

# Schlussbericht

## Teil I – Kurzbericht (wird veröffentlicht)

Zuwendungsempfänger: Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE) in der Helmholtz-Gemeinschaft

Standort: DZNE, Standort Tübingen

Förderkennzeichen (FKZ): 01ED2202

Vorhaben: SynaDeg – Prädiagnostische frühe synaptische Störungen bei neurodegenerativen Erkrankungen (JPND Call 2021)

Laufzeit: 01.06.2022 – 31.08.2025 (DZNE Deutschland; an Konsortial-Enddatum angepasst)

Projektleitung: Prof. Dr. Thomas Gasser

Adresse: Otfried-Müller-Str. 23, 72076 Tübingen, Deutschland

Datum: 2026-02-28

### 1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen (Kurzfassung)

SynaDeg adressiert frühe (prädiagnostische) synaptische und physiologische Störungen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Ziel ist die Verbesserung der frühen Identifikation und Differenzialdiagnostik von frontotemporaler Demenz (FTD) und Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), die Identifikation von CSF- und blutbasierten Biomarkern für synaptische Dysfunktion sowie die mechanistische und funktionelle Charakterisierung in patientenabgeleiteten Modellsystemen.

DZNE Tübingen leistete hierzu insbesondere Beiträge im WP3-Kontext durch den Aufbau und Betrieb humaner iPSC-Neuronen-Modellplattformen, transkriptomische Analysen über genetische FTD-Hintergründe (u. a. C9orf72, MAPT, GRN) sowie Perturbationsansätze zur Zielpriorisierung und Validierung.

### 2. Ablauf des Vorhabens

Der deutsche Projektstart erfolgte am 01.06.2022; das Projektende wurde auf 31.08.2025 an das Konsortium angepasst. DZNE trug primär zu WP3 (Mechanismen/Pathologien synaptischer Dysfunktion) bei und lieferte Proben/Assay-Unterstützung an Schnittstellen zu WP2 (Biomarker).

### 3. Wesentliche Ergebnisse (DZNE)

DZNE etablierte iPSC-neuronale Modelle mit multi-modaler Phänotypisierung (molekular/pathologisch und funktionell) inklusive Readouts für RNA-Foci, DPR-Level und elektrophysiologisch basierte Netzwerkaktivität (MEA). Ein großskaliger CRISPRa-Transkriptionsfaktor-Screen (1.600 TFs) identifizierte mehrere Kandidatenregulatoren der DPR-Produktion; Hit-Gen-Namen werden in diesem öffentlich zugänglichen Bericht aufgrund laufender Validierung/IP-Aspekte nicht genannt.

#### 4. Veröffentlichungen und Dissemination (Auswahl)

##### Publikationen:

- Huber N et al. Frontotemporal dementia patient-derived iPSC neurons show cell pathological hallmarks and evidence for synaptic dysfunction and DNA damage. *Molecular Psychiatry*. Online publiziert am 26.09.2025. doi:10.1038/s41380-025-03272-x.
- C9orf72 iPSC-Mikroglia Preprint: bioRxiv (doi:10.1101/2024.08.14.607573), in finaler Überarbeitung für *Cell Reports*.
- Large-scale CRISPRa-Transkriptionsfaktor-Screen (1.600 TFs) zur Regulation der DPR-Produktion in patientenabgeleiteten iPSC-Neuronen: Manuskript in Vorbereitung (Hit-Gen-Namen werden aufgrund laufender Validierung/IP-Aspekten nicht genannt).

##### Ausgewählte Vorträge/Poster/Outreach:

- Neuro series / iPSC Seminars: Early Drug Discovery Unity (EDDU) (05.11.2023; Online (hosted in Montreal, Kanada))
- Local NeuroCampus Get-Together (Open Lab / Lab tour) (25.07.2023; DZNE Tübingen, Deutschland)
- Third European C9orf72 Workshop (22.–23.02.2024; München, Deutschland)
- Discovery 2024 & Automate 2024 Europe (22.–23.05.2024; Basel, Schweiz)
- Program-oriented Funding Review am DZNE Bonn – Poster (14.–16.01.2025; Bonn, Deutschland)
- World Parkinson's Day: DPG Workshop – Poster (10.–11.04.2025; Tübingen, Deutschland)
- Cellular Mechanisms of Neurodegeneration – Poster (22.–24.10.2025; Eibsee, Deutschland)

Wissenstransfer und Kapazitätsaufbau wurden u. a. über WP4-Personalmobilität unterstützt (Trainingsaufenthalt am DZNE: 07.03.2024–05.06.2024). DZNE hostet zudem fortlaufend externe Teams für Trainings zu iPSC-Neuronen-Protokollen und Assays; ein dreimonatiger EMBO-Fellowship-Gastaufenthalt ist für 2026 bewilligt.

## **Schlussbericht**

### **Teil II – Eingehende Darstellung (wird veröffentlicht)**

Zuwendungsempfänger: Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V.

(DZNE) in der Helmholtz-Gemeinschaft

Standort: DZNE, Standort Tübingen

Förderkennzeichen (FKZ): 01ED2202

Vorhaben: SynaDeg – Prädiagnostische frühe synaptische Störungen bei neurodegenerativen Erkrankungen (JPND Call 2021)

Laufzeit: 01.06.2022 – 31.08.2025 (DZNE Deutschland; an Konsortial-Enddatum angepasst)

Projektleitung: Prof. Dr. Thomas Gasser

Adresse: Otfried-Müller-Str. 23, 72076 Tübingen, Deutschland

Datum: 2026-02-28

#### **1. Eingehende Darstellung der Arbeiten (DZNE-Fokus)**

Die DZNE-Arbeiten waren primär WP3-zugeordnet (mechanistische Studien in patientenabgeleiteten iPSC-Modellen) und unterstützten WP2 durch Bereitstellung von Proben und Assay-Know-how. Die Anpassung des Projektendes auf 31.08.2025 diente der Synchronisierung der Partnerenddaten sowie dem Abschluss/der Validierung von Perturbationsarbeiten.

#### **2. Ergebnisse nach Arbeitsbereichen**

##### **2.1 iPSC-Neuronen-Plattform und Reifung für Langzeit-Phänotypisierung**

DZNE etablierte eine skalierbare iPSC-Neuronen-Plattform (NGN2-basierte Differenzierung mit Astrozyten-Unterstützung) für eine mehrwöchige Reifung. Dies ermöglichte longitudinale Messungen sowie robuste Quantifizierung C9orf72-assoziiierter pathologischer Endpunkte (RNA-Foci, DPR-Level) und die Erfassung der Netzwerkaktivität mittels MEA.

##### **2.2 Konvergente transkriptomische Signaturen über genetische FTD-Hintergründe**

RNA-Sequenzierung über iPSC-Neuronen mit relevanten genetischen FTD-Hintergründen (C9orf72, MAPT, GRN) identifizierte konvergente dysregulierte Signaturen und priorisierte synapsenrelevante Kandidaten für funktionelle Folgearbeiten. Validierungsexperimente sind in Arbeit.

##### **2.3 Perturbationsansätze: CRISPR-basiert und pharmakologisch**

DZNE setzte CRISPR-basierte Perturbationsansätze und pharmakologische Perturbationen ein, um kausale Zusammenhänge zwischen Kandidaten und Phänotypen zu testen. Decitabin, zuvor in unabhängiger Arbeit als Substanz identifiziert, die C9orf72-assoziierte DPR-Pathologie reduzieren kann, wurde hier als explorative/referenzierende pharmakologische Perturbation eingesetzt, um pathologische Endpunkte (RNA-Foci und DPR-Level) zu benchmarken. Als zusätzlicher Readout wurde die elektrophysiologisch

basierte Netzwerkaktivität ausgewertet; unter den getesteten Bedingungen zeigten sich keine konsistent verbesserten Effekte auf die Netzwerkaktivität. Dies diente der Schärfung der Readout-Auswahl und der Planung von Folgeexperimenten.

#### 2.4 Großskaliger CRISPRa-Screen (1.600 TFs)

Ein großskaliger CRISPRa-Screen (1.600 Transkriptionsfaktoren) identifizierte mehrere Kandidatenregulatoren der DPR-Produktion. Konkrete Hit-Gen-Namen werden aufgrund laufender Validierung und möglicher IP-Aspekte nicht aufgeführt. Hits werden orthogonal validiert und phänotypisch erweitert untersucht.

#### 2.5 Schnittstelle zur synaptischen Biomarker-Analytik (WP2)

DZNE stellte konditionierte Medien und Lysate aus iPSC-Modellen für synaptische Biomarker-Analysen bereit und unterstützte harmonisierte DPR-Quantifizierung (z. B. MSD-basierte Assays). Eine zentrale Limitation war, dass synaptische Proteine in iPSC-abgeleiteten Medien häufig unterhalb der Nachweisgrenzen MS-basierter Panels lagen. Für Folgearbeiten sind Anreicherungsstrategien (z. B. Immunpräzipitation) und/oder hochsensitive Immunoassays sinnvoll.

### 3. Veröffentlichungen, Dissemination und Wissenstransfer

Publikationen (direkte Projektergebnisse):

1. Huber N, Hietanen T, Heikkinen S, Shakirzyanova A, Hoffmann D, Rostalski H, Dhingra A\*, Rodriguez-Nieto S\*, Kärkkäinen S, Koskivi M, Korhonen E, Hartikainen P, Pylkäs K, Krüger J, Malm T, Takalo M, Hiltunen M, Koistinaho J, Portaankorva AM, Solje E, Haapasalo A. **Frontotemporal dementia patient-derived iPSC neurons show cell pathological hallmarks and evidence for synaptic dysfunction and DNA damage.** *Molecular Psychiatry*. Online publiziert am 26.09.2025. doi:10.1038/s41380-025-03272-x. (\* DZNE Tübingen)
2. Rostalski H, Hietanen T, Hoffmann D, Heikkinen S, Huber N, Dhingra A\*, Rodriguez-Nieto S\*, Kuulasmaa T, Ohtonen S, Jäntti H, Pekkala V, Leskelä S, Mäkinen P, Katisko K, Hartikainen P, Lehtonen Š, Solje E, Koistinaho J, Malm T, Portaankorva AM, Natunen T, Martiskainen H, Takalo M, Hiltunen M, Haapasalo A. **C9orf72 repeat expansion-carrying iPSC-microglia from FTD patients show increased phagocytic activity concomitantly with decreased number of autophagosomal-lysosomal vesicles.** bioRxiv Preprint (doi:10.1101/2024.08.14.607573); *Cell Reports* angenommen vorbehaltlich kleiner Änderungen. (\* DZNE Tübingen)
3. **Large-scale CRISPRa-Transkriptionsfaktor-Screen (1.600 TFs)** zur Regulation der DPR-Produktion in patientenabgeleiteten iPSC-Neuronen: Manuskript in Vorbereitung (Hit-Gen-Namen werden aufgrund laufender Validierung und IP-Aspekten nicht genannt). **DZNE Tübingen leitet die Veröffentlichung.**

## Ausgewählte Disseminationsaktivitäten: Vorträge, Workshops, Posterbeiträge und Öffentlichkeitsarbeit (DZNE, Tübingen; Vortragender: Ashutosh Dhingra)

- **Vortrag** – iPSZürich Lecture Series 2023 – **01.10.2023** – Online (hosted in Zurich, Switzerland) – *Drug screen in iPSC-Neurons identifies nucleoside analogs as inhibitors of (G4C2)<sub>n</sub> expression in C9orf72 ALS/FTD*
- **Vortrag** – Neuro series, iPSC Seminars: Early Drug discovery Unity (EDDU) – **05.11.2023** – Online (hosted in Montreal, Canada) – *Drug screen in iPSC-Neurons with (G4C2)<sub>n</sub> HRE mutations in C9orf72 ALS/FTD*
- **Laborführungen (Open Lab)** – Local NeuroCampus Get-Together, open lab – **25.07.2023** – DZNE, Tübingen – *Highlighted automated cell culture robot and imaging possibility with iPSC-neurons*
- **Vortrag** – Third European C9orf72 workshop (Feb 22–23) – **22.–23.02.2024** – Munich, Germany – *CRISPR-activation toolbox to study genes linked to neurodegeneration linked to C9orf72 mutations*
- **Vortrag** – “Stem Cells In Neuroscience” meeting in Tübingen – **10.–11.03.2024** – Tübingen, Germany – *Cellomics toolbox for hiPSC-neurons based screenings*
- **Vortrag** – Discovery 2024 & Automate 2024 Europe – **22.–23.05.2024** – Basel, Switzerland – *Cellomics Platform Using Patient-Derived iPSC Neurons-Based Screenings For Drug Discovery*
- **Tutorial/Workshop** – Imaging “Discussion Round” at DZNE-Tuebingen Annual retreat – **14.06.2024** – Tübingen, Germany – *Tutorial on automated imaging and image analysis of neurite outgrowth and RNA foci*
- **Poster** – Program-oriented Funding, Review at DZNE Bonn (represented DZNE-Tuebingen location as early stage researcher) – **14.–16.01.2025** – Bonn, Germany – *Large-Scale CRISPR Activation Screen Identifies Transcription Factors Regulating DPR Production from C9orf72 (G4C2)<sub>n</sub> Repeat Expansion in Patient iPSC-Derived Neurons*
- **Poster** – World Parkinson’s Day: DPG Workshop on April – **10.–11.04.2025** – Tübingen, Germany – *Effective and scalable dopaminergic neuron differentiation protocol from smNPCs and downstream screening applications.*
- **Vortrag** – nICLAS Forum (Fraunhofer IPA and LAN – Lab Automation Network) – **08.–09.10.2025** – Fraunhofer IPA, Stuttgart, Germany – *Neurons in a Dish: A Cellomics Approach Using iPSC-neurons for Neurodegenerative Diseases Drug Discovery.*
- **Poster** – “CELLULAR MECHANISMS OF NEURODEGENERATION” – **22.–24.10.2025** – Eibsee, Germany – *Large-Scale CRISPR Activation Screen Identifies Transcription Factors Regulating DPR Production from C9orf72 (G4C2)<sub>n</sub> Repeat Expansion in Patient iPSC-Derived Neurons and microglia.*

Datenbereitstellung: RNA-Seq Rohdaten und Metadaten sind für eine GDPR-konforme Ablage im EGA (European Genome-Phenome Archive) geplant (Ziel: Q3/Q4 2026). Weitere Materialien werden über die SynaDeg-Zenodo-Community geteilt.

#### 4. Budgetplanung (qualitativ; zahlenmäßiger Nachweis separat)

Der zahlenmäßige Verwendungsnachweis einschließlich Belegunterlagen sowie die Bescheinigung zur Trennung nichtwirtschaftlicher und wirtschaftlicher Tätigkeiten werden zentral durch das DZNE Grant Office erstellt und separat beim BMBF eingereicht. Daher werden hier keine detaillierten Ausgabentabellen wiederholt.

- Reisen/Austausch: Konsortialkoordination, Dissemination und Personalmobilität; virtuelle Meetings reduzierten Kosten, wo möglich.

#### 5. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben (technische Limitationen)

Die Detektion synaptischer Biomarker in iPSC-abgeleiteten Medien war häufig durch niedrige Konzentrationen relativ zu MS-Nachweisgrenzen limitiert. Weitere Optimierung (Anreicherung, alternative Assay-Formate) ist erforderlich.

#### 6. Meilenstein-Compliance (DZNE Deutschland)

Hinweis zur DZNE (Deutschland) Zeitleiste: Start 01.06.2022. Meilensteine wurden auf die deutsche 39-monatige Laufzeit (Jun 2022 bis Aug 2025) abgebildet: M18 = Dez 2023, M24 = Jun 2024, M34 = Apr 2025, M38 = Aug 2025.

Meilenstein	Geplant	Erreicht	Status
M3.1 Erste synaptische Kandidaten identifiziert	M18 (Dez 2023)	M24 (Jun 2024)	Erreicht
M3.2 Ziele für Perturbation identifiziert	M18 (Dez 2023)	M18 (Dez 2023)	Erreicht
M3.3 Synaptische Marker in iPSC-Neuronen evaluiert	M34 (Apr 2025)	M38 (Aug 2025)	Teilweise erreicht (technische Limitation)

#### 7. Ausblick (wissenschaftliche und wirtschaftliche Nachhaltigkeit)

##### Phase 1 (2025–2026): Validierung und Mechanismenstudien (Finanzierung gesichert)

Funktionelle Charakterisierung priorisierter Kandidaten und orthogonale Validierung (z. B. Knockdown/Replikation) sowie erweiterte Phänotypisierung in komplementären Readouts. **Für diese Arbeiten ist zusätzliche Finanzierung für 2025–2026 gesichert** (institutionelle Anschlussförderung), wodurch Validierungs- und Follow-up-Experimente im Anschluss an das Vorhaben fortgeführt werden können.

##### Phase 2 (2027–2029): Screening/Translation (Anschlussförderung beantragt)

Erweiterung Richtung Small-Molecule-Screening und translationale Weiterentwicklung der etablierten Plattform. Ergänzend ist die Ausweitung CRISPR-basierter Modulationsansätze geplant, u. a. als systematisches Screening/Validierung von Kandidaten aus relevanten Signalwegen wie DNA-Reparatur und synaptischer Funktion in

iPSC-abgeleiteten neuronalen Modellen. Eine Anschlussförderung wurde beantragt; parallel werden geeignete Partneraktivitäten und Kooperationsoptionen weiterverfolgt.

**Innovative nächste Schritte:**

- Erweiterung auf (Ko-)Kulturmodelle mit Mikroglia und Astrozyten (z. B. Neuron–Mikroglia–Astrozyten) zur Erhöhung der biologischen Komplexität und physiologischen Relevanz.
- KI-unterstützte Bildanalyse für höherdurchsatzfähige Phänotypisierung.
- Multi-Omics-Integration (Transkriptom, Proteom, Metabolom) zur Stärkung der Mechanismenklärung.