden in unserem Labor aus dem hervorgegangenen Milzzellmaterial Hybridomkulturen angezüchtet und die zugehörigen Antikörper getestet. Mehrere Runden der Immunisierung und Hybridomzellanzucht wurden durchgeführt um eine möglichst große Auswahl an monoklonalen Antikörpern hervorzubringen und damit eine gute Chance auf erfolgversprechende Detektoren für die weiteren experimentellen

Arbeiten einzuräumen. Von besonderer Relevanz war das pTau181 Motiv, für das sechzehn individuelle Antikörper mit bestätigter phosphospezifischer Bindung etabliert werden konnten.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der kryokonservierten Hybridomklone mit zugehörigen gereinigten Antikörperproben, die zu den etablierten Markern der Alzheimerkrankheit für die weiteren experimentellen Arbeiten angelegt werden konnten.

Marker	verwendetes Immunogen	etablierte Hybridomklone
phosphoryliertes Tau (Position 181)	Peptid-Ovalbumin-Konjugat	20
phosphoryliertes Tau (Positionen 202 und 205)	Peptid-Ovalbumin-Konjugat	29
Tau Protein (Isoform F)	rekombinantes Protein (E. coli)	9
Tau-Protein (EP-Epitop)	Peptid-Ovalbumin-Konjugat	1
N-terminaler Bereich des A β -Peptids	Peptid-Ovalbumin-Konjugat	17
A β -Peptid, Längenvariante 1-40	mehrere Peptid-Ovalbumin-Konjugate	1
Amyloid-Präkursorprotein (APP), Ectodomäne	Peptid-Ovalbumin-Konjugat	28

Tab. 1: Zusammenfassung der kryokonservierten Hybridomklone mit zugehörigen gereinigten Antikörperproben, die zu den etablierten Markern der Alzheimerkrankheit für die weiteren experimentellen Arbeiten angelegt werden konnten.

Die mit diesem Teilprojekt verbundenen Ziele wurden damit weitestgehend erreicht. Für einige A β -Peptid-Motive wäre eine größere Anzahl an Antikörpern wünschenswert gewesen, die wir allerdings aufgrund der größeren Einschränkungen und Verzögerungen durch den Ausfall unseres bevorzugten Immunisierungsdienstleisters nicht umsetzen konnten.

Um die Eignung der entwickelten Antikörper für den Nachweis intrazellulär vorliegender Epitope abschätzen und eine Auswahl vielversprechender Antikörper treffen zu können sollte ein Phagozytosemodell etabliert werden, mit dem sich die zu untersuchenden Epitope experimentell in Zellen einführen lassen (AP1-INV01). Hierfür wurde die Zelllinie THP-1 verwendet, die mit verschiedenen Stimulanzen einer Aktivierung unterzogen worden ist. Zunächst wurde anhand von Fluorescein-beladenen Polymerpartikeln erste Evaluierungen durchgeführt. Die Partikel konnten in unserem Labor mit verschiedenen Fluoreszenzbeladungen ausgestattet und in THP-1 Zellen eingebracht werden. Damit standen für die experimentelle Abstimmung mit den Partnern und für die Einordnung der erreichten optischen Auflösung des zu entwickelnden mikroskopoptischen Aufbaus in Münster sehr geeignete praxisnahe Referenzmaterialien zu Verfügung.

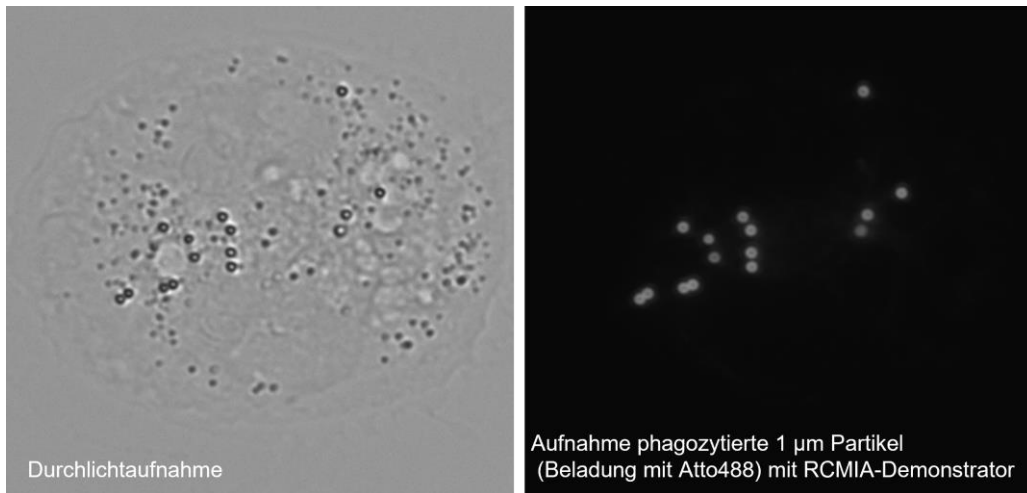


Abb. 1: Demonstration der optischen Auflösung der ersten Versuchsanordnung zum RCMIA-Instrument anhand phagozytierter 1 µm großer Fluoreszenz-beladener Partikel in der Modellzelllinie THP-1

Die weiteren experimentellen Arbeiten dienten der Überprüfung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung nach der Phagozytose in THP-1. Hierzu wurden Antigen-beladene Partikel mit den einzelnen Antikörperklonen inkubiert und im Anschluss zur Phagozytose den THP-1 Kulturen zugesetzt. Mit diesem Kontrollexperiment ließen sich erhebliche Unterschiede in Intensität und Spezifität der Signale zu den untersuchten Antikörperklonen feststellen. Bei einem größeren Teil unserer Antikörperklone waren die beobachteten Partikel-assoziierten Signalintensitäten im Phagozytosemodell sehr gering und relativ unspezifisch. Bei den phospho-Tau181 Antikörpern lieferten die Klone PT1-21 und PT1-26 hinsichtlich Intensität und Spezifität der Fluoreszenzsignale sehr gute Ergebnisse und stellten sich damit für die weiteren Arbeiten als besonders vielversprechend heraus.

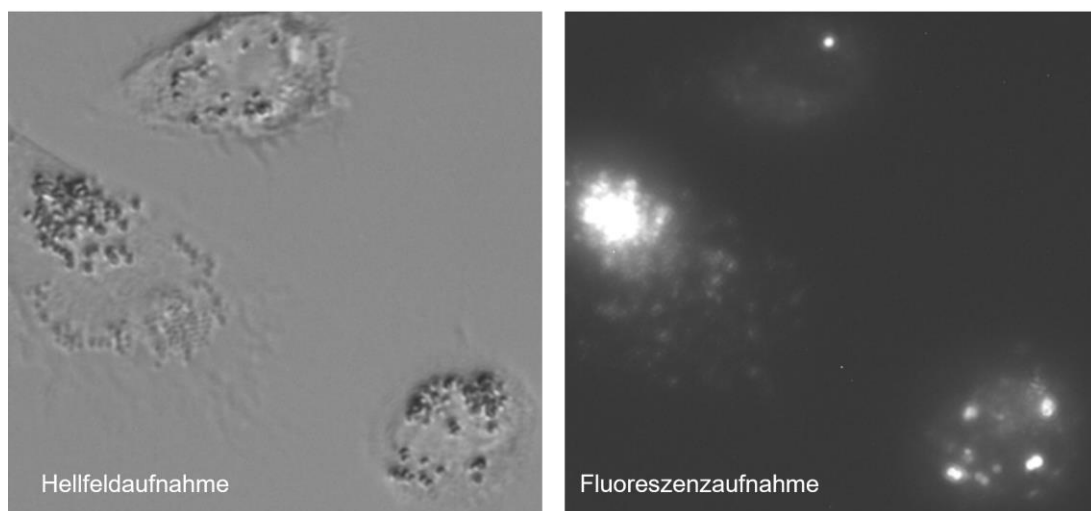


Abb. 2: Beurteilung der Detektierbarkeit phagozytierter pTau181 beladener Partikel (1 µm) im THP1-Zelllinien-Modell mit dem RCMIA-Demonstrator (Partikel zuvor angefärbt mit Antikörper PT1-26-Atto488)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es uns damit gelungen ist, ein geeignetes Modell für die experimentelle Evaluierung der optischen Instrumente zum einen und zum anderen für die prinzipielle

Eignung unserer Antikörper zu etablieren und zweckdienlich für die Projektaktivitäten des Verbundes anzuwenden. Die Entwicklungsziele wurden damit erreicht.

Die getesteten Antikörper wurden sukzessive an die am Verbundprojekt beteiligten Mitarbeiter am Uniklinikum Erlangen übergeben und kamen in den durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Identifizierung von phagozytierten Alzheimersignaturen in Blut- und Liquorproben zum Einsatz.

Die nächste Phase der Antikörperentwicklung befasste sich mit einem erweiterten Panel an potenziellen Neurodegenerationsmarkern, die mit den Partnern am Uniklinikum Erlangen abgestimmt wurde. Einige dieser Marker waren mit einer Synapsendysfunktion bzw. -degeneration assoziiert (z.B. Synaptophysin, Neurogranin). Weitere Marker betrafen post-translational modifizierte A β -Peptide (N-terminales Iso-Aspartat, bzw. Pyroglutamat) sowie das Saure Gliafaserprotein (GFAP) zum Nachweis einer Aktivierung von Astroglia. Des Weiteren wurde die Antikörperentwicklung für das alpha-Synuclein als künftige Option für eine Differenzialdiagnostik zur Parkinsonkrankheit und das Zelloberflächenprotein CD163 zur Beurteilung der verbleibenden phagozytotischen Aktivität der im Blut bzw. Liquor anzutreffenden Monozyten bzw. Makrophagen verfolgt.

Für die betreffenden molekularen Strukturen wurden zunächst geeignete Immunogen-Formulierungen entwickelt (AP1-INV05). Zwei Abschnitte des Synaptophysins, das Neurogranin, das alpha-Synuclein, das GFAP sowie das CD163 wurden aus rekombinanter Expression in E. coli bzw. HEK-Zellen und anschließender chromatographischer Reinigung gewonnen. Für die modifizierten A β -Strukturen wurden synthetische Peptide definiert. Die Peptidsequenzen wurden zusammen mit den benötigten Kontrollpeptiden über chemische Synthese erstellt und an das Trägerprotein Ovalbumin konjugiert. Die anschließende Maus-Immunisierung erbrachte aus dem gewonnenen Milzzellmaterial zunächst nur für ein Synaptophysin Immunogen und das CD163 Protein größere Klonausbeuten.

Etwa ein Jahr nach Projektbeginn mussten wir ein neues Labor für die laufenden Immunisierungsarbeiten beauftragen, da der kommerzielle Dienstleister, mit dem wir bis dahin für diese Aufgabe sehr erfolgreich zusammengearbeitet haben, seinen Betrieb unerwartet eingestellt hat.

Obwohl gemeinsam mit dem neuen Partner die Immunisierungsabläufe in dem externen Labor optimal an unseren Workflow angepasst wurden, mussten wir leider infolge dessen allgemein deutlich geringere Ausbeuten an Hybridomklonen nach erfolgter Fusion des neuen Milzzellmaterials feststellen. Dies betraf größtenteils die Antikörpererzeugung für die erweiterte Marker-Auswahl (AP1-INV06). Anhand der nachgewiesenen hohen spezifischen Antikörpertiter in den immunisierten Tieren zeigte sich für die meisten der von uns erzeugten Immunogene eine sehr gute Reaktivität. Somit wurden wiederholt Immunisierungen durchgeführt und sukzessive detaillierte Anpassungen am Protokoll der Hybridomzell-Erzeugung und an der für die Milzzellfusion verwendeten Myeloma-Linie vorgenommen. Da die Immunisierungsrunden üblicherweise ca. drei Monate in Anspruch nahmen, mussten wir dadurch eine erhebliche zeitliche Verzögerung im Fortschritt der Antikörperentwicklung des erweiterten Markerpanels in Kauf nehmen.

Resultierend daraus konnten nicht für alle verfolgten Marker bis zum Abschluss des Projekts eigene monoklonale Antikörperkollektionen angelegt werden. Für das Synaptophysin und das Oberflächenprotein CD163 ist es gelungen, Antikörperklone im gewünschten Umfang zu gewinnen. Zusätzlich konnte ein Antikörper mit spezifischer Erkennung des N-terminalen Pyroglutamats am Amyloid-Beta-Peptid etabliert werden.

Marker	verwendetes Immunogen	etablierte Hybridomklone
A β -Pyroglutamat	Peptid-Ovalbumin-Konjugat	1
Synaptophysin	rekombinantes Proteinfragment LVD-Domäne (E. coli)	24
CD163	Rekombinantes Protein (HEK Zellen)	13

Tab. 2: Zusammenfassung der kryokonservierten Hybridomklone mit zugehörigen gereinigten Antikörperproben, die zu den erweiterten Markern der Alzheimerkrankheit für die weiteren experimentellen Arbeiten angelegt werden konnten.

Die Antikörperentwicklung (Arbeitspakete AP1-INV01-INV06) ist damit insgesamt recht erfolgreich verlaufen, wenn auch aufgrund der oben beschriebenen Situation nicht für alle Marker des erweiterten Panels monoklonale Antikörper in der gewünschten Vielfalt hervorgebracht werden konnten.

Erfreulicherweise konnten die Partner in Erlangen auf Grundlage von zwei unserer pTau181 Antikörper vorläufige Ergebnisse erzielen, die ein erhöhtes Vorkommen des AD-Markers innerhalb der adressierten phagozytotisch aktiven Zellpopulation (CD14+/CD16) in Blutproben von Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollproben zeigen. Damit konnte der zur Projekthalbzeit anvisierte Meilenstein wie geplant erreicht werden.

Insgesamt wurden die mit dem umfangreichen Arbeitsabschnitt der Antikörperentwicklung verbundenen Ziele weitestgehend erreicht.

Im nächsten Arbeitsabschnitt (AP1-INV07) widmete sich unser Labor der Evaluierung des Modellaufbaus zu dem angestrebten Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer (RCMIA). Zunächst wurden THP-1 Zellpräparate mit fluoreszierenden Polymerpartikeln angefertigt und den Partnern in Münster für die Beurteilung der optischen Eigenschaften des vorläufigen instrumentellen Aufbaus überlassen. Mit diesen anwendungsnahen Proben ließ sich bestätigen, dass mit dem gewählten optomechanischen Konzept hervorragende Sensitivitäten und eine sehr gute optische Auflösung erzielt werden kann, die für die spätere differenzierte Erfassung der phagozytierten Epitope mehr als ausreichend ist (vergl. Abb. 1).

Nachdem uns ein erster RCMIA-Demonstrator zur Verfügung stand, wurde zunächst die Identifizierung der für EDIM-Analytik relevanten Zellen anhand der Immunfärbung der Oberflächenmarker CD14 und CD16 zeitnah umgesetzt. In der ersten Ausbaustufe des Demonstrators standen uns die optischen Kanäle für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und Phycoerythrin zur Verfügung. Mit diesen Kanälen ließen sich die beiden Differenzierungsmarker mit den Antikörpern der ImmunoTools GmbH ohne weiteres nachweisen. Die Aufnahmen erfolgten üblicherweise in Scanbereichen von 1x1 bis 5x5 Millimeter, um mehrere Zehntausend Zellen zu erfassen und damit eine ausreichende Zahl an seltenen CD14/CD16 positiven Zellen identifizieren zu können. Für die Erfassung weiterer (phagozytierter) Epitope an dem präparierten Zellmaterial wurde ein Photobleaching durchgeführt und das mikrofluidische Färbekonzept des RCMIA-Demonstrators bestehend aus Steuereinheit und Färbekammer evaluiert. Hierbei ließ sich die prinzipielle Eignung des Konzepts für die beabsichtigte Immunfärbung von Leukozyten bestätigen und eine erste Abschätzung für den anzusetzenden zeitlichen Umfang für Färbung, Bildakquise und Photobleaching anhand anwendungsnaher Probensituationen vornehmen.

AP5: Entwicklung Blut-basierte Demenz-Diagnostik mittels RCMIA-Instrument

AP5-INV01 Etablierung Nachweis phagozytierter Demenzmarker beim Partner UKE

Unserem Partner am Uniklinikum Erlangen kam die Aufgabe zu, Untersuchungen zur Nachweisbarkeit phagozytierter Demenzmarker an Patientenmaterial (Blut und Liquor) durchzuführen. Da dort vor der Etablierung der Markerdetektion über das RCMIA-Instrument nur sehr eingeschränkt Möglichkeit bestand, diese Untersuchungen an einem Fluoreszenzmikroskop durchzuführen, wurden die entsprechenden Immunfärbungen zunächst per Durchflusszytometer analysiert. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass über diesen Zugang keine differenzierte Betrachtung der subzellulären Verteilung der Fluoreszenzsignale möglich ist und damit Hintergrundsignale z.B. durch unspezifische Antikörperbindung an der Zelloberfläche nicht von den tatsächlich aus den phagozytierten Epitopen resultierenden Signalen unterschieden werden können. Auf der anderen Seite birgt die sehr leistungsfähige Durchflusszytometrie hohes Potenzial für einen späteren routinemäßigen Einsatz, wenn sich damit, ungeachtet dieser Einschränkung, für die adressierten Alzheimermarker Signale erfassen ließen, die mit den Werten der derzeit praktizierten Verfahren insbesondere der laborchemischen Liquoruntersuchung korrelieren.

Sobald unsere Antikörperdetektoren für phosphoTau, die A β -Peptide und die synaptischen Marker etabliert und im Testansatz evaluiert waren, wurden diese den Partnern in Erlangen zugesandt. Zusätzlich wurde das in unserem Labor etablierte optimierte Protokoll für die durchflusszytometrische Epitopdetektion in Makrophagen (EDIM) inklusive der für die Zelldiskriminierung benötigten Antikörper der ImmunoTools GmbH an das Labor in Erlangen transferiert. Die Untersuchungen in Erlangen wurden von uns durch die Computer-gestützte Auswertung der EDIM-Untersuchungsdaten begleitet, die wir zuvor für ein anderes Projekt zum Einsatz des EDIM-Verfahrens für die spezifische Tumordetektion etabliert hatten.

Die Kollegen in Erlangen konnten in einer ersten kleineren Versuchsreihe mit unseren Antikörpern bereits Ergebnisse erhalten, die auf in der Monozyten/Makrophagenpopulation des Blutes feststellbare erhöhte Werte des Markers phospho-Tau181 in den Proben von Alzheimerpatienten hindeuten (vergl. Ausführungen des Verbundpartners).

Diese Ergebnisse konnten zwischenzeitlich nicht reproduziert werden, eventuell bedingt durch den Umstand, dass in den vorläufigen Versuchsreihen verschiedene Chargen der fluoreszenzmarkierten Antikörper zum Einsatz kamen. Infolgedessen wurden in unserem Labor größere Chargen der phospho-Tau181 Antikörper erstellt und umfassend charakterisiert.

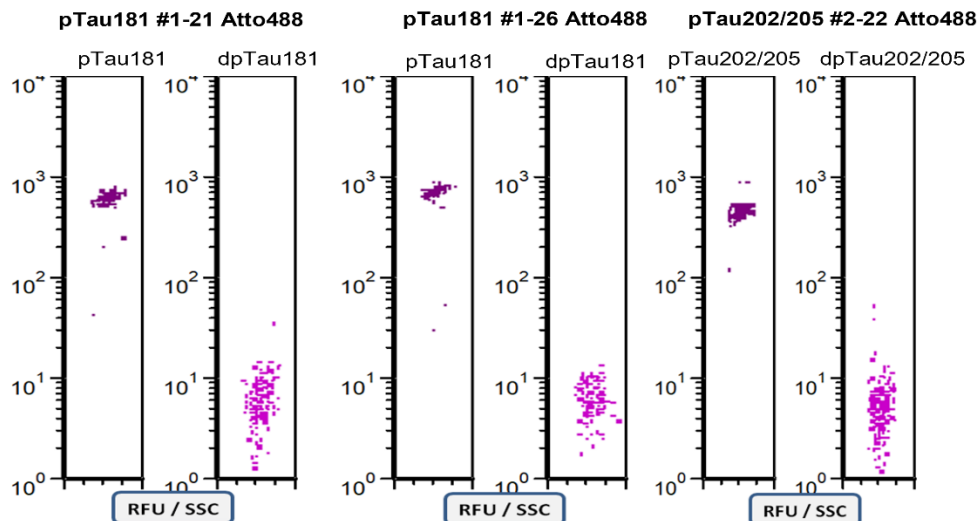


Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse zur Phosphospezifität der dem UKE bereitgestellten phospho-Tau Antikörper Die betreffenden Atto488 markierten Antikörper wurden mit Polymerpartikeln mit aufgebrachtem phosphorylierten (p) bzw. dephosphorylierten (dp) Tau-Peptiden reagiert und die resultierenden Fluoreszenzsignale im Durchflusszytometer analysiert

Außerdem erfolgte mit dem Partner in Erlangen eine detaillierte Überarbeitung des Fixierungs- und Färbeprotokolls. Zusätzlich wurden weitere Optimierungen an der Computer-gestützten Auswertung vorgenommen. Schließlich zeigte sich in einer weiteren kleinen Untersuchungsreihe eine Korrelation der in der durchflusszytometrischen EDIM-Analytik im Blut gemessenen phospho-Tau181 Werte zu den im Rahmen der Routine-Demenzdiagnostik ermittelten phospho-Tau181-Werten im Liquor:

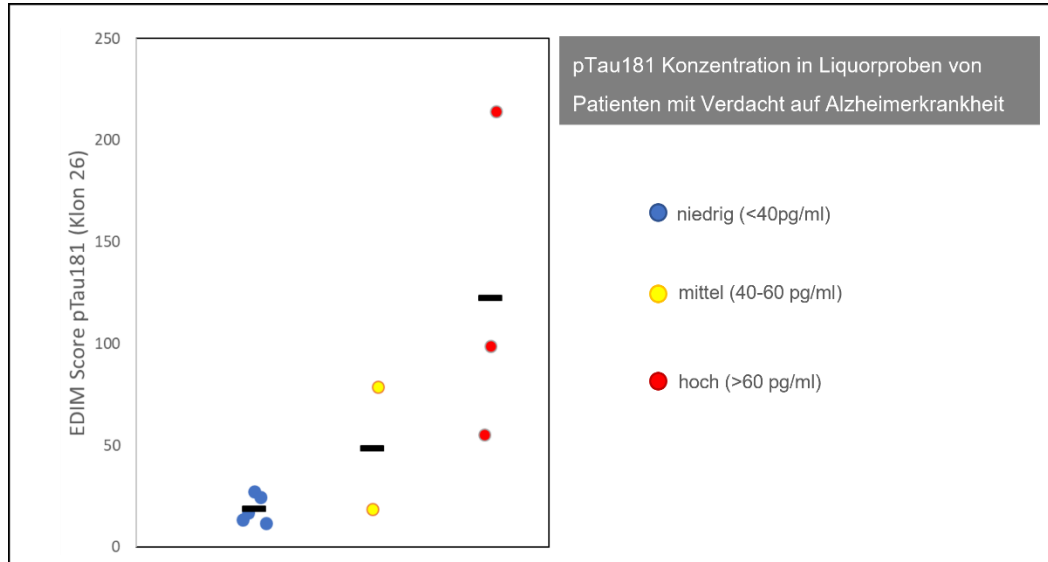


Abb. 4: Ergebnisse der durchflusszytometrische EDIM Analyse an Blutproben zum Alzheimermarker pTau181 nach erfolgter Überarbeitung des Färbeprotokolls und der Computer-gestützten Auswertung Die Proben der Untersuchung wurden entsprechend der gängigen Kriterien für eine Beurteilung einer Taupathie aus laborchemischen Liquoruntersuchung in niedrige bis keine (<40 pg/ml pTau im Liquor), mittlere (40-60 pg/ml pTau im Liquor) und hohe Ausprägung (>60 pg/ml pTau im Liquor) gruppiert

Im Ergebnis dieses Arbeitspakets lässt sich festhalten, dass es anhand des validierten Alzheimermarkers phospho-Tau181 gelungen ist, eine erste experimentelle Bestätigung dafür zu erhalten, dass sich über Makrophagen des Blutes molekulare Signaturen einer Alzheimerkrankheit

nachweisen lassen. Die über die Epitopdetektion in Makrophagen erhaltenen pTau-Werte korrelierten näherungsweise mit den im Liquor nachweisbaren Werten des Markers. Einschränkend gilt es zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um eine sehr kleine Versuchsreihe handelt und umfangreichere Untersuchungen an Patientenproben notwendig sind, um die zugrundeliegende Datenbasis zu konsolidieren.

Bei den Untersuchungen zu den A β -Peptid-Markern konnten auch unter Einbezug der von uns entwickelten Antikörper bis zum Projektende keine Ergebnisse erzielt werden, mit denen sich die Werte aus der durchflusszytometrischen EDIM-Analytik plausibel mit dem in der Routinediagnostik (Liquor Laborchemie, klinische Anamnese und Bildgebung) festgestellten Alzheimer-Status korrelieren ließen. Dies könnte in der komplexeren Situation der Beta-Amyloid-Strukturen begründet sein verbunden mit der Annahme, dass nicht alle A β -Peptid-spezifischen Antikörper in der Lage sind, aggregiertes, bzw. fibrilläres Amyloidmaterial zu detektieren.

AP5-INV02 Translation der chemisch-biologischen Detektionsprinzipien auf das bildgebende Verfahren des RCMIA-Systems

Die Arbeiten zu diesem Arbeitspaket konnten an den vielversprechenden Ergebnissen des Verbundpartners aus den durchflusszytometrischen EDIM-Untersuchungen zu dem Marker pTau181 anknüpfen. Des Weiteren wurde die Detektion des synaptischen Markers Neurogranin verfolgt, für den sich in der ersten Versuchsreihe der Kollegen in Erlangen ebenso erhöhte Werte in den Blutproben von Alzheimerpatienten gezeigt haben.

Die bildgebende Erfassung phagozytierter Epitope sollte primär für Blutproben etabliert werden. Ein zweiter Projektzweig bestand in der Implementierung der EDIM-Untersuchung an aus dem Liquor gewonnenen Zellen, von der man sich nähere Aufschlüsse über die im Hirn ablaufenden Alzheimer-assoziierten Prozesse unter Beteiligung des Immunsystems erhofft hatte.

Bei den experimentellen Untersuchungen zu den Immunfärbe-Sequenzen unter Anwendung der mikrofluidischen Komponenten wurden zwei Fehlerquellen identifiziert, die einer routinemäßigen Umsetzung im Weg standen. So kam es bei der ersten Ausführung der fluidischen Färbekammern nach längerem Kontakt mit den Färbereagenzien zu einer Verformung. Damit war das präzise Abschließen des Fluidikanschlusses an der Kammer und die Stabilität der Fokusebene des mikroskopischen Objekts nicht mehr gegeben. Durch eine umfassende Überarbeitung der Färbekammer mit neuer Materialwahl und konstruktiver Ausführung von Kammer und Adapter konnten die Kollegen der ImmunoTools GmbH und der Quantum Analysis GmbH zu einer geeigneten neuen Abstimmung gelangen.

Eine weitere Einschränkung bestand im häufigen Auftreten von Lufteinschlüssen nach der Beschickung der Kammern mit Puffer bzw. Färbereagenzien. Hierzu mussten zunächst komplexe Anpassungen an der Kammergeometrie und den fluidischen Eigenschaften des Puffers vorgenommen werden. Nach umfangreicher Erprobung verschiedener modifizierender Zusätze konnten wir schließlich eine geeignete Pufferzusammensetzung identifizieren, mit der sich die Immunfärbungen mit den betreffenden Antikörpern in einer neuen Kammergeometrie uneingeschränkt durchführen lassen und mit der mehrere Färbezyklen mit hoher Zuverlässigkeit durchführbar sind.

Umsetzung der bildgebenden EDIM-Analytik an Blutproben:

Mit den vom Partner ImmunoTools etablierten Protokoll zur Anreicherung und Anheftung von Monozyten auf Glasträgern konnten uneingeschränkt Immunfärbungen im neu abgestimmten RCMIA-Demonstrator durchgeführt werden. Nach mehreren Färbezyklen war der Verlust einiger Zellen insbesondere nach Anwendung der für die intrazellulären Färbungen benötigten

Permeabilisierungsreagenzien festzustellen, die jedoch durch eine Anpassung des Fixierungsprotokolls deutlich verringert werden konnten. Gleichzeitig war es mit den entwickelten Software-Werkzeugen der ImmunoTools GmbH ohne weiteres möglich, identifizierte Zellereignisse, die nach dem letzten Färbeschritt nicht mehr nachweisbar waren, von der Auswertung auszuschließen. Die Detektion von phagozytierten Markern der Neurodegeneration einschließlich der Diskriminierung zu unspezifischen Färbereignissen konnte schließlich demonstriert werden.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis aus einer Sechsfach-Färbung nach erfolgreicher Implementierung der neu abgestimmten mikrofluidischen Komponenten. Intrazellulär vorliegendes (phagozytiertes) Neurogranin in den CD14/CD16 positiven Zellen ist in der vorliegenden mikroskopischen Aufnahme gut von unspezifischen Färbesignalen des Neurogranin-Antikörpers an der Zelloberfläche diskriminierbar.

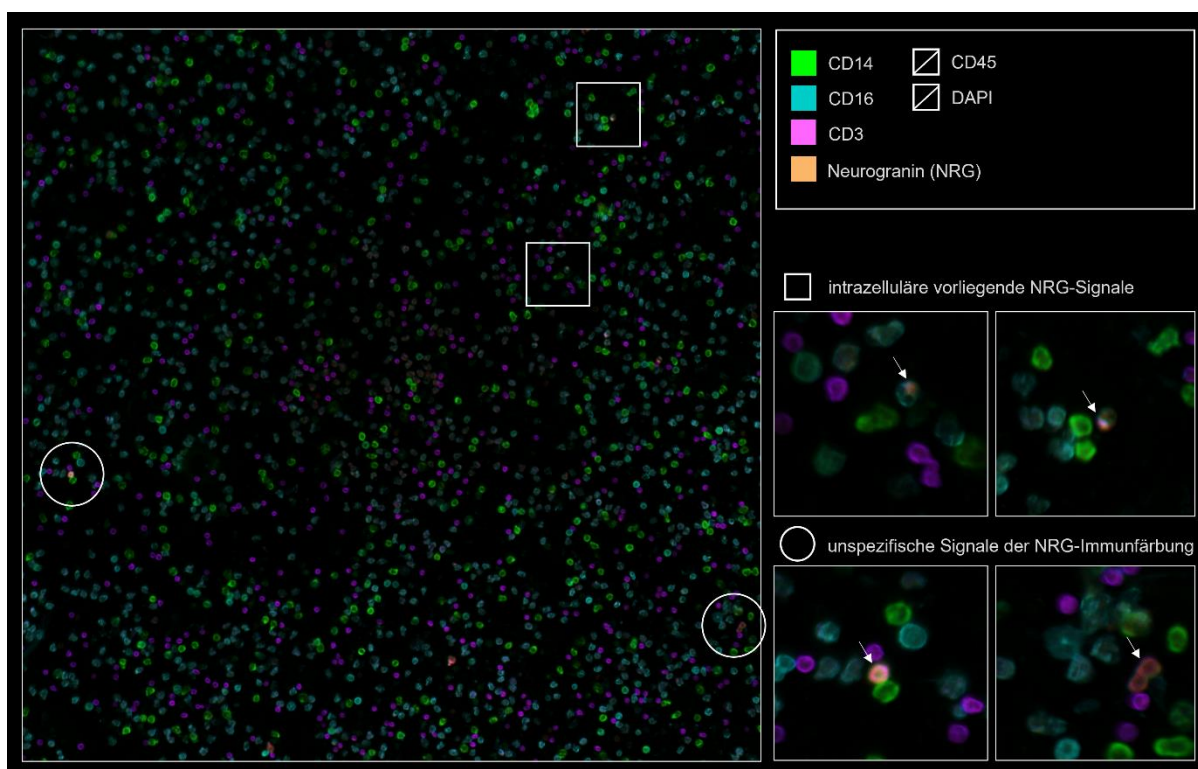


Abb. 5: 4-fach Bildstapel aus einer wiederholten 1x1 mm mikroskopischen Abtastung während einer sequenziellen 6-fach Färbung der Leukozyten einer Blutprobe (AD-Patient) zur Erfassung CD14/CD16 positiver Zellen sowie intrazellulär vorliegendem Neurogranin-Material

Etablierung der bildgebenden EDIM-Analytik an Liquorzellen

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen des Liquors gestaltete sich aufgrund der ihnen innewohnenden Eigenschaften deutlich schwieriger. Anknüpfend an die erfolgreiche Anreicherung der seltenen Liquorzellen auf den Glaträgern durch die Verbundpartner bestand unsere Aufgabe darin, eine geeignete Abstimmung für die Zellanheftung und Immunfärbung zu finden. Mit dem für die Leukozyten des Blutes etablierten Fixierungsprotokoll war bei dem Liquorzellmaterial keine ausreichende Anheftung an die silanisierten Glaträger gegeben, um die mikrofluidische Färbung in den Färbekammern erfolgreich durchzuführen. Aus den Versuchsreihen mit kombinierter Formaldehyd- und Methanol/Aceton-Fixierung wurde schließlich eine optimale Abstimmung gefunden, die eine ausreichend starke Zellfixierung gewährleistet und gleichzeitig die Integrität der

Zellstrukturen und die Antikörperbindung an die adressierten Epitope in ausreichendem Ausmaß erhält.

Die Färbung von intrazellulär vorliegendem (phagozytiertem) pTau181 in den Liquorzellen von Alzheimerpatienten konnte zum Projektende anhand einiger Proben demonstriert werden. Dabei waren die detektierbaren pTau181 Signale nicht besonders stark ausgeprägt, was den Ergebnissen der zuvor durchgeführten durchflusszytometrischen Analyse der korrespondierenden Blutproben entsprach. Die von den detektierten pTau181 Epitopen resultierenden Fluoreszenzsignale lagen überwiegend in den Zellbereichen, die dem Phagolysosom zuzuordnen sind (Nachweis durch Anfärbung des Markers LAMP2).

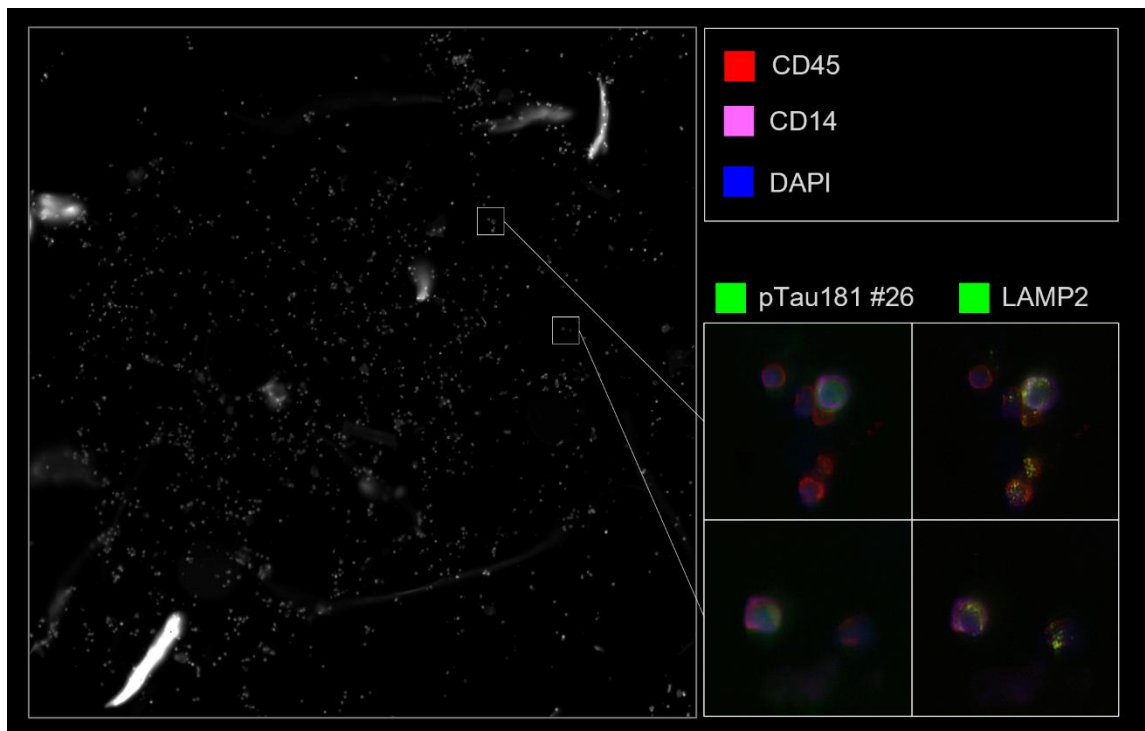


Abb. 6: 4-fach Bildstapel aus einer wiederholten 2x2 mm mikroskopischen Abtastung während einer sequenziellen 6-fach Färbung der angereicherten Zellen einer Liquorprobe zur Erfassung CD14/CD16 positiver Zellen sowie intrazellulär vorliegendem phospho-Tau181 Epitop

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass anhand einiger Proben der Nachweis phagozytierter Epitope der Alzheimerkrankheit bzw. Neurodegeneration in Blut- und Liquorproben über den mit den Verbundpartnern erarbeiteten Ansatz erfolgreich demonstriert werden konnte. Aufgrund einiger zeitlicher Verzögerungen, die im Projektfortschritt bei uns und den Verbundpartnern auch bedingt durch die Corona-Pandemie aufgetreten sind, konnten bis zum Projektende nur einige wenige Proben der mikroskopischen Analyse in der finalen Abstimmung des RCMIA-Instruments zugeführt werden. Die Untersuchungen werden von uns in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Erlangen nach Ablauf der Förderung fortgeführt, um eine bessere Bewertung auf Grundlage einer solideren Datenbasis vornehmen zu können.

AP6: Optimierte Auslegung des Procederes für die künftige Blut/Liquor-Diagnostik

Für die weiteren Entwicklungs- und Verwertungsschritte wurden zu den erarbeiteten Verfahren SOPs angelegt und die Reproduzierbarkeit und Plausibilität der Protokolle durch mindestens zwei Operatoren geprüft.

AP6-INV01 Standardisierung der Herstellungswege für die Antikörperreagenzien

Für die benötigten Antikörperkomponenten wurden gut charakterisierte und gleichzeitig kostensparende Herstellungswege erarbeitet, mit denen sie sich zuverlässig und wirtschaftlich nachproduzieren lassen. Damit ist eine gute Grundlage für die weiteren Verwertungsschritte gegeben.

AP6-INV02 Standardisierung des diagnostischen Verfahrens

Betreffend der Standardisierung des anvisierten diagnostischen Verfahrens wurden im Rahmen des Projektes wertvolle Informationen über die qualitätsbestimmenden Eigenschaften der Antikörperdetektoren gewonnen und entsprechende Methoden zur Prüfung allgemeiner Qualitätskriterien und spezifischer Funktionseigenschaften implementiert. Hierfür wurden ebenfalls SOPs angelegt, um künftig in der Lage zu sein, für die betreffenden Antikörperreagenzien verlässlich qualitativ hochwertige Nachpräparationen für die spezifische Verwendung zur Detektion intrazellulär vorliegender Epitope innerhalb der EDIM-Analytik anzufertigen.

2.) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die für das Projekt bereitgestellten Mittel wurden sparsam und zweckgemäß eingesetzt. Die Verwendung erfolgte weitestgehend nach der ursprünglichen Planung.

Der gesamten Selbstkosten des Vorhabens beliefen sich schließlich auf 528.410,42 EUR und lagen damit knapp 20.000 EUR über dem ursprünglich vorgesehenen Budget. Die nachgewiesenen Mehrkosten für das Projekt wurden komplett vom Zuwendungsempfänger getragen.

Personal:

Für das Projekt wurden ausschließlich wissenschaftliche Mitarbeiter eingesetzt. Alle eingeplanten Mitarbeiter standen zum Projektbeginn zur Verfügung. In den Jahren 2021 und 2022 sind zwei am Projekt beteiligte Mitarbeiter aus unserem Unternehmen ausgeschieden. Daraufhin wurden Anfang 2023 zwei adäquat qualifizierte wissenschaftliche Mitarbeiter eingestellt und zum überwiegenden Teil mit den Aufgaben des Teilprojektes betraut. Die Summe der projektbezogenen Personalkosten lag mit 459.112,17 EUR etwa 20.000 EUR über dem ursprünglich geplanten Kostenrahmen. Überwiegend war dies durch zusätzliche umfangreiche Etablierungsarbeiten in der monoklonalen Antikörperentwicklung begründet, die mit der notwendig gewordenen Änderung bei den Immunisierungsarbeiten verbunden waren.

Verbrauchsmaterial:

Die Verwendung der Verbrauchsmittel geschah weitestgehend wie in der ursprünglichen Kostenplanung vorgesehen. Insgesamt wurden für das Projekt 46.254,39 EUR an Materialkosten eingesetzt. Die Kosten für Verbrauchsmaterial lagen etwa 2.500 EUR unter dem ursprünglich geplanten Umfang.

Reisemittel:

Durch die mit der Corona-Pandemie einhergehenden Veränderungen fanden alle Verbundtreffen im online-Format statt. Hieraus resultierten einige Einsparungen bei den Reisekosten. Zur detaillierten experimentellen Abstimmung der entwickelten Funktionalitäten des RCMIA-Instruments und zur methodischen Abstimmung der durchflusszytometrischen und Mikroskop-gestützten Immunfärbungen haben die am Projekt beteiligten Mitarbeiter der INVIGATE GmbH insgesamt sieben Reisen zu den Partnern Quantum Analysis und Cytecs in Münster und zu den Kollegen am Uniklinikum

Erlangen unternommen. Die für das Projekt aufgewendeten Reisekosten von 1.312,80 EUR lagen um etwa 600 EUR niedriger als ursprünglich geplant.

sonstige unmittelbare Vorhabenskosten:

Sonstige unmittelbare Vorhabenskosten sind zum geringen Teil für den Versand von Probenmaterial und Peptidsyntheseleistungen weit überwiegend jedoch für externe Dienstleistungen zur Immunisierung von Mäusen angefallen. Zunächst konnte hierfür ein qualifiziertes Labor beauftragt werden, mit dem unser Unternehmen seit einigen Jahren bereits sehr erfolgreich zusammengearbeitet hat. Später musste aus den o.g. Gründen ein neuer Dienstleister beauftragt werden. Aus den dadurch notwendig gewordenen zusätzlichen Etablierungsarbeiten resultierten neben der zeitlichen Verzögerung auch einige Mehrkosten. Gleichzeitig sind mit dem Wechsel die Kosten pro Immunisierungsrunde erheblich gestiegen. Der Gesamtaufwand bei den sonstigen unmittelbaren Vorhabenskosten belief sich auf 21.731,06 EUR und lag damit mehr als 2.000 EUR über dem ursprünglich veranschlagten Budget.

3.) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Innerhalb des Verbundvorhabens „NADIM“ wurde die Epitopdetektion in Makrophagen (EDIM) erstmals verfolgt, um Demenz-assoziierte molekulare Marker im Blut zu erfassen. Im Vorfeld gab es keinen Beleg dafür, dass die bisher im Fokus stehenden Marker in diagnostisch verwertbarer Ausprägung in phagozytierenden Zellen nachweisbar sind. Es mussten erhebliche konzeptionelle Risiken in Betracht gezogen werden wie zum Beispiel eine unzureichende Zugänglichkeit der im Hirn lokalisierten Alzheimer-assoziierten Strukturen für die im Blut nachweisbaren Monozyten/Makrophagen oder mögliche strukturelle Veränderungen der adressierten Marker durch eventuell ablaufende intrazelluläre Prozessierung, welche den Nachweis erheblich erschweren könnte.

Für die Umsetzung des Vorhabens waren wir insbesondere auf die Kooperation mit dem Uniklinikum Erlangen angewiesen, welches uns sowohl bei der detaillierten Auslegung der Demenz-assoziierten molekularen Strukturen im Zuge der Antikörper-Entwicklung und mit dem dort vorhandenen methodischen Knowhow zu dem THP-1 Phagozytose-Modell unterstützte.

Der Hauptteil der Projektaktivitäten konzentrierte sich auf die Etablierung einer größeren Zahl an monoklonalen Antikörpern für molekulare Marker der Alzheimerkrankheit. Wie sich am Beispiel der phospho-Tau Antikörper herausgestellt hat, war dieser Weg sowohl notwendig als auch zielführend - aus einer größeren Kollektion an monoklonalen Antikörpern, die allesamt das entsprechende phospho-Tau Motiv im herkömmlichen Festphasen-Immunoassay spezifisch binden konnten, gingen schließlich nur zwei Antikörper hervor, die besonders ausgeprägte und spezifische Signale im Kontext des Phagozytosemodells lieferten. Diese beiden Antikörper ermöglichten in den anschließenden experimentellen Arbeiten die erfolgreiche intrazelluläre Detektion des phospho-Tau181-Epitops in Leukozyten aus Blut- und Liquorproben.

Die Zusammenarbeit mit den Verbundpartnern in Münster und Jena lieferte ein speziell ausgelegtes mikroskopoptisches System (Rare Cell Multiprobe Imaging Analyzer [RCMIA]), auf dessen Grundlage das Verfahren zur bildgebenden Erfassung phagozytierter Demenzmarker in seltenen Zellen des Blutes bzw. des Liquors entwickelt werden konnte. Für die erfolgreiche Umsetzung dieses anspruchsvollen Vorhabens waren somit signifikante Beiträge aller am Projekt beteiligten Partner erforderlich.

Die wesentlichen Zielstellungen des Antrags wurden weitestgehend erreicht. An einigen Stellen, wie zum Beispiel die Verbesserung der Mikrofluidik-gestützten Immunfärbung, mussten etwas intensivere experimentelle Arbeiten unternommen werden als ursprünglich im Antrag eingeplant waren.

Letztendlich ist es dadurch gelungen, die noch bestehenden Hindernisse für das Erreichen der Projektziele zu überwinden.

4.) Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses

Die für uns wesentlichsten Entwicklungsergebnisse aus dem erfolgreich abgeschlossenen Teilvorhaben sind die erarbeiteten Antikörperdetektoren für die im Bericht erwähnten molekularen Neurodegenerationsmarker sowie die erhaltenen vorläufigen Daten, die auf eine prinzipielle Nachweisbarkeit phagozytierter Marker der Alzheimerkrankheit in Makrophagen des Blutes hindeuten. Auch wenn die Datenlage durch weitere Testungen an klinischen Proben noch weiter ausgebaut werden muss, um die Ergebnisse zu bestätigen, beurteilen wir mit dem erreichten Stand die Erfolgsaussichten der neuen Strategie für einen vereinfachten diagnostischen Test zu einer sich entwickelnden Alzheimerkrankheit sehr positiv. Hierbei gilt zu erwähnen, dass sich einige der untersuchten Patienten, deren Blutproben in die Untersuchungen eingeflossen sind, noch im Anfangsstadium der Erkrankung, mit teils minimalen kognitiven Einschränkungen befanden.

Mit den etablierten EDIM-gängigen Antikörpern insbesondere gegen phospho-Tau181 und den optimierten Protokollen zur Immunfärbung liegen nun sehr günstige Voraussetzungen für die wissenschaftlich/technische Anschlussfähigkeit vor. Für einige Monate werden die experimentellen Untersuchungen gemeinsam mit dem Uniklinikum Erlangen über die Förderperiode hinaus fortgeführt, um die vielversprechenden Ergebnisse abzusichern, weitere molekulare Signaturen u.a. mit den erst zum Projektende zur Verfügung stehenden Antikörpern zu adressieren und damit die nächste Entwicklungsphase zu einem standardisierten diagnostischen Testverfahren mit gut charakterisierter Sensitivität und Spezifität vorzubereiten. Sollten wir mittelfristig zu einem marktreifen diagnostischen Test gemeinsam mit dem Uniklinikum Erlangen und der ImmunoTools GmbH und ggf. weiterer Partnern gelangen, würden sich hieraus für die INVIGATE GmbH als Zulieferer der Nachweisreagenzien weitreichende Verwertungsperspektiven ergeben, die insbesondere mittel- und langfristig mit außerordentlich hohen Umsätzen verbunden sein sollten. Ein in dieser Form erstmals verfügbarer routinetauglicher Blut-basierter Frühtest für die Alzheimer Krankheit böte einen enormen Innovationsvorsprung und Wettbewerbsvorteil. Als mögliche Vorsorgeuntersuchung im fortgeschrittenen Alter (ab 50. Lebensjahr) würde sich das diagnostische Angebot gleichzeitig an einen sehr weiten Personenkreis richten.

Kürzlich ist es uns in Kooperation mit der ImmunoTools GmbH gelungen, die ersten von der INVIGATE GmbH entwickelten Antikörper für einen in der fortgeschrittenen Etablierung befindlichen EDIM-basierten diagnostischen Test im Bereich gastrointestinaler Entzündungen kommerziell zu veräußern. Wir sind sehr zuversichtlich, dass diesem Beispiel weitere Transfers folgen werden und wir auch mit dem umfangreichen Knowhow-Gewinn im Rahmen des NADIM-Projektes bezüglich der Antikörperentwicklung und der EDIM-Analytik die Rolle als Zulieferer maßgeschneiderter Detektionsreagenzien für neue diagnostische Lösungen einnehmen können. Um das Konzept der Epitopdetektion in Makrophagen im Kontext unterschiedlichster medizinischer Fragestellungen weiter zu verfolgen, wurden unter der Federführung der ImmunoTools GmbH im ersten Halbjahr dieses Jahres etwa zwanzig Kooperation mit renommierten Labors auf europäischer Ebene initiiert. Hiervon versprechen wir uns sehr wertvolle Impulse im Hinblick auf neue Einsatzgebiete dieses diagnostischen Konzepts und auf den Ausbau unseres Netzwerks aus einflussreichen wissenschaftlichen Partnern und potenziellen Kunden für unser Reagenziengeschäft.

Ein weiteres relevantes Entwicklungsergebnis mit unabhängigen Verwertungsperspektiven besteht in der erfolgreich etablierten, automatisierbaren mikrofluidischen Mehrfachfärbung auf Grundlage des RCMA-Instruments. Die besonderen Optionen und Leistungseigenschaften, die das erarbeitete

Konzept für die Multiparameter-Untersuchung seltener Zellen bietet, und die überaus günstige Kostenstruktur, die mit der optomechanischen Konstruktion und den beteiligten mikrofluidischen Komponenten erreicht werden kann, heben sich signifikant von den derzeit verfügbaren Lösungen ab. Wir planen, das Konzept noch in diesem Jahr potenziellen Anwendern und Kooperationspartnern in der biomedizinischen Forschung vorzustellen, um die Multi-epitop-Untersuchung mit dem RCMA-Instrument als neues Untersuchungswerkzeug auf dem Markt zu etablieren und uns gleichzeitig mit der erworbenen technologischen Kompetenz innerhalb weiterer Forschungsverbünde zu positionieren. Relevante Anwendungssituationen sehen wir insbesondere dort, wo nur eine begrenzte Zahl an Zellen für Untersuchungen zugänglich ist, wie z.B. im Liquor, Urin, in Bronchialveolärer Lavageflüssigkeit oder auch in Peritonealflüssigkeit. Die im Verbund erarbeiteten Möglichkeiten zur Konservierung der Zellen in den anwendungsfreundlichen Färbekammern, zur optischen Abtastung großer Scanbereiche und zur Erfassung Computer-gestützten Auswertung einer größeren Zahl an Epitopen bieten diesbezüglich entscheidende Vorteile.

5.) Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Uns sind bis jetzt keine Ergebnisse seitens Dritter bekannt geworden, die den wissenschaftlich/technischen Erfolgchancen des Vorhabens im Wege stehen. Eine 2020 erschienene Arbeit von van den Bossche et al. [1] beschreibt den Nachweis phagozytierter Marker der Neurodegeneration innerhalb der von uns adressierten Leukozytenpopulation in Blutproben von Patienten mit Hirntumor bzw. nach Schlaganfall. Die darin vorgestellten Ergebnisse bestätigen unserer Ansicht nach die guten Chancen, die mit dem von uns verfolgten Konzept für die blutbasierte Erfassung neurodegenerativer Veränderungen im Kontext der Alzheimerkrankheit gegeben sind.

6.) Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Projektergebnisse

Bisher sind noch keine Veröffentlichungen zu den Projektergebnissen erfolgt. Es laufen noch einige experimentelle Arbeiten, um die vorläufigen Ergebnisse zum Nachweis Alzheimer-assoziiertes molekulare Signaturen über die Epitop-Detektion in Makrophagen des Blutes zu bestätigen. Sobald hierzu eine ausreichende Datenbasis vorliegt, wird eine wissenschaftliche Veröffentlichung der Projektergebnisse angestrebt.

Darüber hinaus streben wir eine Veröffentlichung zur Demonstration der neu geschaffenen Möglichkeiten bezüglich Anreicherung und umfassender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung von Zellen des Liquors mit Hilfe des RCMA-Instruments an.

Jena, 01.08.2024

Dr. Sebastian Krause
Projektleitung INVIGATE GmbH

Referenzen:

[1] Monocytes carrying GFAP detect glioma, brain metastasis and ischaemic stroke, and predict glioblastoma survival Van den Bossche et al., Brain Commun. 2020 Dec 26;3(1)