

ZE: Universität Tübingen (Neurologie/Synofzik)	Förderkennzeichen: 01ED2008B
Vorhabenbezeichnung: GENFI-prox- Teilprojekt „Rekrutierung und Multi-OMICS-Biomarker-Charakterisierung von genetischen FTD- Probanden“	
Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2020 – 30.04.2024	

Teil I: Kurzbericht

1. ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

- **Gesamtziel des Verbundvorhabens**

Ziel dieses transnationalen Kooperationsprojektes „GENFI-prox“ ist die Identifizierung neuer Biomarker für Patienten mit einer genetisch-bedingten Frontotemporalen Demenz (FTD), mit denen der Zeitpunkt des Eintretens von klinischen Symptomen abgeschätzt und der longitudinale Verlauf der Erkrankung individuell stratifiziert werden kann.

- **Ziele des Teilprojekts**

Im Rahmen dieses Gesamtziels ist das Ziel unseres Teilprojekts, zur Aufklärung von krankheits- und genotyp-spezifischen Progressionsmarkern des individuellen Krankheitsverlaufs bei FTD beizutragen- und so einer künftigen „Präzisionsmedizin für FTD“ den Weg zu bereiten. Insbesondere sollen in diesem Teilprojekt Fluid Biomarker sowohl mittels gezielter („targeted“) wie auch hypothesenfreier („unbiased“) OMICS-Technologien identifiziert und in ihren Biomarker-Eigenschaften (Stratifikation, Progression, Therapie-Response, etc) für FTD validiert werden; um so einen künftigen individuellen „multi-omics Fingerabdruck“ von genetischen FTD-Patienten vorzubereiten, welcher eine molekulare Stratifikation des longitudinalen Verlauf der Erkrankung bei symptomatischen Mutationsträgern und insbesondere der zeitlichen Nähe zum klinischen Erkrankungsbeginn bei präsymptomatischen Mutationsträgern erlauben soll. Eine Identifizierung einer solchen molekularen Signatur von individuellen FTD-Patienten ist von unmittelbarer Relevanz für die effektive Initiierung künftiger molekularer Therapien und der Erfassung des individuellen Therapieansprechens- selbst bereits im therapeutisch hochrelevanten präsymptomatischen Krankheitsstadium.

- **Stand der Wissenschaft und Technik und bisherige Arbeiten**

Bei etwa 30-50% aller FTD-Patienten besteht eine positive Familienanamnese für FTD (bvFTD > nvPPA > svPPA), und bei 10-15% liegt ein klar autosomal-dominantes Vererbungsmuster vor (Woollacott & Rohrer, 2016). Selbst bei 10% aller scheinbar sporadischen FTD-Patienten finden sich pathogene Gen-Varianten, z.B. bedingt durch reduzierte Penetranz oder unvollständige/fehlinterpretierte Familienanamnese. Dieses zeigt, dass die Heritabilität bei FTD ungleich höher ist als bei anderen neurodegenerativen Demenzen. Wie wir zeigen konnten (Blauwendraat et al., 2018), tragen dabei mehr als 80% aller Patienten mit genetischer FTD eine Variante in einem der drei folgenden, allesamt autosomal-dominant vererbten Gene: chromosome 9 open reading frame 72 (C9orf72), progranulin (GRN), and microtubule-associated protein tau (MAPT). Gerade diese drei genetischen Formen der FTD bilden eine ideale „Modellerkrankung“ für das übergeordnete Ziel dieses Arbeitspakets: der Identifizierung individualisierter Risiko-, Progressions- und Treatment-Response-Profile anhand flüssigkeitsbasierter, mechanistischer Biomarker, welche eine molekulare Stratifikation und Erfassung der Therapie-Response individueller FTD Patienten bei künftigen molekularen Therapiestudien ermöglichen. Sie bilden hierfür eine ideale Modellerkrankung, da sie nicht nur einen Zugang zu molekular stratifizierten, gesicherten Formen der Erkrankung ermöglichen, sondern auch die longitudinale Erfassung

von präsymptomatischen Mutationsträgern erlauben. Es ist gerade diese Phase - noch vor der symptomatischen Phase der jeweiligen FTD-Erkrankung - die für die effektive Initiierung künftiger molekularer Therapien von besonderer Bedeutung sein könnte, da hier noch wenig Neurone betroffen und der zugrundeliegende Krankheitsprogress noch nicht weit fortgeschritten ist.

Um den Verlauf dieser drei häufigsten genetischen FTD-Formen zu erfassen, und multimodale (klinische, neuropsychologische, kernspintomographische, molekulare) Progressions- und Outcome-Marker für jede dieser drei Formen zu identifizieren, haben wir die GENetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) gegründet. Dieses ist eine prospektive longitudinale multizentrische multimodale Progressionsstudie zum Verlauf der drei genetischen FTD-Formen, stellt eine ideale Ausgangsstruktur für die hier genannten Biomarker-Projekte bei FTD dar.

2. Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen dieses Gesamtziels des Vorhabens war die Aufgabe unserer Arbeitsgruppe in diesem Konsortium die Umsetzung folgender zwar unterschiedlicher, jedoch streng zueinander synergistischer Ziele und Aufgaben:

1. kontinuierliche Rekrutierung, klinische Untersuchung und Biomaterial-Akquirierung (Liquor, Blut, PBMCs, etc) von symptomatischen und präsymptomatischen FTD Mutationsträgern als Teil des sukzessiven weiteren Ausbaus der großen longitudinalen GENFI-Kohorte unseres Konsortiums.
2. Hypothesenfreie („unbiased“) plus gezielte („targeted“) Erfassung der Transkriptom-Veränderungen in RNA bzw von Proteom-Veränderungen in Proteinen, jeweils aus freiem Liquor (cerebrospinal fluid, CSF) wie auch aus extrazellulären Vesikeln (EVs) aus Liquor (CSF EVs), bei präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern mit Mutationen in C9orf72, GRN oder MAPT im Querschnitt und Längsschnitt
3. Gezielte Assays zur Untersuchung der vielversprechendsten Protein-Biomarker-Kandidaten in CSF und ggf Blut.

3. wesentliche Ergebnisse

Mit Ablauf der Projektlaufzeit hat das transnationale Gesamt-Projekt bereits 23 Publikationen hervorgebracht. Zudem sind mehrere weitere Artikel derzeit eingereicht oder in Vorbereitung, und tiefgreifende Methoden- und Analyseentwicklungen befinden sich in vielversprechenden Fortentwicklungen.

Zu den wichtigsten Erfolgen zählen, unter vielem anderen:

- die Entwicklung einer (weltweit ersten) klinisch plus biomarker-basierten Definition der präklinischen und prodromalen Phasen der genetischen FTD (Benussi et al., 2021).
- Die Validierung von NfL and pNfH als blutbasierte Trial- und Stratifikations-Biomarker für alle 3 genetischen Formen der FTD, inklusive dem (therapie-relevantesten) frühen und präsymptomatischen Stadien der FTD (Wilke et al, 2022); ergänzt durch eine longitudinale Analyse von GFAP, Komplementproteinen und hypothesenfreien Entzündungspanels.
- Die cross-center und cross-matrix Validierung von NfL als blutbasiertem Trial-ready Biomarker für genetische FTD (Linnemann et al 2024).
- Identifikation von Proteinbiomarkern mittels großer, hypothesenfreier antikörper-basierter und massenspektrometrischer Panels, sowie proteomischer Analysen in Liquor (CSF) und Plasma sind veröffentlicht.
- Komplettierung erster Transkriptomik-Analysen, mit Identifikation erster Kandidaten-RNAs.

4. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Als transnationales Verbundvorhaben erfolgte eine enge Zusammenarbeit mit unseren GENFI-prox Konsortialpartnern Prof Rohrer/UCL, London; Prof van Swieten/Erasmus Medical Center, Rotterdam; Prof Graff/Karolinska Institute, Stockholm; Prof Otto/Univ Halle, Prof Borroni/Univ Brescia. Diese wurde ergänzt durch die Zusammenarbeit mit weiteren internationalen Partnern und Forschungseinrichtungen im Rahmen des o.g. GENFI-Verbunds.

ZE: Universität Tübingen (Neurologie/Synofzik)	Förderkennzeichen: 01ED2008B
Vorhabenbezeichnung: GENFI-prox- Teilprojekt „Rekrutierung und Multi-OMICS-Biomarker-Charakterisierung von genetischen FTD- Probanden“	
Laufzeit des Vorhabens: 01.07.2020 – 30.04.2024	

Teil II: Eingehende Darstellung der Arbeiten

1. Übersicht der Gesamt- und Einzelzielsetzungen und Arbeiten

Ziel dieses transnationalen Kooperationsprojektes „GENFI-prox“ ist die Identifizierung neuer Biomarker für Patienten mit einer genetisch-bedingten Frontotemporalen Demenz (FTD), mit denen der Zeitpunkt des Eintretens von klinischen Symptomen abgeschätzt und der longitudinale Verlauf der Erkrankung individuell stratifiziert werden kann. Im Rahmen dieses Gesamtziels ist das Ziel unseres Teilprojekts, zur Aufklärung von krankheits- und genotyp-spezifischen Progressionsmarkern des individuellen Krankheitsverlaufs bei FTD beizutragen- und so einer künftigen „Präzisionsmedizin für FTD“ den Weg zu bereiten. Insbesondere sollen in diesem Teilprojekt Fluid Biomarker sowohl mittels gezielter („targeted“) wie auch hypothesenfreier („unbiased“) OMICS-Technologien identifiziert und in ihren Biomarker-Eigenschaften (Stratifikation, Progression, Therapie-Response, etc) für FTD validiert werden; um so einen künftigen individuellen „multi-omics Fingerabdruck“ von genetischen FTD-Patienten vorzubereiten, welcher eine molekulare Stratifikation des longitudinalen Verlauf der Erkrankung bei symptomatischen Mutationsträgern und insbesondere der zeitlichen Nähe zum klinischen Erkrankungsbeginn bei präsymptomatischen Mutationsträgern erlauben soll. Eine Identifizierung einer solchen molekularen Signatur von individuellen FTD-Patienten ist von unmittelbarer Relevanz für die effektive Initiierung künftiger molekularer Therapien und der Erfassung des individuellen Therapieansprechens- selbst bereits im therapeutisch hochrelevanten präsymptomatischen Krankheitsstadium.

Im Rahmen dieses Gesamtziels des Vorhabens war die Aufgabe unserer Arbeitsgruppe in diesem Konsortium die Umsetzung folgender zwar unterschiedlicher, jedoch streng zueinander synergistischer Ziele und Aufgaben:

- I. kontinuierliche Rekrutierung, klinische Untersuchung und Biomaterial-Akquirierung (Liquor, Blut, PBMCs, etc) von symptomatischen und präsymptomatischen FTD Mutationsträgern als Teil des sukzessiven weiteren Ausbaus der großen longitudinalen GENFI-Kohorte unseres Konsortiums.
- II. Hypothesenfreie („unbiased“) plus gezielte („targeted“) Erfassung der Transkriptom-Veränderungen in RNA bzw von Proteom-Veränderungen in Proteinen, jeweils aus freiem CSF aus freiem Liquor (cerebrospinal fluid, CSF) wie auch aus extrazellulären Vesikeln (EVs) aus Liquor (CSF EVs), bei präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern mit Mutationen in C9orf72, GRN oder MAPT im Querschnitt und Längsschnitt
- III. Gezielte Assays zur Untersuchung der vielversprechendsten Protein-Biomarker-Kandidaten in CSF und Blut.

Diese 3 Arbeitsfelder werden im Folgenden in jeweils einzelnen Abschnitten detailliert dargestellt.

1.1. Auf- und Ausbau einer multimodal tiefen-charakterisierten longitudinalen genetischen FTD-Kohorte, inklusive multimodaler longitudinaler Biomaterialien

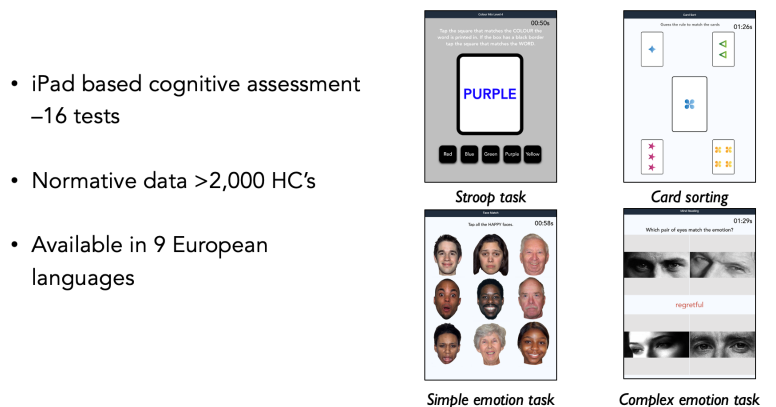
Aufbauend auf der bisherigen longitudinalen GENFI Kohorte ist im Rahmen der Projektlaufzeit gelungen, gemeinsam mit assoziierten GENFI-Partnern diese Kohorte auf mittlerweile >1600 rekrutierten Probanden (davon alleine 1170 präsymptomatische Risikopersonen) mit insgesamt >4380 Visiten (mit bis zu 11 longitudinalen Visiten/Proband) auszubauen, inklusive multimodalen klinischen und bildgebenden Datensätzen von jedem Visit, alle akquiriert nach einem über alle Zentren hinweg standardisierten, umfangreichen multimodalen Untersuchungsprotokoll (davon 81 Probanden, mit 117 Visiten durch unser Zentrum Tübingen). Diese longitudinalen klinischen und bildgebenden Datensätze wurden ergänzt durch eine longitudinale Akquierung multipler Biomaterialien von jedem Probanden und Visit, ausgebaut auf nunmehr >2500 Plasma- und Serumproben und >400 CSF-Proben. Damit konnte der wohl weltweit größte longitudinale multimodale Datensatz und Biomaterialbank von genetischen FTD Patienten inklusive insbesondere der- für künftige Therapieansätze entscheidende- präsymptomatische Probanden auf- und ausgebaut werden.

Hierdurch konnten wir in GENFI-prox - ergänzend und teilweise in Assoziation zu unseren unten näher dargestellten Fluid Biomarker-Arbeiten - Marker zur Diskrimination und Progressions-Erfassung von genetischen FTD Patienten in den Bereichen klinische Progression, Kognition, und Neuroimaging identifiziert und in ihrer Güte als Diskriminations- und Progressionsmarker beurteilt werden.

Zu den wichtigsten Erfolgen zählen, unter vielem anderen (für eine vollständige Auflistung, inkl weiterführender Darstellung, siehe unsere u.g. Publikationen als Ergebnisse dieses Projekts):

- **Definition und Konzeptualisierung der präsymptomatischen Phasen von genetischer FTD.** Wir konnten die - weltweit erste- Definition der präklinischen und prodromalen Phasen der genetischen FTD erstellen und international konsentieren, ergänzt um eine genauere Konzeptualisierung dieser jeweiligen Phasen basierend auf den- maßgeblich von GENFI-prox Partnern- identifizierten klinischen Markern und Fluid Biomarkern (Benussi et al., 2022). Für die Diagnose der prodromalen FTD- benannt als **“milde kognitive und/oder Verhaltens- und/oder motorische Beeinträchtigung (MCBMI)”** wurden hier klinische Kernkriterien vorgeschlagen. In einer anschließenden Arbeit wurden die Klassifikationsgüte dieser Kernkriterien untersucht (Benussi et al, 2024). Sie klassifizierten MCBMI im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit einer AUC von 0,79 ($p < 0,001$) korrekt. Die Zunahme von entweder dem Protein-Biomarker NfL im Blut oder Atrophie des anterioren Cingulums erhöhte die AUC signifikant auf 0,84 bzw. 0,82 ($p < 0,001$). Die Kombination beider Marker steigerte die AUC weiter auf 0,90 ($p < 0,001$). Damit zeigen die vorgeschlagenen MCBMI-Kriterien eine sehr gute Klassifikationsgenauigkeit zur Identifizierung des prodromalen Stadiums der FTD.
- **Modellierung der kognitiven longitudinalen Veränderungen.** Es konnten die longitudinalen kognitiven Veränderungen für alle drei wesentlichen Subtypen der genetischen FTD im präsymptomatischen Stadium, wie auch im Übergang zum symptomatischen Stadium der genetischen FTD erfasst und modelliert werden. Eine Veröffentlichung ist erfolgt (Poos et al 2022, Neurology).
- **Kognitives Kompositmaß:** Ein kognitives Kompositmaß (GENFI-Cog) wurde für die wichtigsten genetischen FTD-Subtypen (GRN/C9orf72/MAPT) entwickelt, das sich auf Studien in zeitlicher Nähe zum Symptombeginn konzentriert. Diese Kompositmaße verringern die erforderliche Stichprobengröße in Studien im Vergleich zu herkömmlichen Einzelmaßen. Eine Veröffentlichung ist erfolgt (Poos et al, 2022, Alz Research Therapy).
- **Tablet-basierte App:** Die englische Version einer FTD-spezifischen App-basierten neuropsychologischen Untersuchung (“Ignite”) (Abb. 1) wurde mit über 2000 Teilnehmern im Alter von 20–80 Jahren validiert. Die App wurde in zehn europäische

Sprachen übersetzt und an allen Standorten implementiert (Abb 1). Ergebnisse zeigen, dass die App frühe präsymptomatische Beeinträchtigungen in der sozialen Kognition erkennen kann. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.



- iPad based cognitive assessment
–16 tests
- Normative data >2,000 HC's
- Available in 9 European languages

Abb. 1: Übersicht über die neuropsychologische iPad-basierte App "IGNITE", zur digitalen distanten Erfassung von neuropsychologischen Verlaufsmarkern bei FTD.

- **Strukturelle und Perfusions-MRT-Bildgebung des Gehirns** (T1-gewichtetes und Arterial-Spin-Labeling-MRT): Es wurde eine W-Score-Analyse der strukturellen MRT-Gehirndaten der verschiedenen genetischen FTD-Subtypen unserer Kohorte veröffentlicht (Bocchetta et al, 2023). Zudem konnte ein individuelles Tool zur Messung von Gehirnatrophie bei genetischer FTD entwickelt und veröffentlicht werden, welches eine bildgebende Diskriminierung, Stratifizierung und vielleicht künftig auch eine Progressionserfassung bei individuellen genetischen FTD Patienten erlauben könnte (Premi et al, 2022).
- **Strukturelle Konnektivitäts-MRT-Analysen des Gehirns:** Als relativ neuartige, laborierte MRT-Modalitätsanalysen wurden Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI) und Neuriten-Orientierungsdispersion und Dichtebildgebung (NODDI) durchgeführt. Die W-Score-Analyse der DTI-Daten wurde abgeschlossen und ein entsprechender Artikel veröffentlicht (Bocchetta et al, 2023). Die Ergänzung der NODDI-Sequenz zum MRT-Protokoll wurde an allen Standorten implementiert. Ein Manuskript ist in Vorbereitung.
- **Funktionelle Konnektivitäts-MRT-Analysen des Gehirns:** Funktionelle Bildgebung im Ruhezustand (rsfMRT): Daten wurden veröffentlicht, die frühe Veränderungen der funktionellen Konnektivität zeigen (McCarthy et al, 2022; Liu et al, 2024).

1.II. Hypothesenfreie („unbiased“) plus gezielte („targeted“) Erfassung der Transkriptom-Veränderungen in RNA bzw von Proteom-Veränderungen in Proteinen, jeweils aus freiem Liquor (cerebrospinal fluid, CSF) wie auch aus extrazellulären Vesikeln (EVs) aus Liquor (CSF EVs), bei präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern mit Mutationen in C9orf72, GRN oder MAPT im Querschnitt und Längsschnitt

1.II.1. Hypothesenfreie Proteomik-Arbeiten

Zur Identifikation von Proteinbiomarkern wurden im Projekt folgende hypothesenfreien Proteomik-Ansätze umgesetzt und Ergebnisse erzielt.

Directed Discovery Proteomics. Dieses ist ein hybrider Ansatz, der sich auf vordefinierte Proteine oder Signalwege konzentriert und gleichzeitig eine umfassendere, hypothesenfreie Proteinbiomarker-Entdeckung ermöglicht. Hier wurden erstens große, hypothesenfreie antikörper-basierte Panels eingesetzt. In der ersten Studie wurden Liquorproben von 221 GENFI-Probanden mittels eines hypothesenfreien multiplexen antikörperbasierten Suspension-Bead-Array auf 111 verschiedene Kandidatenproteine untersucht, und mittels LASSO und Random-Forest-Methoden ausgewertet (Bergström et al, 2021, Mol Neurodegen). Hierdurch konnten 14 Proteine als potentiell relevant für die Unterscheidung von symptomatischen gegenüber asymptomatischen Probanden identifiziert werden. Vier dieser Proteine erwiesen sich als besonders wichtig: Neurofilament Medium Polypeptid (NEFM) (erhöht), Neuronales Pentraxin 2 (NPTX2) (erniedrigt), und Aquaporin 4 (AQP4) (erniedrigt). Beim Vergleich präsymptomatischer Mutationsträger in symptomatischen Stadien mit Nicht-Mutationsträgern wurden sechs Proteine identifiziert, darunter Progranulin (GRN). Diese hypothesenfrei identifizierten CSF-Kandidatenbiomarker und ihre potenzielle Assoziation mit den pathophysiologischen Mechanismen der genetischen FTD wird nun in weiterführenden Studien untersucht.

In einer zweiten Directed Discovery Proteomics Studie -erneut liquorbasiert- wurden CSF Proben von 193 GENFI-Probanden analysiert, darunter 77 präsymptomatische Mutationsträger, 55 symptomatische Mutationsträger und 61 mutationsnegative Kontrollen (Sogorb-Esteve et al, 2022). Die Proben wurden mit einem massenspektrometrischen Panel (Microflow-LC-PRM-MS-System) analysiert, das auf 15 synaptische Proteine abzielte: AP-2-Komplex-Untereinheit Beta, Complexin-2, Beta-Synuclein, Gamma-Synuclein, 14-3-3-Proteine (Eta, Epsilon, Zeta/Delta), Neurogranin, Rab GDP-Dissoziationsinhibitor Alpha (Rab GDI Alpha), Syntaxin-1B, Syntaxin-7, Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein 1 (PEBP-1), Neuronaler Pentraxin-Rezeptor (NPTXR), Neuronales Pentraxin 1 (NPTX1) und Neuronales Pentraxin 2 (NPTX2). Die CSF-Spiegel von NPTX1 und NPTX2 waren in allen drei genetischen Gruppen (C9orf72, GRN, MAPT) im Vergleich zu Kontrollen verringert; die NPTXR-Konzentrationen nur bei C9orf72- und GRN-Mutationsträgern. Die Konzentrationen der neuronalen Pentraxine korrelierten bei diesen beiden Mutationsgruppen in der präsymptomatischen Phase mit den Hirnvolumina, was darauf hindeutet, dass diese Marker der "synaptischen Gesundheit" in der Nähe des Symptombeginns abnormal werden.

In einer dritten Discovery Proteomics Studie, erneut liquorbasiert, wurde nun ein noch einmal um mehrere Dimensionen umfassenderes hypothesenfreies Spektrum an Proteinen (>3000 Proteine) untersucht, in diesem Falle mittels Ligand Proximity Extension Assay (PEA). Diese hochpräzise molekulare antikörper-basierte Technik basiert auf dem Prinzip der Nähe von Liganden, die durch eine chemische Reaktion miteinander verbunden werden, wenn sie sich in der Nähe eines Zielmoleküls befinden. Sie ermöglicht es, sehr niedrige Konzentrationen von Biomarkern mit hoher Empfindlichkeit und Spezifität nachzuweisen. Als Discovery Kohorte wurde zunächst eine Kohorte von 228 GENFI-Probanden untersucht; als Validierungskohorte eine Kohorte von 164 generellen FTD-Probanden und Kontrollen. Die Proteomik-Daten wurden analysiert auf differentielle Protein-Häufigkeit (differential protein abundance), Signalweg-Anreicherung (pathway enrichment analysis), und Diskriminationsgüte (Sensitivität/Spezifität; feature selection). In der Discovery Kohorte konnten ein Set an 6 Proteinen mit besonders großer differentieller Veränderung bei symptomatischen gegenüber nicht-symptomatischen Probanden identifiziert werden (welche dann auch wesentlich zur Modell-Bildung im Rahmen der Feature Selection beitragen). In der Pathway Enrichment Analyse zeigte sich für C9orf72 1 Pathway, für GRN 25 Pathways, und für MAPT 64 Pathways angereichert. Ein entsprechendes Manuskript ist aktuell in Vorbereitung.

In einer vierten Directed Discovery Proteomics Studie, nun blutbasiert, wurden Blutproben von 693 GENFI Probanden mittels eines multiplexen Antikörperarrays analysiert, das auf 158 Proteine abzielt. Wir fanden bei symptomatischen Mutationsträgern 13 Proteine und bei präsymptomatischen Mutationsträgern 10 Proteine, die jeweils im Vergleich zu gesunden Nicht-Mutationsträgern erhöht waren (Ullgren et al, 2023, Mol Neurodeg). Diese hypothesenfrei identifizierten Kandidatenbiomarker werden nun durch gezielte Untersuchungen und Assoziationen mit klinischen Variablen weiter untersucht, um ihr Potential als Fluid Biomarker für genetische FTD weiter zu klären.

Inflammation in frontotemporal lobar degeneration (FTLD)

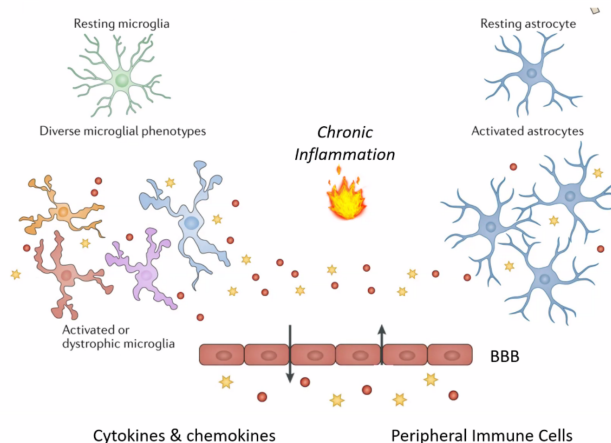


Abb. 2: Übersicht über neuro- und system-inflammatorische Prozesse bei FTD, auf Grund derer die Hypothesen für die hier durchgeführten Inflammations-Biomarker-Studien gebildet wurden.

Zwei weitere Directed Discovery Proteomics Studien fokussierten sich auf Inflammations-assoziierte Proteine. Dieses beruhend auf der Hypothese, dass ZNS- wie auch systemische Inflammation -analog wie zB bei der Alzheimer-Demenz- einen wesentlichen modulierenden, vielleicht auch primär treibenden Mechanismus der Neurodegeneration bei FTD darstellen (Abb. 2), möglicherweise auch schon- und sogar gerade- bei präsymptomatischen Stadien oder zumindest deren Konversion zu symptomatischen Krankheitsstadien. Ziel der ersten der beiden Studien war es, den Wert von Komplementproteinen, die wesentliche Bestandteile der angeborenen Immunität darstellen, als Biomarker im Liquor (CSF) und Plasma präsymptomatischer und symptomatischer genetischer FTD-Mutationsträger zu bestimmen (van der Ende et al, 2022). Hierzu wurden zunächst die Komplementproteine C1q und C3b im Liquor von 224 präsymptomatischen und symptomatischen GRN, C9orf72 oder MAPT Mutationsträgern sowie Nicht-Mutationsträgern der GENFI-Kohorte mittels ELISA gemessen. Anschließend wurde mittels multiplexer Immunoassays ein Panel von 14 Komplementproteinen im Plasma von 431 GENFI-Probanden gemessen. Wir korrelierten dann die Komplementproteinspiegel mit entsprechenden klinischen und neuroimaging-Daten, sowie den von uns gemessenen Biomarkern NFL und Gliales Fibrilläres Säureprotein (GFAP). C1q und C3b im Liquor sowie C2 und C3 im Plasma waren bei symptomatischen Mutationsträgern im Vergleich zu präsymptomatischen Trägern und Nicht-Trägern erhöht. Bei präsymptomatischen Trägern korrelierten mehrere Komplementproteine negativ mit dem Volumen der grauen Substanz in FTD-bezogenen Regionen und positiv mit NfL und GFAP. Bei symptomatischen Trägern wurden zusätzlich Korrelationen mit der Krankheitsdauer sowie den Ergebnissen des Mini-Mental State Examination und der Clinical Dementia Rating Scale® plus NACC Frontotemporal Lobar Degeneration Sum of Boxes Scores beobachtet. Zusammenfassend

weisen erhöhte Spiegel von C1q und C3b im Liquor sowie C2 und C3 im Plasma auf eine Aktivierung des Komplementsystems im symptomatischen Stadium der genetischen FTD hin. Die Korrelation mit mehreren Krankheitsmaßen bei präsymptomatischen Trägern deutet darauf hin, dass die Komplementproteinspiegel möglicherweise bereits vor dem Auftreten der Symptome ansteigen.

Ziel der zweiten Studie war es, hypothesenfrei auch eine große Anzahl von Zytokinen und Chemokinen im Plasma von genetischen FTD-Patienten zu bestimmen (Fenoglio et al, 2024). Hierzu wurden 30 Entzündungsfaktoren in Plasma-Proben von 434 GENFI-Probanden mittels eines großen Mesoscale-basierten Protein-Panels untersucht. Die folgenden Zytokine waren signifikant hochreguliert ($P < 0.05$) bei symptomatischen Mutationsträgern mit MAPT- und GRN-Mutationen im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern: Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interleukin (IL)-7, IL-15, IL-16, IL-17A. Darüber hinaus waren bei symptomatischen Mutationsträgern mit GRN-Mutationen zusätzlich weitere Faktoren hochreguliert, darunter: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12/IL-23p40, Eotaxin, Eotaxin-3, Interferon- γ -induziertes Protein (IP-10), Monocyte Chemotactic Protein (MCP)4. Im Gegensatz dazu waren die IL-1 α -Spiegel bei symptomatischen Mutationsträgern im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern verringert. Signifikant verringerte Werte dieses Zytokins wurden auch bei präsymptomatischen Mutationsträgern gefunden, unabhängig vom Mutationstyp. Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass eine Reihe von selbst peripheren, dh blutbasierten, Entzündungsproteinen bei symptomatischen Mutationsträgern mit MAPT- und GRN-Mutationen hochreguliert sind, wobei einige spezifische Faktoren nur bei GRN-Mutationsträgern verändert sind. Bemerkenswerterweise waren nur die IL-1 α -Spiegel sowohl bei symptomatischen wie auch präsymptomatischen Mutationsträgern verringert, unabhängig vom Typ der ursächlichen Mutation, was auf gemeinsame Modifikationen in der präklinischen Phase von genetischer FTD hindeutet.

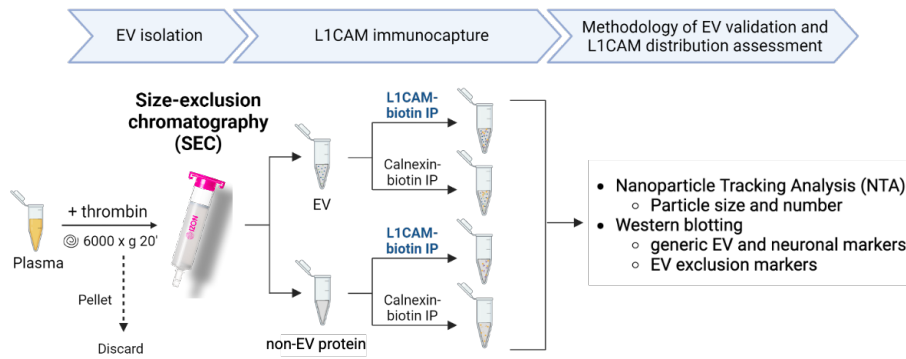
1.II.2. Hypothesenfreie Transkriptomik-Arbeiten

Unsere Transkriptomik-Arbeiten haben sich zunächst auf lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs) fokussiert, die eine entscheidende Rolle in der Genregulation spielen und an der Entstehung einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen, einschließlich FTD, beteiligt sind. Hier haben wir im Rahmen einer hypothesenfreien Untersuchung die Expressionsniveaus von 55 lncRNAs in peripheren mononukleären Blutzellen mittels einer OpenArray Custom Panel analysiert. Dazu konnte aus der GENFI-Kohorte RNA von 131 Mutationsträgern (68 symptomatisch, 63 präsymptomatisch) gewonnen und mit 40 Nicht-Mutationsträgern verglichen werden (Serpente et al, 2024). Achtunddreißig lncRNAs waren nachweisbar; die relative Expression von NEAT1 und NORAD war signifikant höher bei symptomatischen C9orf72-Mutationsträgern im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern. Die Expression von GAS5 war dagegen signifikant niedriger in der Gruppe der GRN-Mutationsträger im Vergleich zu Nicht-Mutationsträgern. MAPT-Träger zeigten keine signifikanten Deregulationen. Zusammenfassend sind NEAT1 und NORAD bei symptomatischen C9orf72-Mutationsträgern hochreguliert, und die GAS5-Spiegel bei GRN-Mutationsträgern herunterreguliert, was die Relevanz von lncRNAs in der FTD unterstreicht und ihr Potenzial für die Entwicklung von Biomarkern zeigt. Weitere Validierungs- und mechanistische Studien, welche entscheidend sind für klinische Anwendungen, wurden nun im Anschluß unsererseits initiiert.

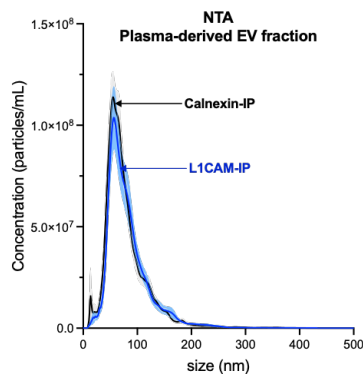
1.II.3 Etablierung von Analytik aus extrazellulären Vesikeln (EVs).

Identifizierung und Validierung neuronaler EV-Marker. Zum Zeitpunkt der Antragstellung galt ein Marker - L1CAM - als etabliert, der es erlaubt hätte, neuronale vs non-neuronale EVs in Liquor aber insbesondere auch Blut zu differenzieren. Zwar wurde (und wird) L1CAM in vielen Biomarker-Studien als EV-Marker verwendet; jedoch fehlte es dieser Methode noch an ausreichender robuster Validierung. Somit führten wir im ersten Schritt eine methodisch aufwändige Serie an Experimenten durch, um zu prüfen, ob menschliche Bioflüssigkeiten tatsächlich für EVs, insbesondere neuronale EVs, durch L1CAM-Immunaффinität angereichert sind (Kadam et al, 2025, in revision). Hierzu verwendeten wir mehrere Quellen (Plasma, CSF, konditioniertes Medium von iPSC-abgeleiteten Neuronen [iNCM]; zudem Maus-Hirngewebe als positive Kontrolle) und unterschiedlicher Methoden (Massenspektrometrie [MS], Nanopartikel-Tracking-Analyse [NTA]). Mit einem systematischen, mehrstufigen Validierungsansatz bestätigten wir die Isolation von allgemeinen EV-Populationen durch Größenausschlusschromatographie (SEC) und Polymer-vermittelte Präzipitation (PPT) – zwei der am häufigsten angewandten EV-Isolationsmethoden – aus allen Quellen. Neurofilament-Leichtkette (NfL) wurde in sowohl CSF- als auch blutabgeleiteten EVs nachgewiesen, was auf deren neuronale Herkunft hinweist. Jedoch ergab die L1CAM-Immunpräzipitation keine Anreicherung von L1CAM in den EV-Fractionen. Stattdessen wurde es hauptsächlich in seiner freien Form gefunden (Abb. 3). Darüber hinaus zeigte die MS-basierte proteomische Analyse von CSF-abgeleiteten EVs ebenfalls keine Anreicherung von L1CAM. Zusammenfassend validiert unsere Experimentreihe damit die EV-Isolation aus verschiedenen Bioflüssigkeitsquellen mittels mehrerer Isolationsansätze; und bestätigt, dass einige EV-Subpopulationen in menschlichen Bioflüssigkeiten neuronaler Herkunft sind. Unsere gründliche Prüfung über verschiedene Quellen hinweg mit unterschiedlichen orthogonalen Methoden unterstützt jedoch nicht die Verwendung von L1CAM als Marker, um eine spezifische Subpopulation von EVs, insbesondere neuronalem Ursprung, zuverlässig anzureichern. Diese Arbeit wurde im anerkannten Fachjournal *Molecular Neurobiology* eingereicht, und in erster Runde bereits aussichtsreich begutachtet (Kadam et al, 2025, in revision). Sie bestätigt und maßgeblich vertieft somit die Erkenntnis, dass L1CAM (i) nicht nur neuronalen Ursprungs ist und zudem (ii) auch in löslicher, nicht-EV assoziierter Form vorliegt (Norman et al, 2021, *Nat Methods*).

a.



b.



c.

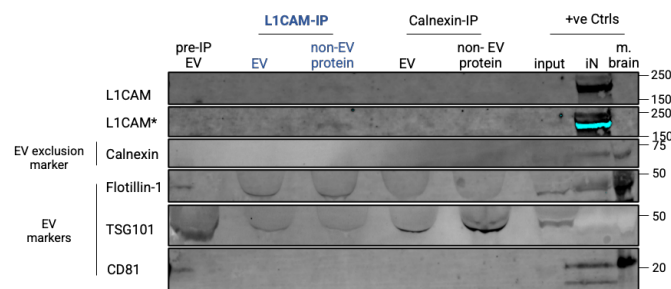


Abb 3: L1CAM liegt überwiegend in freier, nicht EV-assoziiierter Form vor. (a) Schematische Darstellung des experimentellen Designs. EV- und nicht-EV-Proteinfractionen wurden aus thrombin-behandeltem Plasma mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) isoliert und anschließend mit biotin-konjugiertem L1CAM oder Calnexin (als negativer Kontrollmarker) immunpräzipitiert. (Abbildung erstellt mit BioRender™.) (b) Größenverteilungsprofile der aus Plasma gewonnenen EV-Fractionen nach Immunpräzipitation (IP) mit L1CAM (blau) oder Calnexin (schwarz), gemessen mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), zeigen keine spezifische Anreicherung einer bestimmten EV-Fraktion durch L1CAM. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM aus acht unabhängigen Experimenten dargestellt. Die x-Achse zeigt die Partikelgröße in Nanometern, während die y-Achse die Partikelanzahl pro Milliliter Plasma angibt. (c) Ein repräsentatives Immunoblotting deutet darauf hin, dass L1CAM überwiegend in freier Form vorliegt. Äquivalente Volumina aller immunpräzipitierten Fractionen sowie der prä-IP EV-Fraktion wurden zum direkten Vergleich aufgetragen. Das Vorhandensein von EV-Markern (Flotillin-1, TSG101, CD81) in der prä-IP EV-Fraktion bestätigt die erfolgreiche Isolation von EVs, während das Fehlen des EV-Ausschlussmarkers (Calnexin) die Reinheit der EVs gewährleistet. Das Blot zeigt eine deutlich stärkere Signalintensität für L1CAM in der freien Proteinfraction nach L1CAM-IP im Vergleich zur EV-Fraktion. Um die Sichtbarkeit zu verbessern, wurde das Signal für L1CAM absichtlich überbelichtet (gekennzeichnet mit *). Als positive Kontrollen (+ve Ctrl) wurden Lysate aus gesamtem Mausgehirn (m. brain), iPSC-abgeleiteten neuronalen Zellen (iN) sowie das zur EV-Isolation verwendete unbehandelte Plasma (Input) eingesetzt, um das experimentelle Design zu validieren. Das Immunoblotting wurde mindestens viermal wiederholt und ergab konsistente Ergebnisse (publiziert in: Kadam et al, in Begutachtung).

Aus diesem Grunde haben wir dann im nächsten Schritt zudem noch eine weitere, wesentlich übergreifendere, methodologische Grundlagenarbeit initiieren müssen, um neue Marker für EVs zu identifizieren. Hierfür wurde zunächst CD81 als genereller EV-Marker validiert, auch im Rahmen unserer Proteomik-Experimente. Im nächsten Schritt wurden Proteomik von cytosolischer vs membranöser Fraktion von iPSC-basierten Neuronen durchgeführt, um so mittels differentieller Analyse der membranösen Fraktion gegenüber der cytosolischen

Fraktion neue, neuronale Marker zu identifizieren. Diese Proteom-Ergebnisse werden nun analysiert, um neue Kandidaten-Marker zu identifizieren.. Diese werden wir dann für die Identifizierung und Validierung neuronaler EVs in Liquor- und insbesondere Blut-Proben von unserer genetischen FTD GENFI Kohorte verwenden können.

Proteom aus EVs aus Medium von iPSC-basierten Neuronen plus iPS-basierten Neuronen selbst, Proteom aus EVs aus CSF plus (freiem) CSF selbst, Proteom aus Gehirngewebe, und deren Intersektion zur Priorisierung von Kandidaten-Veränderungen. Parallel zur Identifizierung neuer neuronaler EV-Marker, welche insbesondere für die Identifikation von neuronalen EVs in Blut relevant ist, haben wir eine Experiment-Linie zur Gewinnung von EVs aus Medium von iPSC-basierten Neuronen wie auch aus CSF aufgebaut, welche jeweils bereits qua Ursprung garantieren, dass jegliche Proteomik-Resultate *neuronalen* Ursprungs sind. Ziel dieser Projektklinie war es, Kandidatenproteine in Neuronen-abgeleiteten EVs zu identifizieren, welche dann in Zukunft mittels gezielter Assays in EVs in Liquor und Blut gezielt untersucht werden könnten. Im Rahmen dieser Projektklinie haben wir hypothesenfreie LC/MS Proteomik-Untersuchungen durchgeführt aus (i) EVs aus dem Medium der iPSC-basierten Neurone von genetischen FTD-Zelllinien (C9orf72, MAPT, GRN); (ii) den Zelllinien der 3 FTD-Gene selbst, (iii) EVs aus CSF von genetischen FTD-Mutationsträgern (C9orf72, MAPT, GRN);); (iv) dem (freien) CSF der Mutationsträger. Ergänzend dazu haben wir Proteomik-Untersuchungen aus Gehirngewebe der 3 FTD-Gene getestet. Diese hypothesenfreien Proteomik-Ergebnisse aus den EVs aus dem Medium von iPSC-basierten Neuronen haben wir mit den Proteomik-Ergebnissen aus CSF und Gehirngewebe überlappt, um durch diese Intersektion der Proteomik-Daten aus verschiedenen neuronalen Ursprungs-Matrices besonders vielversprechende Protein-Kandidaten für jeweils C9orf72, GRN und MPT zu identifizieren und zu priorisieren. Der Abschluß dieser – in Menge und Heterogenität an Untersuchungsmaterialien und Proteomik-Datensätzen sehr aufwändigen- Analyse ist für die kommenden Monate zu erwarten.

1.III Gezielte Assays zur Untersuchung der vielversprechendsten Protein-Biomarker-Kandidaten in CSF und Blut.

Parallel zu der großen Serie von hypothesenfreien Untersuchungen (siehe Abschnitte #1.II.1 und #1.II.2) wie auch Etablierung der EV-basierten Analytik) (siehe Abschnitt #1.II.3) haben wir eine äußerst umfangreiche Batterie an gezielten Proteinbiomarker-Assays entwickeln können; und ihre Wertigkeit in Liquor- und Blutproben des großen GENFI-Kollektivs in einer umfassenden Entwicklungslinie an Protein-Biomarkern zeigen können.

In einer ersten Studie haben wir die Biomarker-Wertigkeit von den zwei Proteinen Neurofilament Light Chain (NfL) und phosphoryliertem Neurofilament Heavy Chain (pNfH) - die als Kandidaten-Biomarker in unseren hypothesenfreien Studien (siehe Abschnitt #1.II.1), aber auch unabhängig davon identifiziert werden konnten- in der GENFI Kohorte (n = 444) unter Verwendung der ultrasensitiver Protein-Plattformen genauer untersucht; hier vor allem im Blut als einfach auch longitudinal zugängliche Biomaterial-Matrix (Wilke et al, 2022). Die Probanden umfassten 91 symptomatische und 179 präsymptomatische Probanden mit Mutationen in den FTD-Genen C9orf72, GRN oder MAPT, sowie 174 mutationsnegative intra-familiäre Kontrollen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass – im Rahmen einer Biomarker-Kaskade – der Anstieg von NfL dem hypothetischen klinischen Beginn der symptomatischen Phase der FTD-Erkrankung um 15 Jahre vorausging, und korrelierte mit dem Beginn der Gehirnatrophie im MRT, während der Anstieg von pNfH nahe dem klinischen Beginn begann (Abb. 4). Die Konversionsphase war durch erhöhte NfL-Spiegel, jedoch noch normale pNfH-Spiegel gekennzeichnet, während beide bei der symptomatischen Phase erhöht waren. Die intraindividuellen Änderungsraten waren für NfL in der Konversionsphase und für pNfH in der

symptomatischen Phase erhöht, was ihr jeweiliges Potenzial als stadienabhängige dynamische Biomarker innerhalb der Biomarker-Kaskade bei genetischer FTD hervorhebt. Erhöhte NfL-Spiegel und Änderungsraten von NfL ermöglichten die Identifikation präsymptomatischer Probanden, die in die symptomatische Erkrankung übertreten, und die Erfassung der Nähe zum Beginn der Symptome. Wir schätzen stadienabhängige Stichprobengrößen für Studien, die darauf abzielen, Neurofilamentspiegel oder Änderungsraten zu verringern. Zusammenfassend stellen damit NfL und pNfH blutbasierte Biomarker dar für eine dynamische, stadienabhängige Stratifizierung, wodurch die Abgrenzung der Konversionsphase ermöglicht wird; und möglicherweise auch blutbasierte Biomarker für das Therapieansprechen bereits in der präsymptomatischen Phase genetischer FTD. Die vorgeschlagene Biomarker-Kaskade könnte den Weg für einen biomarkerbasierten Ansatz der personalisierten Medizin in der genetischen FTD ebnen. Wir konnten die Ergebnisse in der hochrangigen Fachzeitschrift *Annals of Neurology* veröffentlichen (Wilke et al, 2022).

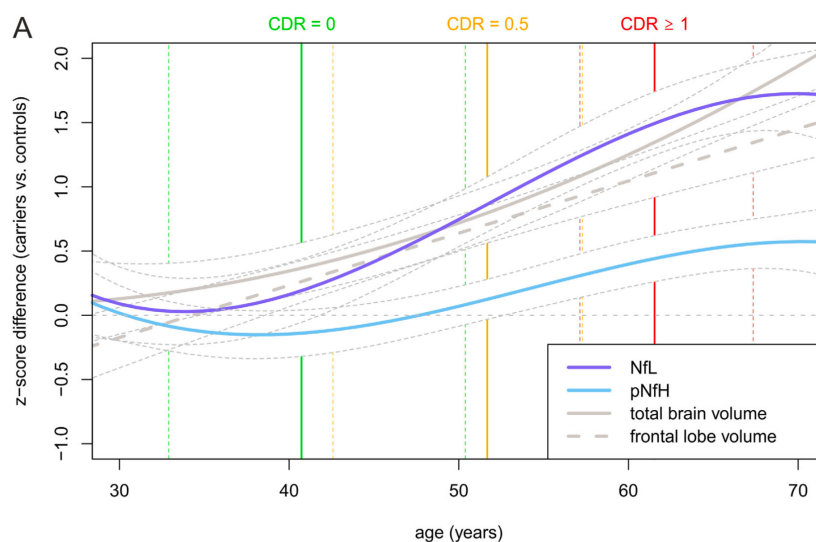


Abb. 4: Biomarker-Kaskade von NfL, pNfH und volumetrischen MRT-Veränderungen über die frühen Clinical Dementia Rating (CDR)-Stadien der genetischen FTD. (A) Zur einheitlichen Bewertung des zeitlichen Verlaufs und der Effektstärke von Biomarker-Veränderungen für jeden einzelnen Biomarker (NfL, pNfH, globales Hirnvolumen und frontales Hirnvolumen) modellierten wir die normalisierten Biomarker-Werte als Polynomfunktionen des Alters der Probanden. Anschließend verglichen wir die Modellvorhersagen für Mutationsträger mit den Modellvorhersagen für Kontrollpersonen gleichen Alters und berechneten die Z-Score-Differenz. Ein Anstieg der Z-Score-Differenz in Richtung positiver Werte zeigt an, dass die Biomarker-Werte in der Gruppe der Mutationsträger pathologischer werden (z. B. Anstieg der Neurofilament-Spiegel und Abnahme der Hirnvolumina). Eine Z-Score-Differenz von null deutet hingegen darauf hin, dass die jeweiligen Biomarker-Werte zwischen Mutationsträgern und Kontrollen nicht unterschiedlich sind. Für jeden Biomarker wird das Konfidenzintervall durch gestrichelte Linien dargestellt. Die farbigen vertikalen Linien markieren das Ausgangsalter (Median und IQR) der Mutationsträger, gruppiert nach Krankheitsstadien (nicht betroffene Träger: CDR plus NACC FTLD = 0, mild betroffene Träger: CDR plus NACC FTLD = 0,5, und eindeutig betroffene Träger: CDR plus NACC FTLD ≥ 1), wie sie in der vorliegenden Kohorte beobachtet wurden (publiziert in: Wilke et al, 2022, *Annals of Neurology*).

Angeht diese vielversprechenden Biomarker-Güte insbesondere von NfL bei genetischer FTD, und hier insbesondere auch bereits in der präsymptomatischen und Konversionsphase, war es unser nächstes Ziel, der Anwendung von NfL als blutbasiertem

Biomarker in künftigen mulizentrischen (Therapie-)Studien bei genetischer FTD den Weg zu bereiten und für diese Anwendung zu validieren. Dafür untersuchten wir im Rahmen einer großen Studie: (1) die Zuverlässigkeit von NfL über verschiedene internationale Labore im GENFI-Konsortium hinweg; (2) die Zuverlässigkeit von NfL zur Stratifizierung von Erkrankungsstadien bei genetische FTD; (3) die Vergleichbarkeit von NfL zwischen Blutmatrizen; und (4) die Stabilität von NfL über verschiedene Rekrutierungsstandorte hinweg. Hierzu führten wir eine vergleichende Analyse der Blut-NfL-Spiegel in n=344 Probanden der GENFI-Kohorte durch (n=148 präsymptomatische, n=11 Konverter, n=46 symptomatische Probanden mit Mutationen in C9orf72, GRN oder MAPT; und n=139 intrafamiliäre Kontrollen), gemessen mit ultrasensitiven Proteinplattformen, in 3 verschiedenen internationalen Laboren. Hier zeigte NfL eine exzellente Konsistenz (Intraklassenkorrelationskoeffizient (ICC) 0,964) (Abb. 5) und eine hohe Zuverlässigkeit über die drei Labore hinweg (maximaler Bias (pg/mL) in der Bland-Altman-Analyse: $1,12 \pm 1,20$). Die hohe Übereinstimmung der NfL-Werte über die Labore hinweg spiegelte sich zudem in hohen Bereichen unter der Kurve wider, die das Konversionsstadium im Vergleich zum (nicht-konvertierenden) präsymptomatischen Stadium in allen drei Laboren diskriminierten. Serum- und Plasma-NfL waren weitgehend vergleichbar (ICC 0,967) (Abb 6). Die Robustheit von NfL über 13 Rekrutierungsstandorte des GENFI-Konsortiums hinweg wurde durch ein Linear Mixed Effect Modell bestätigt. Zusammenfassenden unterstreichen diese Ergebnisse die Eignung von blutbasiertem NfL in Multizenter-Studien für genetische FTD, einschließlich der zuverlässigen Stratifizierung des - für (Therapie-)Studien besonders relevanten - Konversionsstadiums über verschiedene Labore hinweg, der Vergleichbarkeit von NfL der Matrizen; und der Robustheit von NfL über verschiedene Standorte. Auch diese Ergebnisse konnten wir in einer hochrangigen Fachzeitschrift veröffentlichen (JNNP; Linnemann et al, 2024).

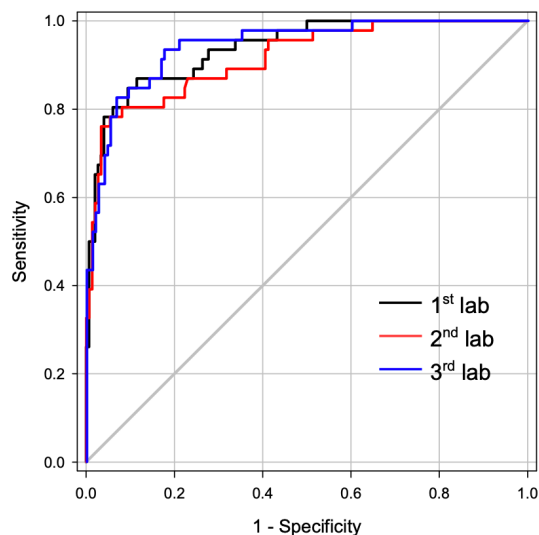


Abb 5: Vergleichbarkeit von blutbasierten NfL-Werten für krankheitsstadienabhängige Cut-offs bei genetischer FTD zwischen verschiedenen Laboren. Vergleichende ROC-Kurvenanalysen und AUC-Werte zwischen den Laboren zur Unterscheidung zwischen präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern (publiziert in: Linnemann et al, 2024, JNNP).

Table 1 Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis with areas under the curve (AUC) and optimal cut-offs for separating different gFTD stages and conditions

gFTD conditions	AUC	SE	Optimal cut-off		
			z-value	Specificity (%)	Sensitivity (%)
Symptomatic carriers versus controls	0.91	0.02	2.83	100	49.5
Converters versus controls	0.89	0.07	3.05	100	42.9
Converters versus presymptomatic carriers	0.86	0.08	3.19	100	42.9
Symptomatic versus presymptomatic carriers	0.88	0.02	3.20	100	46.2
Presymptomatic carriers versus controls	0.57	0.03			
Symptomatic carriers versus converters	0.59	0.10			

Data from lab 1; optimal cut-off values are given as z-values (corrected for age). For the data from lab 2 and 3, see figure 1B and C. gFTD, genetic frontotemporal dementia.

Abb 6: Ergebnisse der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurvenanalyse mit Area under the Curve (AUC) und optimalen Schwellenwerten von blutbasierten NfL-Werten zur Trennung verschiedener Stadien genetischer FTD (publiziert in: Linnemann et al, 2024, JNNP).

Neben diesen neuronalen Biomarkern wurden auch neuroinflammatorische Biomarker mittels gezielter Assays untersucht. Wie oben dargestellt (siehe Abschnitt #1.II.1) unter der Hypothese, dass Neuroinflammation einen wichtigen pathophysiologischen Krankheitsmechanismus bei der FTD darstellt. Spezifisch haben wir hier die Hypothese untersucht, dass diese auch die Aktivierung von Mikroglia umfasst- und dass dieser Prozess durch die ultrasensitive Messung verschiedener glia-abgeleiteter Biomarker im CSF in vivo erfasst werden kann. Dazu untersuchten wir die CSF-Konzentrationen von den glia-abgeleiteten Kandidatenbiomarkern TREM2, YKL-40 und Chitotriosidase mithilfe von ultrasensitiven Immunoassays bei 183 Probanden der GENFI Kohorte (49 C9orf72-Mutationsträger: 36 präsymptomatisch, 13 symptomatisch; 49 GRN-Mutationsträger: 37 präsymptomatisch, 12 symptomatisch; 23 MAPT-Mutationsträger: 16 präsymptomatisch, 7 symptomatisch; 62 mutationsnegative Kontrollen).(Woollacott et al, 2022). Hier zeigten sich die Chitotriosidase-Konzentrationen bei symptomatischen GRN-Mutationsträgern signifikant höher als bei den Kontrollen, mit zudem einer signifikanten negativen Korrelation mit dem MMSE-Score bei präsymptomatischen GRN-Mutationsträgern. Diese Ergebnisse verweisen auf eine differentielle Regulation von glialen Biomarkern bei verschiedenen Formen und Stadien der genetischen FTD.

Darüberhinaus wurde bei der Entwicklung eines gezielten (targeted) Assays speziell für die Erfassung eines bei einem Haupt-Typ genetischer FTD mutierten Proteins- dem C9orf72 Protein – mitgearbeitet; hier mit dem Ziel, durch diesen Assay das C9orf72 Protein als target engagement Biomarker insbesondere für künftige C9orf72-proteinreduzierende Therapieansätze und Therapiestudien verwenden zu können (Wilson et al, 2022, JNNP).. Für die Entwicklung eines Immunoassays zur Messung der entscheidenden C9orf72-Proteinteile der poly(GP)-Dipeptid-Repeat-Proteine (DPRs) - nutzen wir erneut eine ultrasensitive Proteinplattform. Der entwickelte Assay erfüllte umfassende Qualifikationskriterien, darunter: geringe Variabilität innerhalb (intraplate) und zwischen (interplate) den Platten; hohe Präzision und Genauigkeit bei der Messung von Kalibratoren und Proben; bei der Verdünnungsparallelität, und bei der Stabilität gegenüber Proben- und Standard-Einfrier-/Auftauzyklen; zudem keine Interferenzen durch Hämoglobin. Nach dieser Etablierung maßen wir mit diesem Assay die poly-GP Spiegel in CSF Proben von n=40 C9orf72 Probanden und 15 Kontrollen. Der Assay zeigte eine 100%ige Spezifität und 100%ige Sensitivität sowie ein großes Detektionsfenster für Target Engagement. So war das das C9orf72-CSF-Signal mit der niedrigsten poly(GP)-Konzentration achtfach höher als die Werte der Kontrollen. Die Durchschnittswerte der C9orf72-Proben lagen 38-fach höher als die der Kontrollen, die alle unterhalb der Nachweisgrenze des Assays lagen. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ein poly(GP)-DPR-Assay basierend auf ultrasensitiven Plattformen in künftigen

klinischen Studien dazu eingesetzt werden könnte, das Target Engagement von Therapeutika zu bestimmen, die auf die Reduktion von C9orf72-RepeatTranskripten abzielen (Wilson et al, 2022, JNNP).

Überdies initiierten wir die Entwicklung und Implementierung von sog. Seeding-Amplifikations-Protein-Assays für Proteine, die bei neurodegenerativen Erkrankungen wie FTD verändert sein können. Diese sind hochempfindliche und spezifische Assay-Verfahren, die darauf ausgelegt sind, fehlgefaltete und aggregierte Proteine zu detektieren, die insbesondere mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. Sie nutzen hierbei die Fähigkeit pathologischer Proteinaggregate, als Vorlagen (Seeds) zu fungieren und dadurch die Fehlfaltung und Aggregation ihrer normalen Gegenstücke zu induzieren. Die Implementierung gelang uns bereits für das Protein α -Synuclein, welches inhärent bei der Parkinson-Erkrankung und Lewy-Body Demenz verändert ist, aber auch eine relevante Kopathologie bei FTD darstellt (Kadam et al, in preparation). Zudem planen wir die Anwendung dieser Art von Assay auch für das Tau-Protein zu untersuchen, wie ebenfalls für FTD relevant.

Zusammenfassende Modellierungen und Darstellungen der Biomarker-Arbeiten in diesem Projekt

Die vielfältigen und umfangreichen, in den Abschnitten #1.II.1, #1.II.2, #1.II.3 und #1.III dargestellten Biomarker-Ergebnisse konnten wir auch in ersten übergeordneten und zusammenfassenden Modellierungen und Übersichtsarbeiten zusammenfassen.

So konnten wir die ersten Gruppe von Ergebnissen bereits in mehreren übergeordneten datengetriebenen Modellen der Progression von Fluid Protein-Biomarker Veränderungen bei genetischer FTD integrieren, welche jeweils alle hochrangig publiziert werden konnten (van der Ende et al, 2022, BRAIN; Staffaroni et al, 2022, NATURE MEDICINE). Zudem konnten die Fluid Biomarker Ergebnisse in einer ebenfalls hochrangig publizierten Übersichtsarbeit publiziert werden (Swift et al, 2021, JNNP).

2. Wichtigste Finanzpositionen

Die wichtigsten Finanzpositionen des Projekts waren, wie im folgenden dargestellt, Personalausgaben, Verbrauchsmaterialien, sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben und Investitionsmittel. Alle wurden wie folgt entsprechend der Projektbestimmung verwendet:

Nr	Bezeichnung	Verwendungszweck	Verwendung in Projektarbeiten
1	Personalausgaben E12-E15 (F0824)	Doktorandin	Durchführung der Biomarker-Arbeiten (siehe Abschnitt 1.II.1, 1.II.2, 1.II.3, und 1.III)
2	Verbrauchsmaterialien (F0838)	Discovery Proteomik und Transkriptomik, gezielte Biomarker-Analysen, Etablierung Analytik Extrazelluläre Vesikel (EV)	Neuronale und Inflammationsproteine in umfangreichen Projekten (siehe Abschnitt 1.II.1, 1.II.2, 1.II.3, und 1.III)
3	Bioproben aus Zell- und Mausmodellen; (Unterposition zu „Sonstige allgemeine	Proteom-Analysen, EV und non-EV basiert	Proteom-Analysen (siehe Abschnitt 1.II.3)

	Verwaltungsausgaben (F0843)“)		
4	Proteinbiochemische Geräte-Plattform, singulex high sensitivity Assay System Singulex SMCx PRO (Unterposition zu „Gegenstände & andere Investitionen (F0850)“)	Gezielte multiplex Protein-Biomarker Immunoassay Untersuchungen	Neuronale und Inflammationsproteine in umfangreichen Projekten (siehe Abschnitt 1.II.1, 1.II.3, und 1.III)
5	Proteinbiochemische Geräte-Plattform, multimode Microplate Reader FLUOstar Omega (Unterposition zu „Gegenstände & andere Investitionen (F0850)“)	Gezielte Protein-Biomarker Immunoassay Untersuchungen	Neuronale Proteine in gezielten Projekten (siehe Abschnitt 1.II.3, und 1.III)

3. • Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Wie im in den vorstehenden detaillierten Darstellungen der Arbeiten, Ergebnisse und Publikationsreichweite ersichtlich, hat die Arbeit von GENFI-prox und insbesondere diesem Teilprojekt die Biomarker-Arbeiten zu genetischer FTD- und hier insbesondere dem präsymptomatischen Stadium- in einer internationalen Spitzenposition positioniert. Spezifisch hat sie:

1. Die weltweit größte longitudinale, tief charakterisierte Kohorte genetischer FTD-Patienten aufgebaut, mit besonders außergewöhnlich großem Schwerpunkt auf überwiegend präsymptomatische Probanden, inklusive longitudinaler multimodaler Charakterisierung und assoziierter, ebenfalls longitudinaler Multi-Matrix-Biomaterialien-Sammlung.
2. Definitionen, Modelle sowie kognitive, digitale und bildgebende Marker für die Erfassung insbesondere des präsymptomatischen Stadiums der genetischen FTD etabliert und beginnend validiert.
3. Durch hypothesenfreie wie auch gezielte Untersuchungen eine große Anzahl von molekularen Kandidaten-Biomarkern, wie -für erste vielversprechendeste Biomarker-mittlerweile auch schon trial-ready validierte molekulare Biomarker identifizieren können.

Damit trägt dieses Teilprojekt und Gesamtverbundvorhaben maßgeblich zur translationalen Erforschung der FTD bei, und hier insbesondere der molekularen Charakterisierung des Verlaufs, und maßgeblichen Vorbereitung von Therapiestudien und Therapie-Outcome-Parametern bei genetischer FTD. Damit wird dazu beigetragen, dass Industrie und Entscheidungsträger:innen leichter und vermehrt Maßnahmen -insbesondere mechanistisch orientierte Therapiestudien mit krankheitsmodifizierenden Hoch-Effekt-Substanzen- zur Verbesserung der Therapie von Menschen mit FTD ergreifen. Eine erhöhte Sichtbarkeit der FTD und möglicher Therapiestudienansätze und -outcomes wird sich zudem auf ein besseres Verständnis und vermehrte Förderung dieser -bisher mechanistisch nicht behandelbaren – Erkrankungsgruppe auswirken; dieses nicht nur bei möglichen Förderern bei weiteren Antragstellungen, sondern vor allem insgesamt medizinisch, wissenschaftlich und gesellschaftlich.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Es wurde die weltweit größte longitudinale, tief charakterisierte Kohorte genetischer FTD-Patienten auf- und ausgebaut, mit besonders außergewöhnlich großem Schwerpunkt auf überwiegend präsymptomatische Probanden, inklusive longitudinaler multimodaler Charakterisierung und assoziierter, ebenfalls longitudinaler Multi-Matrix-Biomaterialien-Sammlung. Dieser Ausbau der zentralen Infrastruktur und Ressourcen, der unter maßgeblicher Mitbeteiligung dieses Teilprojekts geschaffen wurde, stellt einen bedeutenden Mehrwert für zukünftige Forschungsprojekte mit Fokus auf Pathophysiologie, Translation und klinische Studien bei genetischer FTD dar -insbesondere im (wohl therapierelevantesten) präsymptomatischen Stadium der Erkrankung, wo noch die wahrscheinlich größten Therapieeffektgrößen erreicht werden können, noch bevor die zugrundeliegende Neurodegeneration maßgeblich begonnen hat. Hierbei ermöglichen Probandeneinverständnis und Kooperationsvereinbarungen sowohl Kooperationen mit akademischen Wissenschaftlern als auch mit pharmazeutisch-forschender Industrie.

Durch Anbindung der GENFI-prox Infrastruktur an existierende internationale Strukturen (z.B. die weltweite FTD Prevention Initiative, FPI, <https://thefpi.org>; zudem EU SOLVE-RD) wird eine Sekundärnutzung der Ressourcen zu wissenschaftlichen Zwecken nicht nur ermöglicht, sondern aktiv gefördert. Die direkte Umsetzbarkeit und Erfolg dieses globalen Teilens wissenschaftlicher Daten, die u.a. von unserem Verbundvorhaben erhoben wurden, haben wir bereits durch mehrere high impact Publikationen- noch während der Projektlaufzeit- belegt (zB Staffaroni et al, 2022, Nat Med). Die von uns generierten Proteom- und Transkriptomdaten – sowohl aus neuronalen Modellen wie auch aus Patienten-Biofluids werden im Rahmen internationaler Forschungsplattformen anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt. Ebenso sind die generierten Zelllinien und gezielte Datensätze auf Anfrage verfügbar. Die von uns entwickelten und optimierten Protokolle zur EV-Analytik stellen informative, robuste Methodenprotokolle dar, die für viele Labore künftig relevant sein werden.

Durch unsere Arbeit dieses Verbundvorhabens wurden Definitionen, Modelle sowie kognitive, digitale und bildgebende Marker für die Erfassung insbesondere des präsymptomatischen Stadiums der genetischen FTD etabliert und beginnend validiert. Diese sind entscheidend für ein Stadien-Modell der genetischen FTD- welches wiederum für Industrie und Regulatoren (C-Path, FDA, EMA) unmittelbar für die Therapieentwicklung und -regulation entscheidend sein wird. Dieses ist durch die Stadien-Modell-Entwicklung bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen (zB Chorea Huntington) jüngst deutlich geworden.

Durch unsere hypothesenfreien wie auch gezielten Proteomik- und Transkriptomik-Untersuchungen konnte eine große Anzahl von molekularen Kandidaten-Biomarkern identifiziert werden; erste vielversprechendeste Biomarker haben wir zudem – gerade durch unser Teilprojekt -auch schon maßgeblich als trial-ready molekulare Biomarker validieren können (z.B. NfL). Damit konnte nicht nur der Verlauf der genetischen FTD molekular charakterisiert werden, sondern auch schon maßgeblich zur Vorbereitung von Therapiestudien und Therapie-Outcome-Parametern bei genetischer FTD bei getragen werden. So gibt es bereits eine große, kontinuierlich zunehmende Anfrage nach Nutzung

unserer multimodalen GENFI-Daten seitens vieler pharmazeutisch-forschender Unternehmen, so z.B.: Prevail, Alector, GSK, und PassageBio.

Die begonnenen Projekte und Analysen werden alle im Rahmen des fortgesetzt existierenden, ja sogar weiter wachsenden GENFI-Konsortiums fortgeführt, so dass eine Fortsetzung der Projekte gesichert ist. Durch Intensivierung der Zusammenarbeiten mit nationalen und internationalen *sporadischen* FTD-Kohorten (z.B. der DZNE FTD-DESCRIBE Kohorte) wird zudem nicht nur eine weitere Anwendung, sondern auch wissenschaftlich und medizinisch relevante Validierung der in GENFI-prox getroffenen Erkenntnisse auch bei -den noch häufigeren -sporadischen Formen der künftig untersucht werden. Somit kann die erfolgreiche Arbeit unseres Verbundvorhabens nicht nur fortgesetzt, sondern sogar noch weiter erweitert werden.

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

Von Bedeutung für die in GENFI-prox geplanten Projekte war insbesondere die zunehmende Intensivierung der globalen Vernetzung im Bereich genetischer FTD. Hier erfolgte insbesondere – auch durch intensive Führung und Zusammenarbeit von unserem Verbundprojekte- der Auf- und Ausbau der FTD Prevention Initiative (FPI; <https://thefpi.org>). Hier konnten wir -nunmehr auf globaler Ebene- drei Hauptziele im Bereich der translationalen Erforschung und Versorgung von genetischer FTD verfolgen: (1) Einheitliche Standards für klinische Studien: Entwicklung und Implementierung von standardisierten Vorgehensweisen für klinische Studien bei familiären FTD-Syndromen, um die Vergleichbarkeit und Qualität der Forschung zu gewährleisten. (2) Internationales Teilnehmerregister: Aufbau einer globalen Datenbank mit Forschungsteilnehmern aus Familien mit FTD, die potenziell für klinische Studien infrage kommen, um die Rekrutierung zu erleichtern und die Studienbasis zu erweitern. (3) Förderung verantwortungsvollen Datenaustauschs: Ermöglichung und Unterstützung eines verantwortungsvollen Datenaustauschs im Rahmen von Beobachtungsstudien und klinischen Prüfungen bei familiärer FTD, um den wissenschaftlichen Fortschritt zu beschleunigen und die Entwicklung neuer Therapien zu fördern. Diese 3 Arbeitsbereiche werden dazu beitragen, die Forschung zu FTD zu intensivieren und die Entwicklung wirksamer Präventions- und Behandlungsstrategien bei FTD voranzutreiben.

Ähnlich ist die Zusammenarbeit von den Partnern unseres Verbundvorhabens mit dem - parallel zu unserem Projekt wachsenden- Europäischen Referenznetzwerks für Seltene Erkrankungen (ERN-RND) und die Förderung des Horizon 2020 Projekts SOLVE-RD zu sehen. Hier wirken mehrere GENFI-Prox Principle Investigators mit, und es erfolgt ein Wissens-, Methoden- und Datenaustausch. Die Zusammenarbeit mit diesen Großprojekten ermöglichte eine weitere Internationalisierung der Verbundarbeit und Nutzung vielfältiger Synergien zur Erreichung der Projektziele. Diese Zusammenarbeit wird auch in den kommenden Jahren fortgesetzt werden (dann zB auch in Folgeprojekten, zB dem EU Projekt ERDERA).

6. Publikationen

Die folgenden Veröffentlichungen beziehen sich auf Forschungsergebnisse, die in der Förderperiode des GENFI-prox Konsortiums im Rahmen des hier berichteten Teilprojekts unter Mitarbeit von dem Leiter des Teilprojekts (Matthis Synofzik) erarbeitet wurden. Arbeiten mit spezifischer Berücksichtigung der Fluid Biomarker-Arbeiten sind noch einmal besonders (*) gekennzeichnet.

Insgesamt sind unter Leitung oder Mitarbeit des Teilprojekts Förderkennzeichen 23 Publikationen in peer-reviewed Journalen entstanden, mit einem kumulativen ImpactFactor von >200 IF.

Zudem sind weitere Publikationen sind aus dem aktuellen Teilprojekt geplant:

1. Kadam et al: EV-based vs non-EV-based neuronal proteomics in genetic FTD: a comparative approach in iPSc-derived neurons from C9orf72, GRN, and MAPT.
2. Kadam et al: EV-based vs non-EV-based CSF proteomics in genetic FTD: a comparative approach from C9orf72, GRN, and MAPT.

Bereits publizierte Manuskripte:

1. Conceptual framework for the definition of preclinical and prodromal frontotemporal dementia. Benussi A, Alberici A, Samra K, Russell LL, Greaves CV, Bocchetta M, Ducharme S, Finger E, Fumagalli G, Galimberti D, Jiskoot LC, Le Ber I, Masellis M, Nacmias B, Rowe JB, Sanchez-Valle R, Seelaar H, **Synofzik M**; GENFI Consortium, Rohrer JD, Borroni B. *Alzheimers Dement.* 2022 Jul;18(7):1408-1423.
2. Diagnostic accuracy of research criteria for prodromal frontotemporal dementia. **Benussi A**, Premi E, Grassi M, Alberici A, Cantoni V, Gazzina S, Archetti S, Gasparotti R, Fumagalli GG, Bouzigues A, Russell LL, Samra K, Cash DM, Bocchetta M, Todd EG, Convery RS, Swift I, Sogorb-Esteve A, Heller C, van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce RJ, Graff C, , **Synofzik M**, [...], Rohrer JD, Borroni B; Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI). *Alzheimers Res Ther.* 2024 Jan 12;16(1):10. (*)
3. Cognitive composites for genetic frontotemporal dementia: GENFI-Cog. Poos JM, Moore KM, Nicholas J, Russell LL, Peakman G, Convery RS, Jiskoot LC, van der Ende E, van den Berg E, Papma JM, Seelaar H, Pijnenburg YAL, Moreno F, Sanchez-Valle R, Borroni B, Laforce R, Masellis M, Tartaglia C, Graff C, Galimberti D, Rowe JB, Finger E, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI). *Alzheimers Res Ther.* 2022 Jan 19;14(1):10.
4. Longitudinal Cognitive Changes in Genetic Frontotemporal Dementia Within the GENFI Cohort. Poos JM, MacDougall A, van den Berg E, Jiskoot LC, Papma JM, van der Ende EL, Seelaar H, Russell LL, Peakman G, Convery R, Pijnenburg YAL, Moreno F, Sanchez-Valle R, Borroni B, Laforce R Jr, Doré MC, Masellis M, Tartaglia MC, Graff C, Galimberti D, Rowe JB, Finger E, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI). *Neurology.* 2022 Jul 19;99(3):e281-e295.

5. An Automated Toolbox to Predict Single Subject Atrophy in Presymptomatic Granulin Mutation Carriers. Premi E, Costa T, Gazzina S, Benussi A, Cauda F, Gasparotti R, Archetti S, Alberici A, van Swieten JC, Sanchez-Valle R, Moreno F, Santana I, Laforce R, Ducharme S, Graff C, Galimberti D, Masellis M, Tartaglia C, Rowe JB, Finger E, Tagliavini F, de Mendonça A, Vandenberghe R, Gerhard A, Butler CR, Danek A, **Synofzik M**, [...],Rohrer JD, Borroni B; GENFI Consortium Members. J Alzheimers Dis. 2022;86(1):205-218
6. Structural MRI predicts clinical progression in presymptomatic genetic frontotemporal dementia: findings from the GENetic Frontotemporal dementia Initiative cohort. Bocchetta M, Todd EG, Bouzigues A, Cash DM, Nicholas JM, Convery RS, Russell LL, Thomas DL, Malone IB, Iglesias JE, van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Borroni B, Galimberti D, Sanchez-Valle R, Laforce R, Moreno F, **Synofzik M**, [...],Rohrer JD; Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI). Brain Commun. 2023 Mar 10;5(2):fcad061.
7. Early neurotransmitters changes in prodromal frontotemporal dementia: A GENFI study. Premi E, Pengo M, Mattioli I, Cantoni V, Dukart J, Gasparotti R, Buratti E, Padovani A, Bocchetta M, Todd EG, Bouzigues A, Cash DM, Convery RS, Russell LL, Foster P, Thomas DL, van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Galimberti D, Sanchez-Valle R, Laforce R Jr, Moreno F, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD, Borroni B; Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI). Neurobiol Dis. 2023 Apr;179:106068. (*)
8. Network structure and transcriptomic vulnerability shape atrophy in frontotemporal dementia. Shafiei G, Bazinet V, Dadar M, Manera AL, Collins DL, Dagher A, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R, Graff C, **Synofzik M**, [...],Rohrer JD, Misic B, Ducharme S; Frontotemporal Lobar Degeneration Neuroimaging Initiative (FTLDNI); GENetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI).Brain. 2023 Jan 5;146(1):321-336.
9. Differential impairment of cerebrospinal fluid synaptic biomarkers in the genetic forms of frontotemporal dementia. Sogorb-Esteve A, Nilsson J, Swift IJ, Heller C, Bocchetta M, Russell LL, [...], **Synofzik M**, [...],Rohrer JD. Alzheimers Res Ther. 2022;14(1):118. (*)
10. Inflammatory plasma profile in genetic symptomatic and presymptomatic Frontotemporal Dementia - A GENFI study. Fenoglio C, Serpente M, Arcaro M, Carandini T, Sacchi L, Pintus M, [...] **Synofzik M**, [...], Galimberti D . Brain Behav Immun. 2024;122:231-40. (*)
11. Long Non-Coding RNA Profile in Genetic Symptomatic and Presymptomatic Frontotemporal Dementia: A GENFI Study. Serpente M, Fenoglio C, Arcaro M,

Carandini T, Sacchi L, Pintus M, [...], **Synofzik M**, [...], Galimberti D. *J Alzheimers Dis.* 2024;100(s1):S187-S96. (*)

12. Data-driven staging of genetic frontotemporal dementia using multi-modal MRI. McCarthy J, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R Jr, Graff C, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD, Iturria-Medina Y, Ducharme S; GENetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). *Hum Brain Mapp.* 2022 Apr 15;43(6):1821-1835. (*)
13. Fluid biomarkers in frontotemporal dementia: past, present and future. Swift IJ, Sogorb-Esteve A, Heller C, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2021 Feb;92(2):204-215. (*)
14. A panel of CSF proteins separates genetic frontotemporal dementia from presymptomatic mutation carriers: a GENFI study. Bergström S, Öijerstedt L, Remnestål J, Olofsson J, Ullgren A, Seelaar H, van Swieten JC, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD, Månberg A, Graff C, Nilsson P; Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). *Mol Neurodegener.* 2021 Nov 27;16(1):79. (*)
15. Stratifying the Presymptomatic Phase of Genetic Frontotemporal Dementia by Serum NfL and pNfH: A Longitudinal Multicentre Study. Wilke C, Reich S, van Swieten JC, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R, Graff C, Galimberti D, Rowe JB, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, Vandenberghe R, de Mendonça A, Tagliavini F, Santana I, Ducharme S, Butler CR, Gerhard A, Levin J, Danek A, Otto M, Frisoni G, Ghidoni R, Sorbi S, Bocchetta M, Todd E, Kuhle J, Barro C; Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI), Rohrer JD, **Synofzik M**. *Ann Neurol.* 2022 Jan;91(1):33-47. (*)
16. CSF glial markers are elevated in a subset of patients with genetic frontotemporal dementia. Woollacott IOC, Swift IJ, Sogorb-Esteve A, Heller C, Knowles K, Bouzigues A, Russell LL, Peakman G, Greaves CV, Convery R, Heslegrave A, Rowe JB, Borroni B, Galimberti D, Tiraboschi P, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, van Swieten JC, Seelaar H, Jiskoot L, Sorbi S, Butler CR, Graff C, Gerhard A, Laforce R, Sanchez-Valle R, de Mendonça A, Moreno F, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD; Genetic FTD Initiative, GENFI. *Ann Clin Transl Neurol.* 2022 Nov;9(11):1764-1777. (*)
17. Elevated CSF and plasma complement proteins in genetic frontotemporal dementia: results from the GENFI study. van der Ende EL, Heller C, Sogorb-Esteve A, Swift IJ, McFall D, Peakman G, Bouzigues A, Poos JM, Jiskoot LC, Panman JL, Papma JM, Meeter LH, Dopfer EGP, Bocchetta M, Todd E, Cash D, Graff C, Synofzik M, Moreno F, Finger E, Sanchez-Valle R, Vandenberghe R, Laforce R Jr, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Butler C, Ducharme S, Gerhard A, Danek A, Levin J, Pijnenburg YAL, Otto M, Borroni B, Tagliavini F, de Mendonça A, Santana I, Galimberti D, Sorbi S, Zetterberg H, Huang E, van Swieten JC, Rohrer JD, Seelaar H; Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). *J Neuroinflammation.* 2022 Sep 5;19(1):217. (*)

18. Development of a sensitive trial-ready poly(GP) CSF biomarker assay for C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. Wilson KM, Katona E, Glaria I, Carcolé M, Swift IJ, Sogorb-Esteve A, Heller C, Bouzigues A, Heslegrave AJ, Keshavan A, Knowles K, Patil S, Mohapatra S, Liu Y, Goyal J, Sanchez-Valle R, Laforce RJ, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD, Isaacs AM; Genetic FTD Initiative (GENFI). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2022 Jul;93(7):761-771. (*)
19. Altered plasma protein profiles in genetic FTD - a GENFI study. Ullgren A, Öijerstedt L, Olofsson J, Bergström S, Remnestål J, van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R, **Synofzik M**, [...],C, Rohrer JD, Månberg A, Nilsson P, Graff C; Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). *Mol Neurodegener*. 2023 Nov 15;18(1):85. (*)
20. NfL reliability across laboratories, stage-dependent diagnostic performance and matrix comparability in genetic FTD: a large GENFI study. Linnemann C, Wilke C, Mengel D, Zetterberg H, Heller C, Kuhle J, Bouzigues A, Russell LL, Foster PH, Ferry-Bolder E, Van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Moreno F, Borroni B, Sánchez-Valle R, Galimberti D, Laforce R Jr, Graff C, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Finger E, Vandenberghe R, de Mendonca A, Butler CR, Gerhard A, Ducharme S, Ber ILE, Tiraboschi P, Santana I, Pasquier F, Levin J, Otto M, Sorbi S, Rohrer JD, **Synofzik M**; GENFI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2024 Aug 16;95(9):822-828. (*)
21. Temporal order of clinical and biomarker changes in familial frontotemporal dementia. Staffaroni AM, Quintana M, Wendelberger B, Heuer HW, Russell LL, Cobigo Y, [...], **Synofzik M**, [...], et al. *Nat Med*. 2022;28(10):2194-206. (*)
22. A data-driven disease progression model of fluid biomarkers in genetic frontotemporal dementia. van der Ende EL, Bron EE, Poos JM, Jiskoot LC, Panman JL, Papma JM, Meeter LH, Dopfer EGP, Wilke C, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD, Klein S, van Swieten JC, Venkatraghavan V, Seelaar H; GENFI consortium. *Brain* 2022 Jun 3;145(5):1805-1817. (*)
23. Characterizing the Clinical Features and Atrophy Patterns of MAPT-Related Frontotemporal Dementia With Disease Progression Modeling. Young AL, Bocchetta M, Russell LL, Convery RS, Peakman G, Todd E, Cash DM, Greaves CV, van Swieten J, Jiskoot L, Seelaar H, Moreno F, Sanchez-Valle R, Borroni B, Laforce R Jr, Masellis M, Tartaglia MC, Graff C, Galimberti D, Rowe JB, Finger E, **Synofzik M**, [...], Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI). *Neurology*. 2021 Aug 31;97(9):e941-e952.