

Teil I des Schlussberichts (Kurzbericht)

„nanodiag BW: P3: Digitaler Nanoporen-Sequenzierer & Marker 'Interactom Profiler“

Projektpartner: Actome GmbH / PICO BioScience GmbH
Förderkennzeichen: 03ZU1208CB_7B)

Berichtszeitraum: 01.03.2023 – 31.08.2025 (vorzeitig terminiert)

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung und Ausgangslage

Das Vorhaben verfolgte eine zweigleisige Strategie zur Stärkung der wissenschaftlich-technologischen Basis für innovative Diagnostikverfahren in Baden-Württemberg:

- **Technologische Exzellenz:** Entwicklung eines digitalen Nanoporen-Sequenzierers mit extrem hoher Sensitivität und Skalierbarkeit.
- **Klinische Anschlussfähigkeit:** Wissenschaftliche Validierung epigenetischer Markerprofile zur Vorbereitung der Translation in die klinische Anwendung.

Angeknüpft wurde an die bestehenden, bereits geschützten **PICO-Technologien** der Actome GmbH. Ziel war die Schaffung eines technologisch hochsensitiven Bausteins (PICO-Referenzassay), der als zentrale Grundlage für zukünftige digitale molekulare Diagnostikverfahren dienen sollte.

2. Ablauf des Vorhabens

Das Projekt gliederte sich in mehrere Arbeitspakete (AP), die im Kern die Entwicklung und Validierung des PICO-Assays sowie die Vorbereitung der Nanoporen-Auslesung umfassten:

- **Etablierung des PICO-Referenzassays (AP1):** Es wurde ein isothermer PICO-Assay basierend auf dem HER2-System als Referenz etabliert. Hierbei wurde die Detektion mithilfe von drei unabhängigen Antikörperpaaren abgesichert. Eine große Auswahl an Antikörpern für verschiedene Zielmoleküle (Tags, Her2, Her3, Histone) wurde entwickelt und charakterisiert.
- **Optimierung und Validierung (AP3):** Der Assay wurde hinsichtlich **Sensitivität und Spezifität** detailliert bewertet.
 - Die **Linearität** des Assays erstreckte sich über vier Größenordnungen ($R^2 > 0,95$).
 - Die **Nachweisgrenze (LOD)** für das HER2-Referenzsystem lag im hochsensitiven Bereich (ca. 3 pM).
 - Ein Schwerpunkt war die Validierung der **H3 K27M-Mutation**, eines wichtigen Markers für aggressive Hirntumore.
 - Erste Versuche zur Detektion von Histonen im Zelllysate zeigten Herausforderungen in der Zugänglichkeit der Antikörper-Bindungsstellen (Epitope), die durch partielle Denaturierung der Proben teilweise gelöst werden konnten.
- **Systemintegration (AP4):** Die modulare Systemintegration und die bioinformatische

Auswertung der Next-Generation-Sequencing (NGS)-Analysen wurden vorbereitet, konnten jedoch aufgrund der vorzeitigen Beendigung nicht vollständig abgeschlossen werden. Dennoch konnte die **Machbarkeit** des PICO-Assays durch die erfolgreiche Anwendung auf klinisch relevante Matrices (Liquid Biopsy) unter Beweis gestellt werden.

3. Wesentliche Ergebnisse

Trotz der erschwerenden Umstände durch die Insolvenz der Actome GmbH ab Juni 2025 wurden die zentralen wissenschaftlich-technischen Kernziele erreicht und dokumentiert.

Wissenschaftliche und Technologische Errungenschaften

- **PICO-Referenzassay:** Bereitstellung eines technologisch hochsensitiven Assays als zentrale Grundlage für zukünftige molekulare Diagnostikverfahren.
- **Detektion epigenetischer Marker:** Erfolgreiche Etablierung der Detektion von Histonmodifikationen, insbesondere der H3 K27M-Mutation. Dies schafft neue diagnostische Möglichkeiten für schwer behandelbare Tumorentitäten und trägt unmittelbar zur **personalisierten Medizin** bei.
- **Vorbereitung für Nanoporen-Readout:** Die Anpassung der Oligonukleotide an die Nanoporen-Auslesung wurde abgeschlossen und bildet eine belastbare Grundlage für weiterführende Arbeiten.

4. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Das Vorhaben wurde in enger Kooperation mit den Projektpartnern aus **Forschung und Industrie** durchgeführt, wodurch die regionale Kooperationslandschaft gefestigt wurde. Alle wesentlichen Ergebnisse wurden dem Konsortium übergeben und können in entsprechenden Workshops und klinischen Arbeitsgruppen weiter diskutiert und genutzt werden.

Eine ursprünglich geplante korrelative Analyse (AP 3.4) im Rahmen des Interaktom Profiling in Zusammenarbeit mit **Prof. Backofens Gruppe** konnte jedoch nicht mehr realisiert werden.

Projektpartner im P3-Konsortium: Universität Freiburg, Uniklinik Freiburg, Hahn-Schickard-Gesellschaft für angewandte Forschung e.V., Computomics GmbH, Sciomics GmbH, Temicon GmbH, Q-Bios GmbH

Vielen Dank für die Förderung dieses Vorhabens.

14.11.2025

Abschlussbericht der Actome GmbH

ZE: <i>Actome GmbH / PICO BioScience GmbH</i>	Förderkennzeichen: <i>03ZU1208CB_7B</i>
Vorhabenbezeichnung: Nanodiag BW: P3: Digitaler Nanoporen-Sequenzierer & Marker "Interactom Profiler" - Projekt 3_TV-B (nanodiag_BW_P3)	
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2023 - 31.03.2026	
Berichtszeitraum: 01.01.2025 – 31.08.2025 (wie mit Projektträger besprochen vorzeitig terminiert)	

Der Zwischenbericht soll zu folgenden Punkten/Fragen kurzgefasste Angaben enthalten:

1. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse.

Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Mit dem Projekt P3 verfolgt nanodiag BW eine zweigleisige Strategie: (1) Technologische Exzellenz – die Entwicklung eines digitalen Nanoporensequenzierers mit hoher Sensitivität und Skalierbarkeit; ein ambitioniertes Ziel mit hohem Innovationspotenzial. (2) Klinische Anschlussfähigkeit – parallel erfolgt die wissenschaftliche Validierung epigenetischer Markerprofile, um eine spätere Translation in die klinische Anwendung realistisch und zielgerichtet vorzubereiten.

PICO-Referenzassay

Zur Etablierung des Assays wird das HER2-System als Referenz-Assay bereitgestellt. Darüber hinaus ist HER2 auch im klinischen Kontext von Interesse, da es als Biomarker für die Brustkrebsprognose dient. Zur eindeutigen Zuordnung der nachfolgenden Nanoporen-Sequenzierungsdaten werden diese mit einem Barcode und einem UMI (Unique Molecular Identifier) markiert. Das übergeordnete Ziel von P3-TP5 ist die Entwicklung eines isothermen PICO-Assays (Hahn-Schickard), der das HER2-Protein (Actome) nachweisen kann. Die anfängliche Auswertung in einem digitalen PCR-Gerät soll anschließend auf die NGS-Nanoporen-Technologie übertragen werden. Durch die Bereitstellung eines Mastermixes für den isothermen PICO-Assay sollen dessen Komponenten variiert und so an die Bedingungen der Nanoporen-Sequenzierung angepasst werden.

Im Rahmen des Projekts wurde für das Konsortium ein Referenz-Assay entwickelt und charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes HER2 verwendet, das mit Trastuzumab (TTZ, detektiert im gelben Kanal (Y)) und Pertuzumab (PTZ, detektiert im grünen Kanal (G)) – zwei gut charakterisierten therapeutischen Antikörpern – detektiert wurde. Zusätzlich wurde ein Anti-HIS-Antikörper (antiHISm, detektiert im roten Kanal (R)) in die Reaktion eingebracht. Da das rekombinante HER2-Protein ebenfalls ein

HIS-Tag trägt, kann die Konzentration mithilfe von drei Antikörperpaaren bestimmt werden: TTZ-PTZ (GY), TTZ-antiHIS (YR) und PTZ-antiHIS (GR) (siehe Abbildung 1). Da diese gleichzeitig an das Ziel binden sollten, sollten sie auch dieselbe Konzentration des Targets bestimmen. Dies ermöglicht die Erkennung von Ungenauigkeiten, die bei der Änderung der Assay-Bedingungen zur Anpassung an die Nanoporen-Sequenzierung auftreten können.

Um die Zuverlässigkeit der Messungen zu erhöhen, wurde der Referenz-Assay von zwei unabhängigen Experimentatoren durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen wurden anschließend mittels ANOVA analysiert, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messungen festgestellt wurde (Antikörperpaare: ANOVA $F(2, 247) = 1,818$, $p = 0,165$; Experimentatoren: ANOVA $F(1, 247) = 2,60$, $p = 0,108$). (Siehe Abbildung 1).

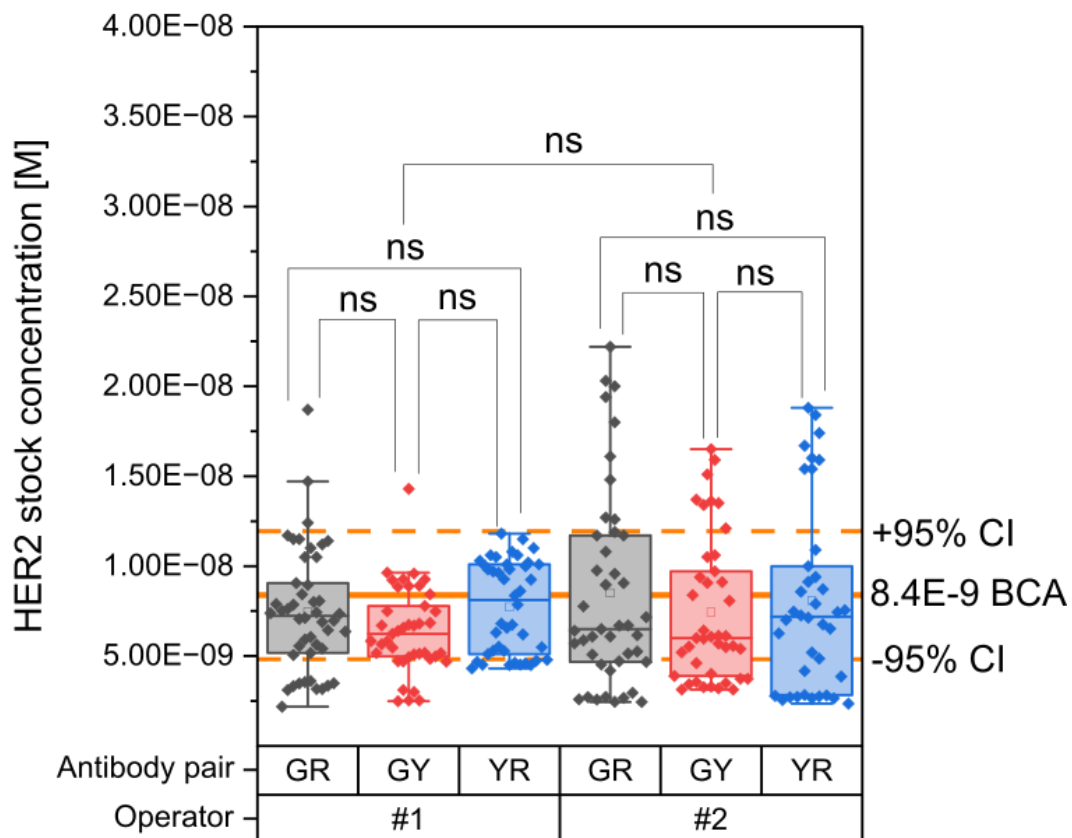


Abbildung 1: Vergleich der HER2-Konzentrationen zwischen verschiedenen Antikörperpaaren TTZ-PTZ (GY), PTZ-AntiHIS (GR) und TTZ-AntiHIS (YR), durchgeführt von unterschiedlichen Experimentatoren (#1

und #2). Die Mittelwerte und Standardabweichungen von links nach rechts lauten wie folgt: $7,45 \times 10^{-9} \pm 3,43 \times 10^{-9}$ M, $6,42 \times 10^{-9} \pm 2,39 \times 10^{-9}$ M, $7,74 \times 10^{-9} \pm 2,55 \times 10^{-9}$ M, $8,50 \times 10^{-9} \pm 5,48 \times 10^{-9}$ M, $7,43 \times 10^{-9} \pm 4,03 \times 10^{-9}$ M, $8,07 \times 10^{-9} \pm 5,16 \times 10^{-9}$ M. Zwischen den Gruppen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt. Die ANOVA für die Antikörperpaare ergab $F(2, 247) = 1,818$, $p = 0,165$ und für die Experimentatoren $F(1, 247) = 2,60$, $p = 0,108$. Die Stichprobengröße beträgt $n = 250$.

Außerdem wurde unter anderem rekombinantes Histon H3 als Target für das Konsortium etabliert. Durch chemische Modifikationen wie Methylierung oder Acetylierung beeinflusst Histon H3 den Zugang der Transkriptionsfaktoren zur DNA und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Genregulation.

Besonders wurde die K27M-Mutation des Histons H3 untersucht. Dabei wird an Position 27 das Lysin (K) durch Methionin (M) ersetzt, was die epigenetische Regulation stört. Normalerweise sorgt die Methylierung von H3K27 (H3K27me3) für das Stilllegen bestimmter Gene. Durch den Austausch des Lysin wird diese Markierung verhindert, was zu einer abnormalen Genaktivität führt – ein wichtiger Faktor bei der Tumorentwicklung.

In der Analyse wurden rekombinantes H3-Histon sowie die K27M-Mutation gemessen. Dabei kamen drei Antikörper zum Einsatz: Zwei richten sich gegen das H3-Histon (D2B12 & D1H2) und einer speziell gegen die K27M-Mutation (EPR18340). Diese Antikörperpaare wurden an verschiedenen rekombinanten Proteinen getestet, darunter H3.1, H3.2 sowie die mutierten Varianten H3.1 K27M und H3.3 K27M. Die Ergebnisse zeigten, dass das Antikörperpaar, das H3 allgemein erkennt, Signale bei allen Varianten liefert, während die K27M-spezifischen Antikörper nur bei den mutierten Formen ansprechen was die Spezifität der Antikörper bestätigt.

Da die Antikörper bei den rekombinanten Proteinen erwartungsgemäß funktionierten, wurde zunächst davon ausgegangen, dass sie auch in klinisch relevanten Proben eingesetzt werden können.

Optimierung des PICO Assays

Für den weiteren Verlauf des Projekts sollten die Eigenschaften des PICO-Assays evaluiert werden, vor allem mit Hinblick auf die Spezifität und Sensitivität der PICO-Assays sollte genau untersucht werden. Die Sensitivität, welche durch die Begriffe der Nachweisgrenze (LOD) und Quantifizierungsgrenze (LOQ) genauer definiert ist, beschreibt, wie klein die Menge eines Proteins sein kann, die noch zuverlässig

nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde der in AP1 etablierte Referenz-Assay verwendet. Eine Verdünnungsreihe von rekombinantem HER2 wurde mit den Antikörpern TTZ, PTZ und Anti-HIS gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt

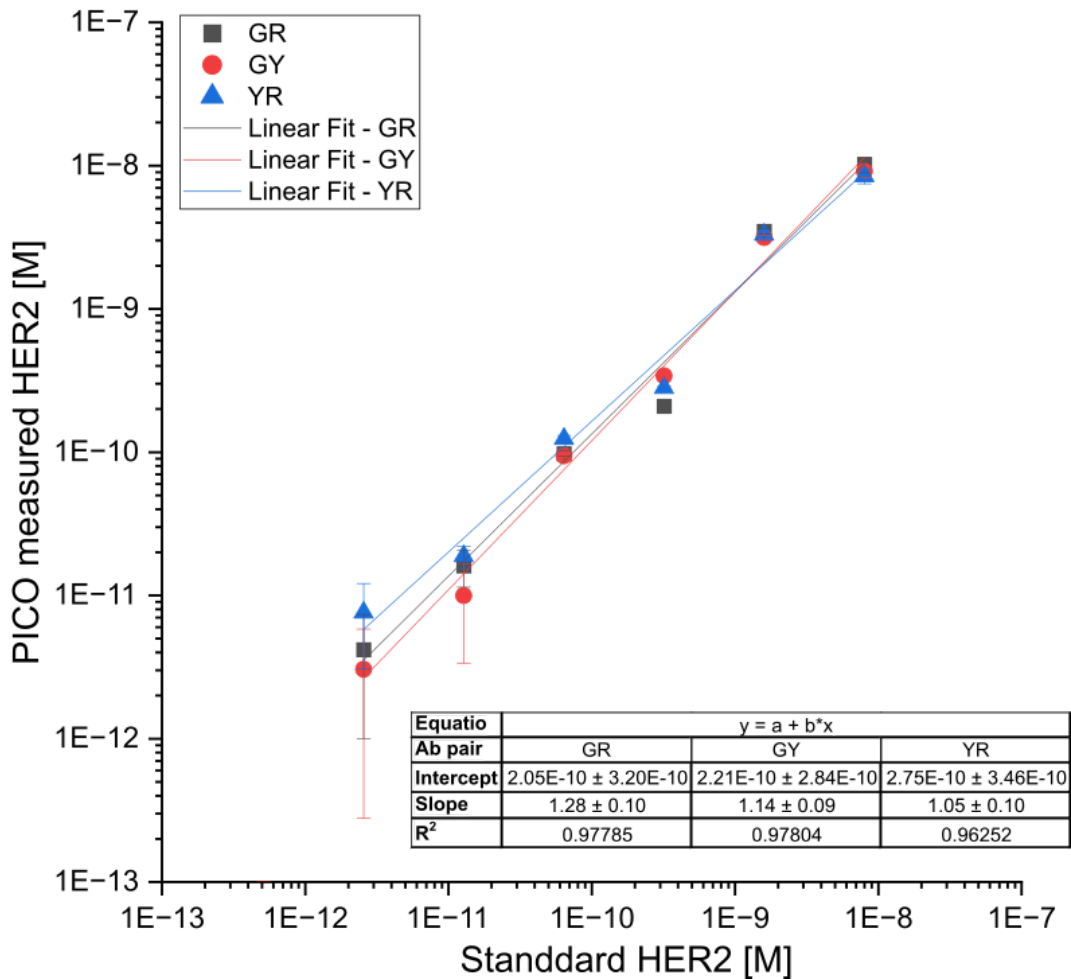


Abbildung 2: Korrelation zwischen den mittels PICO gemessenen HER2-Konzentrationen und den Standard-HER2-Konzentrationen. Dargestellt sind die Messungen der Antikörperpaare PTZ-AntiHIS (GR), TTZ-PTZ (GY) und TTZ-AntiHIS (YR). Die verwendeten Standard-HER2-Konzentrationen betragen 8×10^{-9} M, $1,6 \times 10^{-9}$ M, $3,2 \times 10^{-10}$ M, $6,4 \times 10^{-11}$ M, $1,28 \times 10^{-11}$ M und $2,56 \times 10^{-12}$ M. Die Legende in der Abbildung enthält Informationen zur Steigung und zum Achsenabschnitt der angewandten linearen Regression.

Die Ergebnisse in Abbildung 2 zeigen eine deutliche Korrelation zwischen den mittels PICO gemessenen HER2-Konzentrationen und den Standard-HER2-Konzentrationen. Die dargestellten Messungen der Antikörperpaare PTZ-AntiHER2 (GR), TTZ-PTZ (GY) und TTZ-AntiHER2 (YR) ermöglichen eine detaillierte Analyse. Die verwendeten Standard-HER2-Konzentrationen reichen von 8×10^{-9} M bis $2,56 \times 10^{-12}$ M. Die dargestellte Verdünnungsreihe zeigt, dass der PICO-Assay über vier Größenordnungen hinweg einen linearen Trend aufweist. Die Steigung der linearen Regression beträgt für das Antikörperpaar PTZ-AntiHER2 (GR) $1,28 \pm 0,10$, für PTZ-TTZ (GY) $1,14 \pm 0,09$ und für TTZ-AntiHER2 (YR) $1,05 \pm 0,10$, was darauf hinweist, dass der PICO-Assay eine robuste Linearität bei der Messung von HER2-Konzentrationen aufweist.

Darüber hinaus liegt der Bestimmtheitskoeffizient (R^2) für alle Antikörperpaare über 0,95, was eine sehr gute Übereinstimmung der Daten mit der linearen Regression belegt.

Für HER2 ergaben sich eine LOD von 3 pM und eine LOQ von 9,9 pM was 19 bzw. 119 Couplexen entspricht. Bei anderen Anti-HER2 Antikörperpaaren lagen die durchschnittlichen Werte bei etwa 3,7 pM (LOD) und 12,2 pM (LOQ).

Die Messungen wurden mit dem QIAcuity-System durchgeführt. Die Sensitivität ist, wie prinzipiell bei allen dPCR Systemen, auch hier durch die Anzahl der Partitionen (also die Anzahl der kleinen Reaktionsräume) begrenzt und skaliert LOD und LOQ mit deren Anzahl: Je mehr Partitionen vorhanden sind, desto präziser sind die Messungen und desto niedriger wird die Nachweisgrenze. Bei sehr vielen Partitionen können sogar einzelne Moleküle nachgewiesen werden, was die Empfindlichkeit der Methode deutlich erhöht.

Außerdem wurde mit Hilfe des AQ-Modells simuliert, bei welcher Antikörperkonzentration die beste Sensitivität erreicht wird. Dabei zeigte die Simulation, dass die optimale Konzentration bei etwa 51 pM liegt. Diese Ergebnisse wurden durch Experimente mit rHER2 und den Antikörpern Pertuzumab, Trastuzumab und anti-HER2 bei unterschiedlichen Konzentrationen bestätigt.

Weitere Zielmoleküle konnten durch detaillierte Analysen ebenfalls mit dem PICO-Assay etabliert werden; diese sind in Tabelle 1 aufgeführt und werden dem Konsortium im weiteren Projektverlauf zur Verfügung stehen. Histone und deren post-translationale Modifikationen werden unten gesondert aufgeführt.

Tabelle 1: Etablierte Zielmoleküle, die mit dem PICO-Assay gemessen werden können und für den weiteren Fortschritt des Konsortiums genutzt werden können.

Targets	Type	Localization
FLAG	Tag	-
GFP	Tag	-
Strep	Tag	-
6*HIS	Tag	-
5*HIS	Tag	-
thioredoxin	Tag	-
Her2	Protein	Cell membrane
Her3	Protein	Cell membrane
Her2-Her3	Interaction	Cell membrane
Histone H3.1	Protein	Nucleus
Histone H3.2	Protein	Nucleus
Histone H3 tri	Protein	Nucleus

methyl K27		
------------	--	--

Detektion von Histone in Zellextrakt

Der PICO-Assay ermöglicht eine hochsensitive und quantitative Erfassung spezifischer Histonmodifikationen und stellt damit ein leistungsfähiges Instrument für die molekulare Analyse epigenetischer Veränderungen dar. Ein besonders relevantes Anwendungsfeld ist die Detektion der H3-K27M-Mutation, die mithilfe der PICO-Technologie präzise und zuverlässig nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 3). Um die Spezifität des Assays für diese Mutation zu validieren, wurde ein experimenteller Ansatz mit drei unterschiedlichen Antikörpern gewählt – zwei, die gegen das Gesamtprotein Histon H3 gerichtet sind, sowie ein mutationsspezifischer Antikörper, der ausschließlich die K27M-Variante erkennt. Für die Analyse kamen insgesamt vier rekombinante Histon-H3-Proteine zum Einsatz, darunter zwei mit der K27M-Mutation, um die Selektivität des spezifischen Antikörpers eindeutig zu überprüfen. Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass der Assay zwischen der Wildtyp- und der mutierten Form unterscheiden kann und somit eine robuste Grundlage für die spezifische Mutationserkennung bietet.

Die Identifikation der K27M-Mutation besitzt eine hohe diagnostische Relevanz, da sie insbesondere bei diffusen Mittelliniengliomen und weiteren aggressiven Hirntumoren auftritt und als molekularer Marker zur Klassifikation dieser Tumorentitäten dient. Ihre präzise Bestimmung ermöglicht darüber hinaus eine verbesserte Stratifizierung von Patienten, wodurch differenziertere Prognoseeinschätzungen und eine zielgerichtete Therapieplanung unterstützt werden. Insgesamt liefert der PICO-Assay durch seine Kombination aus hoher Sensitivität, Spezifität und Quantifizierbarkeit eine wertvolle Grundlage für präzisionsmedizinische Anwendungen im Bereich epigenetischer Biomarker.

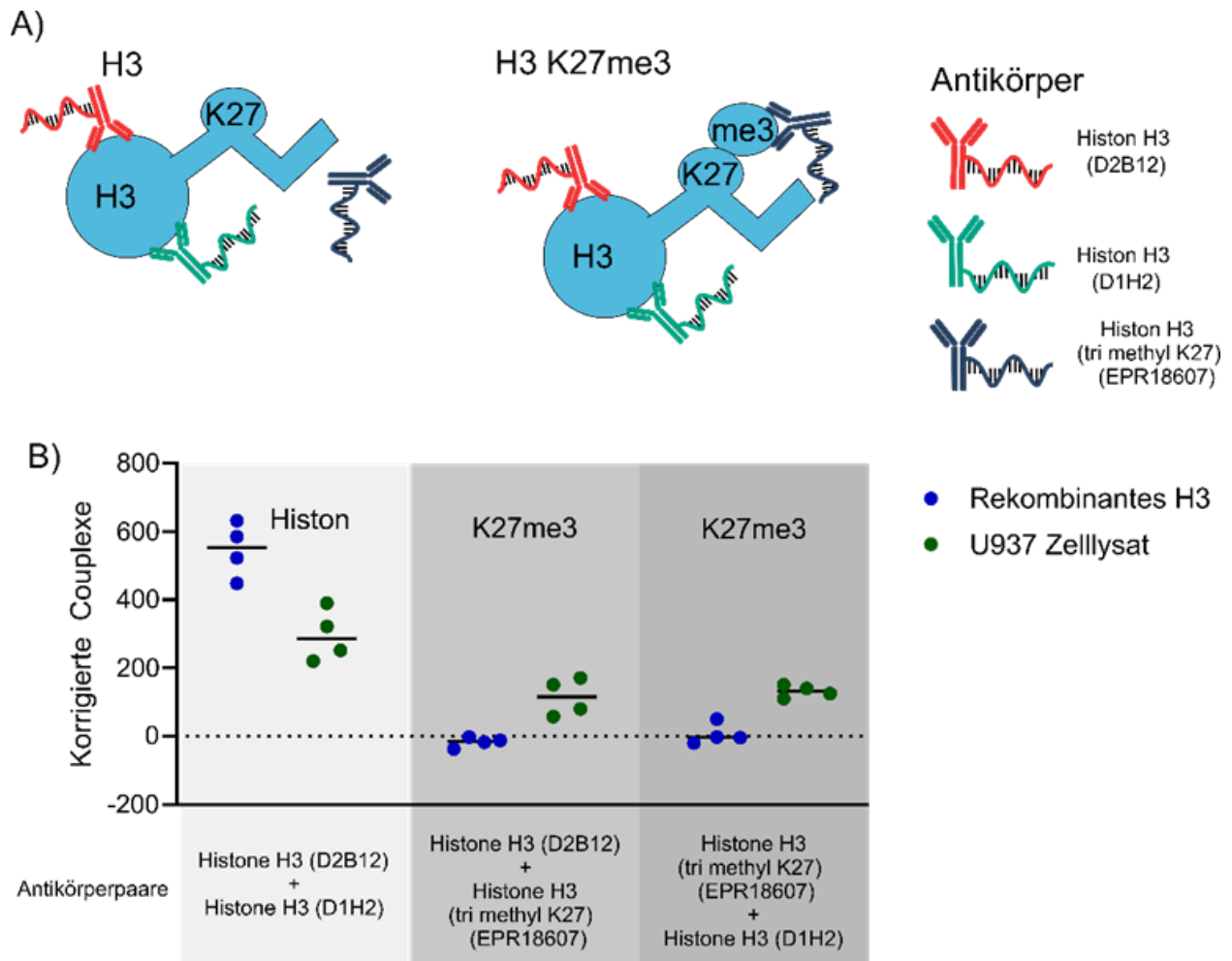


Abbildung 3: Validierung der H3 K27M-Mutation im Histon H3 zur Bestimmung der Spezifität des PICO-Assays. Es wurden drei Antikörper eingesetzt – zwei gegen das Gesamtprotein H3 gerichtet sowie ein mutationsspezifischer Antikörper gegen die K27M-Mutation. Insgesamt kamen vier rekombinante Histon-H3-Proteine zum Einsatz, darunter zwei mit der K27M-Mutation, um die Selektivität des Antikörpers für die mutierte Form zu überprüfen.

Wie oben beschrieben, konnten die Antikörper D2B12 und D1H2 rekombinantes H3-Histon zuverlässig detektieren. Daher wurde zunächst angenommen, dass sich diese Antikörper auch für den Einsatz in klinisch relevanten Proben eignen. Um die Funktionalität der Antikörper im Zelllysat zu überprüfen, wurde Zelllysat aus U937-Zellen mit dem Standard-Lysepuffer von Actome hergestellt. Parallel dazu wurde ein alternatives Protokoll getestet, bei dem mittels eines sauren Puffers (HCl) Aggregate aufgeschlossen wurden, die typischerweise im Standardpuffer entstehen.

Es wurde angenommen, dass es sich bei diesen Aggregaten vorwiegend um präzipitiertes Chromatin handelt. Da Histone stark basische Proteine sind, ist für ihre Lösung in der Regel eine saure Extraktion (z. B. mit HCl) erforderlich. Die freie Löslichkeit der Zielproteine ist insbesondere für die Detektion mittels PICO entscheidend, da nur dann eine effiziente Antikörperbindung sowie eine gleichmäßige Verteilung der gebildeten Komplexe in den Partitionen der digitalen PCR (dPCR) gewährleistet ist.

Beide verwendeten Lysepuffer lieferten jedoch kein signifikantes Signal im Vergleich zur Positivkontrolle (rekombinantes H3-Histon).

In einem weiteren Experiment wurden verschiedene Kombinationen von Histon-H3-Antikörperpaaren sowie ein zusätzlicher Antikörper gegen Histon H3 tri-methyl K27 getestet (Kombinationen: D2B12 + 96C10; D2B12 + D1H2; 96C10 + D1H2; D2B12 + EPR18607). Diese Tests erfolgten sowohl im Standard-Lysepuffer als auch mit der oben beschriebenen sauren Histon-Extraktion. Auch hierbei konnte kein signifikantes Signal im Vergleich zur ABC nachgewiesen werden.

Für die Experimente wurde ein breites Spektrum an Lysatverdünnungen (1:10 bis 1:10.000) eingesetzt, um sicherzustellen, dass auch im sensitivsten Messbereich gearbeitet wurde. Zusätzlich wurden optimale Antikörperkonzentrationen ($4.00E-11$ M) verwendet, um die Nachweisempfindlichkeit zu maximieren.

Da keines der Experimente zur gewünschten Detektion von Histon H3 oder H3 tri-methyl K27 führte, wurde angenommen, dass die entsprechenden Epitope für die gewählten Antikörper nicht ausreichend zugänglich sind. Diese Annahme basiert auf der Tatsache, dass alle verwendeten monoklonalen Antikörper gegen synthetische Peptide generiert wurden, die dem Carboxyterminus des menschlichen Histon-H3-Proteins entsprechen. Es ist jedoch bekannt, dass der C-Terminus von Histon H3 strukturell im Histon-Oktamer eingebettet ist und zusätzlich mit der DNA interagiert, wodurch er in intakten Nukleosomen nicht frei zugänglich ist (Luger et al., 1997 – Nature). Daher ist für den Antikörper-basierten Nachweis des C-Terminus häufig eine (zumindest partielle) Denaturierung oder eine Freisetzung aus der Nukleosomenstruktur erforderlich.

Um zu überprüfen, ob eine partielle Denaturierung das Detektionssignal verbessert, wurde NuPAGE-Probenpuffer in 0,25-facher Konzentration dem zuvor hergestellten Zelllysats (wie oben beschrieben aus saurer Extraktion) zugesetzt und für 5 Minuten bei 60 °C inkubiert. Parallel erfolgten Messungen unter nicht-denaturierenden Bedingungen sowie mit rekombinantem H3-Histon als Kontrolle. Wie in Abbildung 1 dargestellt, führte die Denaturierung im Vergleich zur ABC zu einem signifikant erhöhten Signal für Histon H3. Auch bei rekombinantem Histon H3 konnte unter denaturierenden Bedingungen eine Signalsteigerung im Vergleich zur nativen Bedingung beobachtet werden.

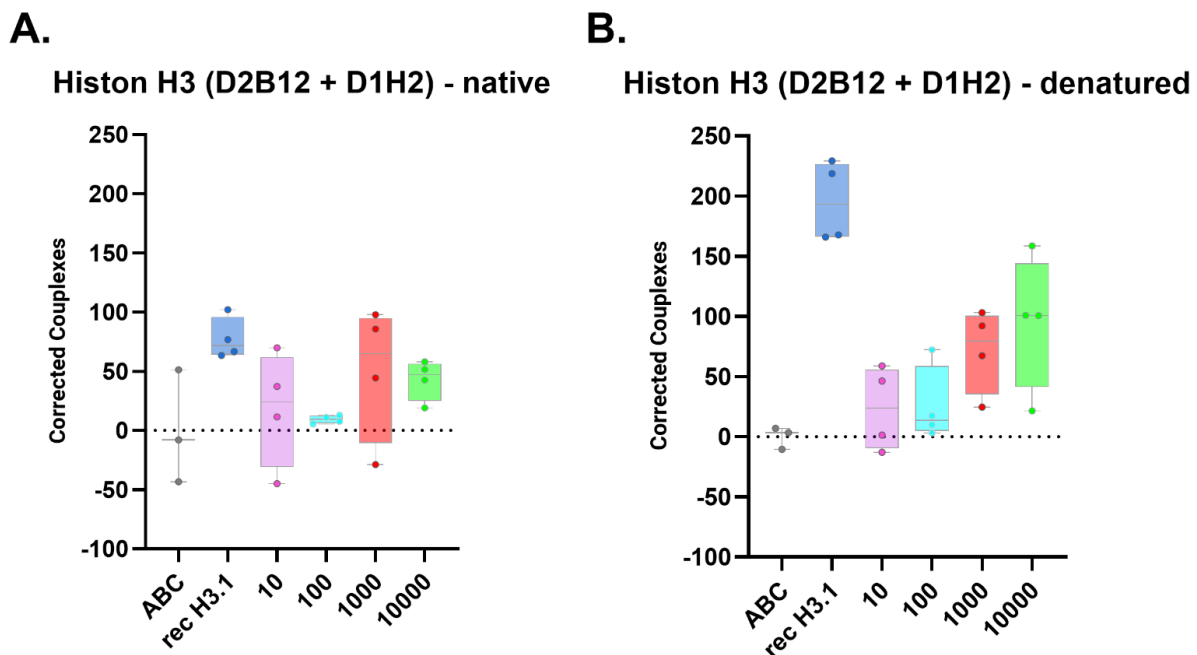


Abbildung 1: Messung von rekombinanter H3 Histone sowie Histon H3 aus U937 Zelllysats. Für die Detektion wurden die Antikörper D2B12 und D1H2 verwendet. Auf der y-Achse sind die gemessenen korrigierten Couplex-Werte angegeben. A) zeigt die gemessenen korrigierten Couplex Werte für U937 Zelllysats welches mit dem standard Actome Lysepuffer hergestellt wurde wobei angefallene Aggregat mit sauren Puffer (HCl) aufgeschlossen wurden. B) zeigt die gemessenen korrigierten Couplex Werte für U937 mit analog zu A) hergestelltem Lysat wobei die Probe vor der Messung zusätzlich mittels 0,25x NuPAGE-Probenpuffer bei 60° C für 5 min denaturiert wurde.

Obwohl die Ergebnisse als vorläufig zu betrachten sind, legen sie nahe, dass die Denaturierung von Histon H3 die Zugänglichkeit des C-Terminus erhöht und/oder die Aggregatbildung reduziert. Beides könnte zu einer effektiveren Antikörperbindung und somit zu einer verbesserten Detektion beitragen.

In zukünftigen Experimenten sollte dieser Sachverhalt detaillierter untersucht werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, weitere Antikörper zu analysieren, die gegen besser zugängliche Epitope von Histon H3 gerichtet sind. Weiterhin sollte der Einsatz von Nukleasen getestet werden um die Nukleosomen Struktur durch Verdau der DNA zu lockern, was zu einer besseren Zugänglichkeit des native Histon H3 führen könnte.

Offene Arbeitspunkte aufgrund der verkürzten Projektlaufzeit

Durchführung von NGS-Analysen:

Die im Arbeitspaket vorgesehenen NGS-Analysen konnten inhaltlich vorbereitet und die dafür notwendigen Rohdaten bereits erhoben werden. Aufgrund der vorzeitigen Projektbeendigung war es jedoch nicht möglich, die weiterführenden Schritte – insbesondere die bioinformatische Auswertung, die Qualitätskontrolle der Sequenzdaten sowie die finale Integration in die projektinterne Analysepipeline – vollständig abzuschließen. Diese Arbeitsschritte bleiben daher offen, können jedoch auf Grundlage der bereits vorliegenden Daten in einer Folgephase ohne grundlegende Verzögerungen fortgeführt werden.

Modulare Systemintegration:

Auch die geplante modulare Systemintegration war vom verkürzten Projektzeitraum betroffen. Während grundlegende Module spezifiziert und erste Implementierungsschritte erfolgreich umgesetzt wurden, stehen noch Tätigkeiten wie die funktionale Gesamtintegration, ergänzende Validierungsmaßnahmen, die Optimierung der Schnittstellen sowie die abschließende Systembewertung aus. Diese

können auf Basis der vorbereiteten Komponenten in einem Folgeschritt weiterentwickelt werden.

Projektbezogene Rahmenbedingungen:

Zu den erschwerenden Umständen zählt zudem, dass die Actome GmbH im Verlauf des Jahres insolvent geworden ist und infolgedessen ab Juni nicht mehr in der Lage war, die Projektarbeiten im vorgesehenen Umfang sinnvoll weiterzuführen. Dies führte zu einer faktischen Einschränkung der verfügbaren Ressourcen und beeinflusste den zeitlichen Verlauf der offenen Arbeitspunkte. Gleichwohl wurden alle verfügbaren Arbeiten bis zu diesem Zeitpunkt vollständig dokumentiert, sodass eine geordnete Weiterführung durch das Konsortium möglich bleibt.

Einordnung im Gesamtkontext des Projekts:

Trotz dieser Rahmenbedingungen und der offen gebliebenen Arbeitsschritte hatten diese Punkte keine negativen Auswirkungen auf die erfolgreiche Fortführung von P3 in der Umsetzungsphase 1. Die zentralen wissenschaftlichen und technischen Ziele wurden erreicht: Der PICO-Referenzassay wurde bereitgestellt, die Detektion relevanter Histonmodifikationen – einschließlich der K27M-Mutation – erfolgreich etabliert und die Anpassung der Oligonukleotide an das Nanoporen-Readout abgeschlossen. Damit wurde eine belastbare Grundlage für weiterführende Arbeiten geschaffen und dem Konsortium alle wesentlichen Ergebnisse übergeben.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass der PICO-Assay (Actome) zur sensitiven und quantitativen Erfassung spezifischer Histonmodifikationen (Detektion der K27M-Mutation mittels der PICO-Technologie (Abbildung 3) geeignet ist. Die Identifikation der K27M-Mutation besitzt potenzielle diagnostische Relevanz und kann zur Stratifizierung von Patienten sowie zur Ableitung therapeutischer Entscheidungen beitragen.

Der PICO-Assay bildet dabei nicht nur ein zentrales Referenzinstrument für die Markerdetektion, sondern fungiert zugleich als technologischer Demonstrator für den

zukünftigen digitalen Nanoporen Profiler – zunächst antikörperbasiert mit fluoreszenz Readout, perspektivisch jedoch die Nanopore als Readout auf Basis der PICO-Technologie.

In einem anderen Teilbereich von P3 konnte bedeutender Fortschritt in der Entwicklung der isothermen Amplifikationsmethoden erzielt werden, die als integraler Bestandteil für die künftige digitale Sequenzierung mittels Nanoporen vorgesehen sind.

Auch wurde der PICO-Assay gezielt auf klinisch relevante Matrizes – insbesondere Liquid Biopsy (z. B. Blut, Liquor, EVs) – übertragen, um die Anwendbarkeit in diagnostisch relevanten Kontexten zu evaluieren.

Die nachstehende Tabelle 2 fasst die im Rahmen des Arbeitspakets erzielten Ergebnisse zusammen. Zudem wird der jeweilige Erfüllungsstand angegeben, um den Grad der Zielerreichung zu verdeutlichen. Auf diese Weise lässt sich der aktuelle Entwicklungsstand des Projekts systematisch bewerten.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse

AP3	KI Algorithmen	Status
3.1	Bewertung von Antikörpern	Erfüllte Siehe Tabelle 1
3.2	Bestimmung Sensitivität + Spezifität PICO-Assay	Erfüllt siehe Abbildung 1 und Abbildung 2
3.3	Interaktom Profiling	Wichtige technologische Schritte erfüllt
3.4	Korrelative Analyse PICO Assay + Transkriptom	Zusammenarbeit mit Prof. Backofens Gruppe nicht möglich
3.5	Integr. Auswertung PICO + Therapieantwort	Daten erhoben

AP1	PICO-Referenzassay	
1.1	Auswahl+Charakterisierung Bindungspartner	Eine große Auswahl an Antikörpern für die Detektion von Zielmolekülen wurde etabliert (siehe Tabelle 1)
1.2	PICO-Referenzassay	Eine große Auswahl an Molekülen für die Detektion wurde erstellt Tabelle 1
1.3	Optimierung und Erweiterung	Der Assay wurde angepasst und optimiert, um auch in der Umsetzungsphase 2 für Detektion von Histone in klinischen Proben und der Nanoporen-Auslesung zugänglich zu sein.
AP4	Systemintegration	
4.1	Durchführung von NGS Analysen	Rohdaten erhoben aber durch die Frühzeitige Projektbeendigung nicht abgeschlossen werden
4.2	Modulare Systemintegration	Durch die Frühzeitige Projektbeendigung konnte nicht abgeschlossen werden
4.3	Machbarkeitsnachweis	Der PICO Assay wurde auf klinische Proben angewandt und konnte somit seine Machbarkeit unter Beweis stellen