

Sachbericht zum Verwendungsnachweis für das Projekt FKZ 01EP2108A - reCOVER

Teilprojekt Max-Planck-Institut für die Physik des Lichts

Teil I: Kurzbericht

Bei Blut handelt es sich ohne Zweifel um die lebenswichtigste Körperflüssigkeit. Aus physikalischer Perspektive ist Blut eine kolloidale Flüssigkeit, bestehend aus unterschiedlichen Zellen, mit verschiedenen spezifischen Aufgaben umgeben von Serumsflüssigkeit. Solche kolloidalen Flüssigkeiten haben rheologische Eigenschaften die durch die physikalischen Eigenschaften der einzelnen Bestandteile, der einzelnen Zellen, bestimmt werden. Der Hauptbestandteil sind die roten Blutzellen, die ohne Zellkern und nur geringen Mengen an zytoskeletalen Proteinen mechanisch sehr weich sind und sich einfach verformen lassen. Diese physikalischen Eigenschaften erlauben es dem Blut insgesamt durch die Arterien, Kapillaren und Venen zu zirkulieren und seine Funktionen auszuüben. In den feinsten Kapillaren der Mikrozirkulation der Organe sind die Gefäße nur ein Bruchteil so groß wie die einzelnen Blutzellen. In diesen Regionen spielt für die effektive Blutzirkulation und damit den Austausch von Gasen, wie Sauerstoff und Kohlendioxid sowie Nährstoffen, primär der einzelne physikalische Phänotyp, zudem neben der Zellgröße, dem Volumen auch die Verformbarkeit gehört, jeder Blutzelle eine Rolle. Die Blutzellen müssen sich in den Mikrokapillaren verformen können um durch diese zupassen. Dazu sind, neben der Zellgröße und dem Volumen, streng kontrollierte und homöostatischer zellmechanische Eigenschaften von Nöten.

Basierend auf unseren Forschungsarbeiten zu COVID-19 und veränderten physikalischen Blutzelleigenschaften (Kubánková et al. 2021), haben wir in reCOVER postuliert, dass die von Frau Dr. Hohberger, an der Augenklinik in Erlangen, bei Long-COVID beschriebenen, funktionellen Autoantikörper gegen GPCRs (GPCR-AABs) auch zur Veränderung der Blutzellen beitragen, da verschiedene GPCRs in hohen Konzentrationen auf den verschiedenen Blutzellen exprimiert werden. Dies könnte zu einem verringerten Blutfluss, zu verminderter Funktionalität der roten Blutzellen und zu einer Fehlregulation der weißen Blutzellen führen und in letzter Konsequenz einige der von den Patienten beschriebenen Symptome ursächlich erklären. Wir haben uns entschieden diese Hypothese mittels 4 Arbeitsschritten zu bearbeiten, welche wir im Folgenden beschreiben wollen.

1) Zunächst wollten wir die physikalischen Eigenschaften aller Blutzellen von Patienten mit anhaltenden Symptomen nach einer COVID-19 Infektion (Long-COVID, LC) untersuchen. Hierzu verwendeten wir die Verformungszytometrie (engl. Deformability Cytometry; DC) die vom Antragsteller am Max-Planck-Institut für die Physik des Lichtes entwickelt wurde. Die Technologie kombiniert Hochdurchsatzmikroskopie mit mikrofluidischer „Lab-on-a-chip“-Technologie und automatisierter, KI-gestützter Bildauswertung. Die unbehandelten Blutzellen werden durch einen Kanal von 20x20 µm Querschnitt geleitet und dort aufgrund der vorherrschenden hydrodynamischen Kräfte verformt. In einer 10-minütigen Messung wird von jeder Zelle, mit einer Bildwiederholrate von 3600 Bildern pro Sekunde, ein Bild aufgenommen. Für die entstehenden Datensätze von ca. 2 Millionen Zellbildern und einer ungefähren Größe von 50 GB pro Datensatz haben wir ein Onlinedatenbank erstellt (www.dcor-colab.mpl.mpg.de). Dieser Erlaubt es zukünftigen Anwendern unabhängig von Standortfunktionen auf Messungen und Ergebnisse zuzugreifen. Aktuell (Stand 13.02.2024) sind 1033 Messungen von Patienten mit LC gespeichert und ausgewertet. In Populationsanalysen konnten wir feststellen, dass LC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen festere Lymphozyten, festere Neutrophile Granulozyten und festere Monozyten haben. Weiterhin konnten wir feststellen, dass LC Patienten mehr Mikroclots (Aggregate aus Zellen, Thrombozyten und/oder Fibrinogen) aufweisen und diese deutlich größer sind als bei gesunden Kontrollen. Zudem gibt es bestimmte Patienten bei denen eine eingeschränkte Verformbarkeit der Erythrozyten, wie während der akuten Infektion von uns beschrieben, anhält. Wir haben mit der Korrelation der Daten zu klinischen Metadaten begonnen. Die Untersuchungen zeigen, dass beispielsweise das Vorliegen einer ME/CFS Erkrankung

(diagnostiziert durch kanadische Kriterien) innerhalb der LC Patienten mit einem spezifischen Fingerprint einhergeht, der durch festere Neutrophile Granulozyten aber keine Unterschiede bei den Monozyten charakterisiert ist. Diese Unterschiede können in der Zukunft ggf. als Biomarker eingesetzt werden und halfen uns dabei während der Projektphase Kooperationen mit beispielsweise Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen, von der Berliner Charité, oder Prof. Dr. Uta Behrends, von der Technischen Universität München, zu etablieren. Wir haben begonnen innerhalb dieser Kooperationen die Spezifität der Marker für die Erkrankung zu untersuchen. Mit Hilfe von Clusteranalysen der DC Daten konnten wir zeigen, dass es unterschiedliche Patientengruppen innerhalb der LC Patienten gibt, die sich durch unterschiedliche Pathologien der Blutzellen ergeben. Hier planen wir in der Zukunft Studien, die diese Pathologien erklären um ggf. spezifische Behandlungen abzuleiten.

2) Wie in der Einleitung geschrieben vermuten wir das die Veränderung der physikalischen Blutzelleigenschaften (wie in 1 beschrieben) durch das Vorhandensein von GPCR-AABs im Blutserum der Patienten teilweise zu erklären sind. Daher haben wir das Ziel verfolgt diese Veränderungen durch Inkubation gesunder Blutzellen mit der aufgereinigten IGG Fraktion aus Patientenseren nachzustellen, um so Rückschlüsse auf die pathologische Wirkung der GPCR-AABs zu erhalten. Zunächst musste ein Aufreinigungsprotokoll für die Isolation der gesamten IGG Fraktion erarbeitet werden, da das Protokoll, welches die Firma Berlin Cures GmbH (BC) verwendet nicht einfach übernommen werden konnte (Geschäftsgeheimnis). Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die aufgereinigten Antikörper nicht „beschädigt“ werden und funktional blieben. Wir haben daher einige Protokolle getestet und die aufgereinigten IGG Fraktionen zu BC geschickt um diese auf ihre Funktionalität prüfen zu lassen. Leider hat dieser Prozess viel länger gedauert als bei der Projektplanung antizipiert. Nichtsdestotrotz konnten wir innerhalb der Förderperiode eine Methode am MPL etablieren und mit dieser bisher über 200 Patientenproben aufreinigen, welche wir den Partnern im Konsortium zur Verfügung stellen. Wir haben begonnen Blutproben von gesunden Spendern mit aufgereinigten IGGs zu inkubieren und DC zu messen. Jedoch konnten hier nicht die gleichen Effekte wie *in vivo* beobachtet werden, was den Schluss zulässt, dass der komplexe Pathomechanismus nicht ausschließlich auf der GPCR-AAB – GPCR Interaktion beruht, sondern andere Prozesse wie Immunmodulation oder Endothelschädigung eine bedeutende Rolle bei der Veränderung der Blutzellen spielt.

3) Die Detektion der funktionellen GPCR-AABs erfolgt zurzeit ausschließlich über komplexe und langsame Zellbasierte Systeme und wird ausschließlich von BC durchgeführt. Basierend auf den rezeptoraktivierenden Eigenschaften der GPCR-AABs und der damit verbundenen Änderung des Zellskelets haben wir begonnen einen Zell-basierten Assay zu entwickeln der mit Hilfe von DC die Veränderung des Zellskelets, bei Rezeptoraktivierung, im Hochdurchsatzverfahren untersucht. Mehr Informationen können wir aktuell nicht veröffentlichen, da wir für dieses Verfahren ein Patent mit dem Titel: „System and method for bio-molecule detection“ zur Prüfung eingereicht haben.

4) Als letzten Punkt wollen wir die physikalischen Eigenschaften der Blutzellen von LC Patienten longitudinale unter Behandlung mit BC007 erfassen. Die Studie hat gerade begonnen und es liegen noch keine Daten vor.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis für das Projekt FKZ 01EP2108A - reCOVER

Teilprojekt Max-Planck-Institut für die Physik des Lichts

Teil I: Eingehende Darstellung

Bei Blut handelt es sich ohne Zweifel um die lebenswichtigste Körperflüssigkeit. Aus physikalischer Perspektive ist Blut eine kolloidale Flüssigkeit, bestehend aus unterschiedlichen Zellen, mit verschiedenen spezifischen Aufgaben umgeben von Serumsflüssigkeit. Solche kolloidalen Flüssigkeiten haben rheologische Eigenschaften die durch die physikalischen Eigenschaften der einzelnen Bestandteile, der einzelnen Zellen, bestimmt werden. Der Hauptbestandteil sind die roten Blutzellen, die ohne Zellkern und nur geringen Mengen an zytoskeletalen Proteinen mechanisch sehr weich sind und sich einfach verformen lassen. Diese physikalischen Eigenschaften erlauben es dem Blut insgesamt durch die Arterien, Kapillaren und Venen zu zirkulieren und seine Funktionen auszuüben. In den feinsten Kapillaren der Mikrozirkulation der Organe sind die Gefäße nur ein Bruchteil so groß wie die einzelnen Blutzellen. In diesen Regionen spielt für die effektive Blutzirkulation und damit den Austausch von Gasen, wie Sauerstoff und Kohlendioxid sowie Nährstoffen, primär der einzelne physikalische Phänotyp, zudem neben der Zellgröße, dem Volumen auch die Verformbarkeit gehört, jeder Blutzelle eine Rolle. Die Blutzellen müssen sich in den Mikrokapillaren verformen können um durch diese zupassen. Dazu sind, neben der Zellgröße und dem Volumen, streng kontrollierte und homöostatische zellmechanische Eigenschaften von Nöten.

Basierend auf unseren Forschungsarbeiten zu COVID-19 und veränderten physikalischen Blutzelleigenschaften (Kubánková et al. 2021), haben wir in reCOVER postuliert, dass die von Frau Dr. Hohberger, an der Augenklinik in Erlangen, bei Long-COVID (LC) beschriebenen, funktionellen Autoantikörper gegen GPCRs (GPCR-AABs) auch zur Veränderung der Blutzellen beitragen, da verschiedene GPCRs in hohen Konzentrationen auf den verschiedenen Blutzellen exprimiert werden. Dies könnte zu einem verringerten Blutfluss, zu verminderter Funktionalität der roten Blutzellen und zu einer Fehlregulation der weißen Blutzellen führen und in letzter Konsequenz einige der von den Patienten beschriebenen Symptome ursächlich erklären. Hierfür nutzen wir wie im Antrag beschrieben die von uns entwickelte Verformungszytometrie (RT-DC). Unsere Analysen werden aktuell mit neuen Algorithmen (im Projekt entwickelt, siehe Zu I) durchgeführt die nicht mehr in Echtzeit (real-time deformability cytometry, RT-DC) laufen, sondern in einem Nachverarbeitungsschritt, daher werden wir im Folgenden für die RT-DC Messungen, DC verwenden.

Wir haben 4 Hauptaufgaben formuliert, deren finale Sachstände im Folgenden beschrieben werden sollen. Wir möchten vorab darauf hinweisen, dass an allen 4 Huptaufgaben aktuell, finanziert durch das Max-Planck-Institut, weitergearbeitet wird. Speziell Aufgabe 4 für deren Bearbeitung die Durchführung des IITs (Behandlung von LC Patienten mit BC007) Voraussetzung ist, hat, nach langer Wartezeit und zäher Verhandlungen mit der Berlin Cures GmbH (BC) über die Lieferung des Medikamentes BC007, erst vor ein paar Wochen begonnen.:

- (I) Analyse der physikalischen Blutzelleigenschaften von Patienten nach einer COVID-19 Infektion aus dem reCOVER-Register
- (II) Experimentelle Analyse der möglichen physikalischen Veränderungen auf Blutzellebene bei Behandlung von Blut von gesunden Probanden mit isolierten IGG Antikörpern aus Patientenserum
- (III) Entwicklung einer schnellen Teststrategie zur Detektion von funktionellen GPCR-AABs im Serum von LC Patienten für den klinischen Alltag basierend auf dem Wissen von (II).
- (IV) Longitudinale Erfassung der physikalischen Blutzelleigenschaften bei Patienten unter Behandlung mit BC007

Zu I: Wir konnten im Laufe des Projekts über 1000 verformungszytometrischen (DC) Messungen mit Patientenblut durchführen (Abbildung 1a). Die Messdaten aus den DC

Messungen konnten so aufgearbeitet werden, dass sie automatisch annotiert (Blutbild aus Bildanalyse mit Hilfe Künstlicher Intelligenz; siehe Abbildung 1) und ausgewertet werden können. Um die insgesamt ca. 200 TB an Daten zu speichern wurde der DCOR Server erweitert und ein zusätzlicher Server (DCOR-colab) aufgesetzt. Wir haben einen webbasierten Zugang programmiert und diesen durch Login-features (2 Faktor Einloggen) gesichert. Dieser Erlaubt es zukünftigen Anwendern unabhängig von Standortfunktionen auf Messungen und Ergebnisse zuzugreifen. Auf dem Server laufen automatische Analysen der Daten wie oben beschrieben (Abbildung 1). Um den Server zu einer diagnostischen Wissensbank auszubauen, müssen klinisch relevante Informationen zu den Messdaten korreliert werden. Hiermit haben wir begonnen aber aufgrund der komplexen Untersuchungen und Datenschutzbestimmungen ist der Zugang zu allen Patientendaten noch nicht vorhanden und ein kontinuierlicher Abgleich noch nicht möglich. Wir erwarten bis Ende des Jahres eine Wissensbank etabliert zu haben. Erste lokale (nicht Webbasierte) explorative Datenanalysen und Korrelation werden aktuell durchgeführt.

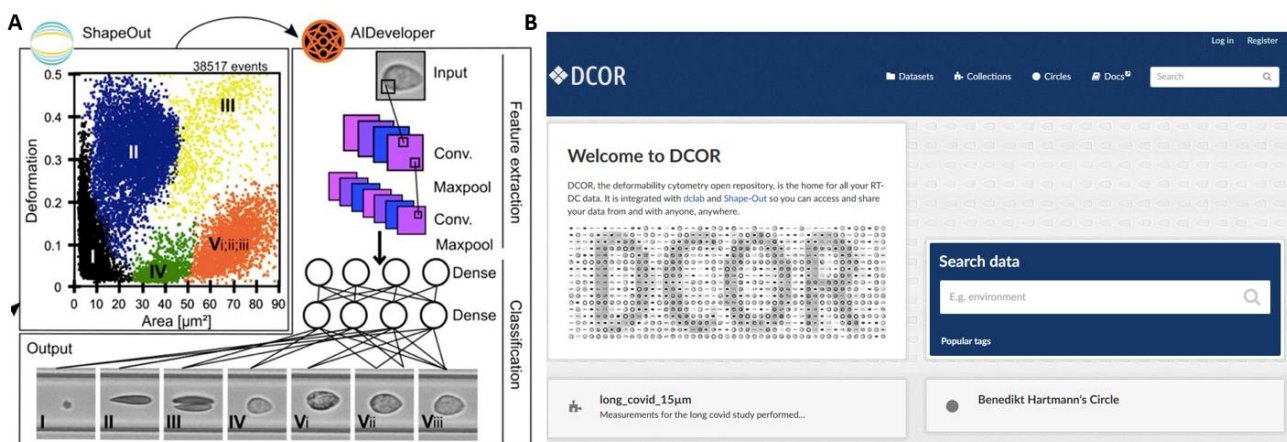


Abbildung 1: A) Automatische Analyse der RT-DC Daten, Generierung eines Blutbildes basierend auf den gemessenen Bilddaten und B) Programmierung einer webbasierten Applikation zur Speicherung, Auswertung und Handhabung von Messdaten.

Aus diesen Daten sind die Trainingsdaten für die künstlichen Algorithmen zur LC Diagnose abgeleitet wurden. Die Validierungs- und Testdaten sind vorbereitet wurden. Das Training der Modelle hat begonnen. Leider fehlen noch einige Patienten- und Autoantikörperdaten um finale Korrelationen und diagnostische Vorschläge abzuleiten. Einige Patientendaten müssen noch digitalisiert und formatiert werden. Von einigen Probanden müssen die Autoantikörperdaten noch gemessen und digitalisiert werden. Simple Analysen auf die gemessenen Zellparameter lassen uns aber hoffen, dass wir diagnostische Vorschläge aus den DC daten ableiten können. Bspw. haben wir eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt und konnten zeigen das diese einfache statistische Herangehensweise eine Trennung der Patientengruppen mit 87% Wahrscheinlichkeit zulässt (Abbildung 2A). Durch Clusteranalysen konnten wir die Wichtigkeit verschiedener gemessener Parameter für das Clustering identifizieren und eine optimale Identifikation von LC-Patienten ist mit einer ensemble-basierten (verschiedene statistische Modelle) blanced accuracy von 72,2% anhand von nur 10 gemessenen Parametern möglich. Hierbei zeigt sich, dass vor allem die Verformbarkeit der Monozyten und Granulozyten eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 2B). Solche Veränderungen können auf eine Überaktivität des Immunsystems hinweisen und wurden schon bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel eines akuten Lungenversagens oder der Infektion der oberen Atemwege, festgestellt werden (vgl. Toepfner et al. 2018). Die Veränderungen der Blutzellen bei LC sind so spezifisch, dass wir eine Art Fingerabdruck der Erkrankung erstellen wollen, um so eine Abgrenzung der Diagnose gegenüber anderen Erkrankungen zu erreichen. Zudem sind die

Bilddaten und zusätzliche Krankheitsmarker wie das Vorhandensein von Microclots (Abbildung 3) noch nicht in die Analyse eingeflossen.

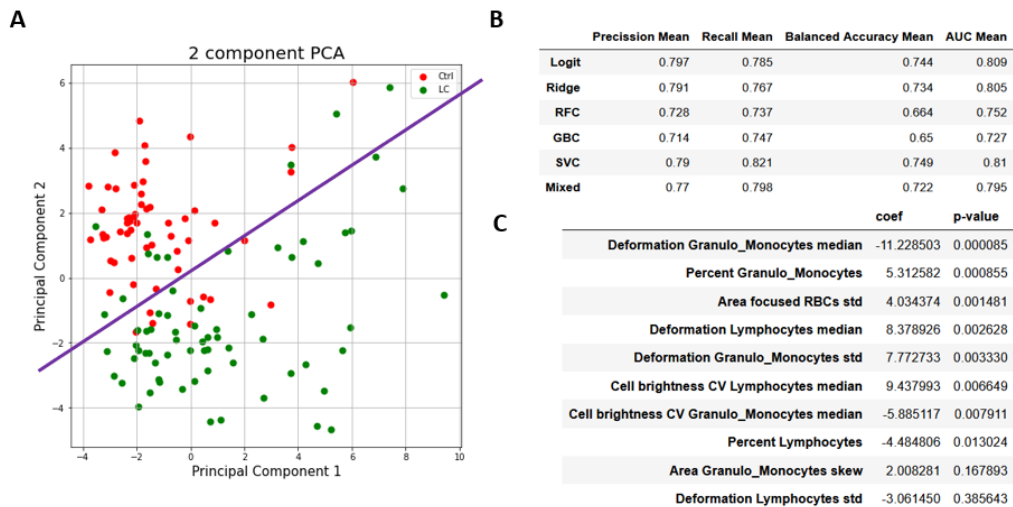


Abbildung 2: A) Hauptkomponentenanalyse für 30 LC-Patienten und 30 gesunde Probanden. B) statistische Untersuchung zum Clustering von 90 LC-Probanden und 50 gesunden Kontrollen basierend auf 10 gemessenen Parametern. C) Analyse zur Relevanz der 10 gemessenen Parameter für das Clustering in B.

Während unserer Analysen konnten weitere Pathologien, die in der Literatur bei LC beschrieben sind, identifiziert werden (siehe hierzu auch Teil III des Sachberichts). So konnten wir bei einigen Probanden sogenannte Microclots, Verbindungen aus Fibrinogen und aktivierten Thrombozyten, nachweisen. Das es sich bei den Partikeln um Microclots handelt haben wir durch DC Messungen mit kombinierter Fluoreszenzfärbung, gegen aktivierte (CD62p) Thrombozyten (CD61), bestätigt (Abbildung 3A). Bei unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass diese Microclots bei einigen Probanden pathologisch erhöht waren und, dass deren Größe signifikant zu den Microclots bei gesunden Probanden abweicht (Abbildung 3B). Hierdurch erhoffen wir uns weitere Patientensubgruppen zu identifizieren und haben eine Kooperation mit Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen, von der Berliner Charité, gestartet in der die Messung solcher Microclots aus Serum-Proben vor genau definierte Patientengruppen (bspw. LC-Patienten mit ME/CFS oder ohne ME/CFS) standardisiert werden soll. Des Weiteren konnten wir mit Prof. Dr. Uta Behrends von der TU München eine Partnerin finden mit deren Hilfe wir unsere Analysen auf Proben von Kindern erweitern konnten (diese Untersuchungen werden nicht durch das hier beschriebene Projekt gefördert).

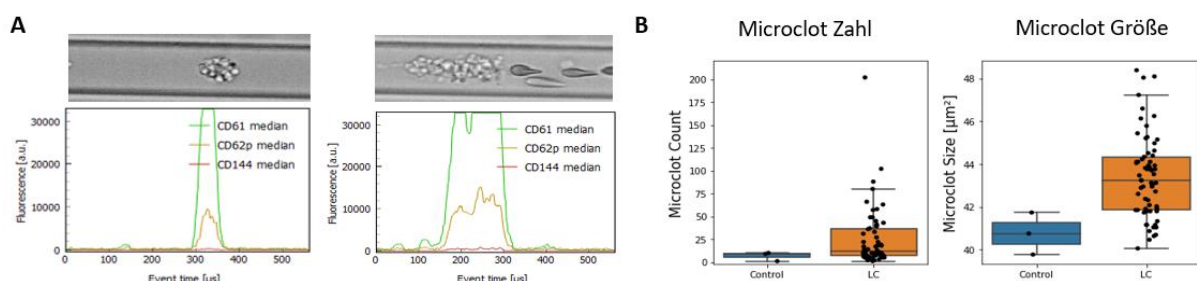


Abbildung 3: A) Fluoreszenzmarkierung der Microclots durch einen Thrombozytenmarker (CD61) und einen Aktivierungsmarker (CD62p). Zudem wurde noch ein Endothelmarker (CD144) verwendet um Microclots von möglicherweise abgelösten Endothelzellen zu unterscheiden. B) Vergleich der Anzahl und der Größe der Microclots bei gesunden Probanden und LC-Patienten.

Zusätzlich zu klassischen DC Messungen haben wir weitere Entwicklungen durchgeführt um die Veränderungen der roten Blutzellen besser darzustellen. DC basiert auf Hochdurchsatzmikroskopie von Blutzellen in einem mikrofluidischen Kanal, in dem es durch hydrodynamische Kräfte zu einer Verformung der Zellen kommt. Hieraus können verschiedenste physikalische Zellparameter abgeleitet werden. Wir haben innerhalb des Projektes 3 Anpassungen vorgenommen. 1) Wir haben zunächst den Kanal von $20 \times 20 \mu\text{m}$ auf $40 \times 40 \mu\text{m}$ vergrößert um die Zellen geringeren Schärkräften auszusetzen (Abbildung 4A). Dies erlaubt uns rote Blutzellen detailreicher zu erfassen und ihre mechanischen Eigenschaften mit Hilfe von numerischen Simulationen zu verstehen. Wir konnten zeigen, dass der Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und LC Patienten, den wir im $20 \times 20 \mu\text{m}$ Kanal sehen, auch im neuen Kanal dargestellt werden kann und tendenziell, wie erwartet, etwas ausgeprägter ist (dadurch denken wir eine höhere Sensitivität für geringere Unterschiede zu erreichen; Abbildung 4B). Aktuell sind aber noch nicht alle Messungen analysiert und wir können die antizipierte Funktionsweise dieses Kanals noch nicht abschließend evaluieren. Zudem ist uns aufgefallen, dass durch die nur 2D hydrodynamische Fokussierung (X-Y Richtung) der Zellen am Kanaleingang, im $40 \times 40 \mu\text{m}$ Kanal fokusunterschiede (Z-Richtung) deutlich häufiger auftreten. Damit haben die künstlichen Algorithmen zur Bildbildanalyse (Abbildung 1A) Probleme und wir können uns nicht zu 100% auf die Klassifizierung der Zellen verlassen. Wir arbeiten auch nach dem Abschluss des Projektes an diesem Problem um bessere Daten zu erzeugen. 2) Wir haben die Viskosität des Messmediums verringert. Hierdurch konnten die Schärkräfte noch weiter reduziert werden. Leider hat das auch dazu geführt, dass die Zellen sehr schnell, im Messchip und im zuführenden Schlauch, sedimentiert sind und es zu Verklumpungen (Bildung von Dubletten, Tripletten und weiteren größeren Zellclustern) kam. Diese Daten sind vermutlich nicht sinnvoll auswertbar und können hier nicht abschließend präsentiert werden. 3) Wir haben einen neuen mikrofluidischen Chip designed, in dem die Blutzellen wie in der Mikrozirkulation der Organe taktile verformt werden (Abbildung 4C). Hier werden nicht die physikalischen Eigenschaften, sondern ausschließlich die Durchtrittszeit als Proxy für die in-vivo Zirkulation erfasst. Zurzeit entwickeln wir eine Software, die diese Durchtrittszeit automatisch aus Videoaufnahmen mit ca. 2000 Hz erfasst (für die Funktionsweise siehe Abbildung 4C). Mehr Daten müssen erhoben werden, leider fehlt hierzu aktuell die Finanzierung.

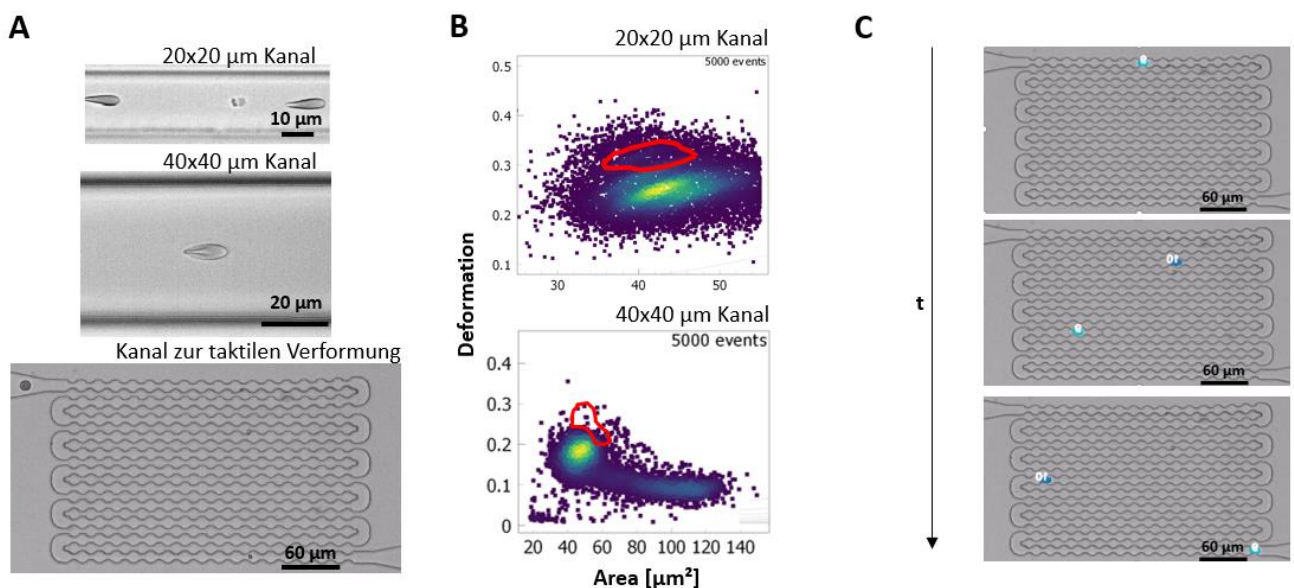


Abbildung 4: A) Entwicklung von 2 neuen mikrofluidischen Chips zur Erfassung der Zirkulationseigenschaften von Blutzellen. B) Verformbarkeit der roten Blutzellen von einem Kontrollprobanden (rote Kontur der Dichteverteilung der Population) im Vergleich zu einem LC Patienten (Punktwolke) bei $20 \times 20 \mu\text{m}$ und $40 \times 40 \mu\text{m}$ Kanälen. C) Funktionsweise der neuen Software zur Messung der Durchtrittszeit (automatische Detektion der Zellen).

ZU II: Wir haben begonnen die gesammelten Patientenserum aufzureinigen um die im Serum vorliegenden Autoantikörper in spezifischen Konzentrationen auf das Blut von gesunden Probanden zu geben. Die Aufreinigung beansprucht viel Personalzeit und wird daher sukzessive weitergeführt. Aktuell sind nicht ausreichend viele Probandenproben aufgereinigt und die Aufgereinigten weichen im Vorhandensein von funktionellen GPCR-AABs zwischen unserem Test und dem Test, durchgeführt von BC, ab (siehe zu III für weitere Erläuterungen). Wir sind dann von den Ergebnissen von BC ausgegangen und haben erste Tests durchgeführt, bei denen wir das Serum von Blutproben von gesunden Probanden mit Serum von LC-Patienten ausgetauscht haben und über verschiedene Zeitpunkte mit RT-DC analysiert haben. Leider sind dabei keine offensichtlichen Veränderungen der gesunden Blutzellen aufgetreten. Wir konnten allerdings feststellen, dass die Prozedur des Serumaustausches die Zellen in Mitleidenschaft zieht und somit der Effekt der Autoantikörper überlagert wird. Wir gehen davon aus, dass die aufgereinigte IGG-Fraktion weniger Nebeneffekte hervorruft und weitere Erkenntnisse des Effekts der Autoantikörper auf die Blutzellen erlaubt.

Zu III: Die Detektion der funktionellen GPCR-AABs erfolgt zurzeit ausschließlich über komplexe und langsame Kardiomyozyten-basierte Zellsysteme (Kardiomyozytenassay) und wird ausschließlich von BC durchgeführt.

Basierend auf den rezeptoraktivierenden Eigenschaften der GPCR-AABs und der damit verbundenen Änderung des Zellskelets haben wir begonnen einen Zell-basierten Assay zu entwickeln der mit Hilfe von DC die Veränderung des Zellskelets, bei Rezeptoraktivierung, im Hochdurchsatzverfahren untersucht. Mehr Informationen können wir aktuell nicht veröffentlichen, da wir für dieses Verfahren ein Patent mit dem Titel: „System and method for bio-molecule detection“ zur Prüfung eingereicht haben. Weitere Informationen finden sie im nicht öffentlichen Teil des Sachberichts zum Verwendungsnachweis für das Projekt FKZ 01EP2108A – reCOVER.

Im Folgenden wird die Etablierung, Weiterentwicklung und Standardisierung des Kardiomyozytenassays nach Davideit et al. 2018 am MPL beschrieben. Dieser Assay basiert auf den Kardiomyozyten (CM) von neugeborenen Ratten, welche die gleichen GPCRs auf ihrer Zelloberfläche haben. Wenn diese durch funktionelle GPCR-AABs gebunden werden, kontrahieren die Kardiomyozyten in der Kultur schneller oder langsamer je nach AAB. Diese Kontraktion wird aktuell manuell unter einem Mikroskop ausgezählt. Um Zugang zu den benötigten Ratenherzen von neugeborenen Tieren zu bekommen haben wir eine Kooperation mit Frau Prof. Dr. Elisabeth Sock vom Institut für Biochemie der FAU etabliert. Wir haben mit unterschiedlichsten Isolationsmethoden getestet welche Protokolle die stabilste Isolation von Kardiomyozyten erlauben. Dabei war es wichtig, dass die Zellen bei der Isolation aus dem Herzgewebe die GPCRs nicht verlieren, diese funktionell auf der Oberfläche der Zellen erhalten bleiben und die Zellen in der Zellkultur synchron weiterschlagen (regelmäßige Kontraktion). Wir konnten ein System etablieren, welches die Isolation von solchen Zellen erlaubt, in Abbildung 5A ist ein repräsentatives Bild einer solchen Kultur zu sehen. Parallel haben wir ein Mikroskopiesystem entwickelt welches die Zellen bei konstanten Umweltbedingungen (Temperatur, Sauerstoff, etc.) hält und gleichzeitig das schlagen der Zellen optisch aufnehmen kann (20 Bilder pro Sekunde Video). Im Anschluss daran haben wir eine Software entwickelt, welche die kontrahierenden Bereiche in jedem Bild (Kardiomyozytencluster; CM-Cluster) des Videos automatisch findet, segmentiert und eine längenskalenabhängigen Kontraktionsfrequenz und Amplitude der einzelnen CM-Cluster ermöglicht (Abbildung 5). Diese Software ermöglicht das erste Mal die Standardisierung des Assays, da nicht nur einzelne Bereiche in einem Bild untersucht (vgl. Davideit 2018), sondern mehrere CM-Cluster automatisch analysiert werden. Nach einer Behandlung der Zellen mit bspw. GPCR-Agonisten oder GPCR-AABs ermöglicht sie auch den gleichen Zellbildbereich erneut zu detektieren und exakt die gleichen CM-Cluster zu analysieren. So erreichen wir eine hohe statistische Genauigkeit und konnten zeigen, dass einzelne CM-Cluster in einem Bildbereich nicht immer synchron schlagen, was zu Fehlern in der Interpretation der Daten

führen kann, wenn, wie aktuell durchgeführt, nur ein einzelnes Cluster pro Kondition (Baseline vs. Behandelt) manuell ausgezählt wird. Diese Entwicklungen befinden sich gerade in der Vorbereitung für eine Publikation.

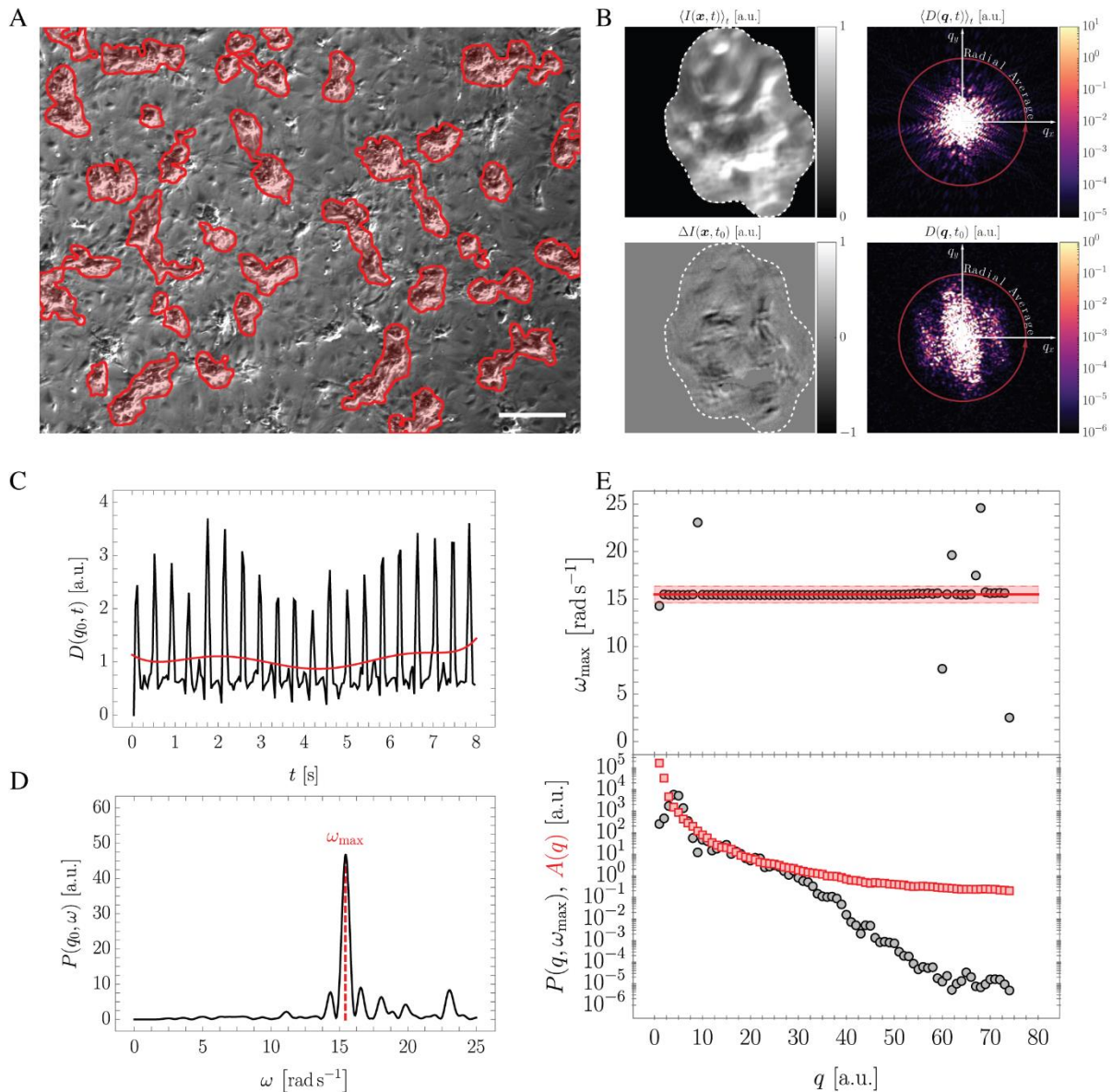


Abbildung 5: Bestimmung der längenskalenabhängigen Schlagfrequenz und -amplitude einzelner CM-Cluster. A) Typisches Sichtfeld (graue Skala) und segmentierte CM-Cluster (rot). B) Obere Reihe: Mittlere Intensität und die entsprechende räumliche Fourier-Transformation eines CM-Clusters, untere Reihe: Bild Differenz zwischen zwei Zeitpunkten $t=0$ (weiße gepunktete Linie) und t_0 und die dazugehörige räumliche Fourier-Transformation. C) Schlagendes Signal $D(q_0, t)$ (schwarz), erhalten aus B nach radialer Mittelung für eine bestimmte Längenskala q_0 und einem Polynom-Fit des schlagenden Signals (rot). D) Deeming-Periodogramm des in C dargestellten Signals nach Subtraktion mit dem Polynom-Fit. ω_{\max} gibt die Frequenz des Modus mit der höchsten Intensität an. E) Oben: Schlagfrequenz ω_{\max} (wie in D bestimmt) und unten: Signalamplitude (schwarz) und durchschnittliche Bildamplitude (rot) in Abhängigkeit von der Längenskala q .

Parallel haben wir die isolierten AABs aus dem ersten Arbeitsschwerpunkt in unserem CM-Assay eingesetzt. Diese wurden auch von BC auf das Vorhandensein von funktionellen GPCR-AABs gegen den beta2-Rezeptor getestet. Aktuell erreichen wir eine Übereinstimmung der Untersuchungen von ~52%. Eine Übersicht von 23 getesteten Patientenseren kann in Tabelle 1 gefunden werden. Diese Diskrepanz kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist es

möglich, dass aufgrund der unterschiedlichen Durchführung der Tests, verschiedenen Ergebnisse auftreten. Zum anderen können die Seren weitere AABs aufweisen und diese beeinflussen den Ausgang, wenn eine Blockade der GPCRs nicht korrekt funktioniert. Wir arbeiten an der Verbesserung des Tests um eine höhere Übereinstimmung zu erzielen.

Tabelle1: Übersicht der ersten Testungen von Patientenserum auf das Vorhandensein von GPCR-AABs gegen den beta2-Rezeptor.

Nummer	MPL	BC	Übereinstimmung
BH138_01	Leicht positiv	positiv	Ja
FR012_01	Leicht positiv	negativ	Nein
BH015_02	positiv	positiv	Ja
BH17_01	positiv	positiv	Ja
BH293_01	negativ	positiv	Nein
BH253_01	Leicht positiv	positiv	Ja
BH158_01	negativ	positiv	Nein
FR021_01	positiv	negativ	Nein
BH19_01	negativ	positiv	Nein
BH22_01	positiv	positiv	Ja
BH173_01	negativ	negativ	Ja
BH032_01	positiv	negativ	Nein
BH265_01	positiv	positiv	Ja
BH247_01	positiv	positiv	Ja
BH193_01	positiv	positiv	Ja
FR014_01	positiv	negativ	Nein
FR015_01	negativ	negativ	Ja
FR017_01	positiv	negativ	Nein
BH130_01	positiv	negativ	Nein
BH034_01	positiv	negativ	Nein
BH035_01	negativ	negativ	Ja
BH189_01	positiv	positiv	Ja
FR013_01	Leicht positiv	negativ	Nein

Zu IV: Leider konnte der IIT aufgrund der Lieferschwierigkeiten von BC007 noch nicht durchgeführt und damit auch keine longitudinalen RT-DC Daten erhoben werden.

Zusammenfassend verlief das Projekt sehr erfolgreich und hat wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der LC Erkrankung im Blut geliefert. Hierzu muss auch die Zusammenarbeit mit den anderen Partnern betrachtet werden. Leider konnten wir nicht abschließend klären welchen Einfluss die GPCR-AABs auf die mechanischen Eigenschaften der Blutzellen haben

oder ob diese Veränderungen ausschließlich durch einen kombinierten in-vivo Effekt zu erklären sind. Um hier ein abschließendes Statement abzugeben, weitere Erkenntnisse zu erlangen und mögliche Therapiestrategien abzuleiten, müssen weitere Untersuchungen in Zukunft finanziert werden.

Quellen:

Kubánková, M., Hohberger, B., Hoffmanns, J., Fürst, J., Herrmann, M., Guck, J., Kräter, M. (2021). Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.025>

Davideit, H., Haberland, A., Bartel, S., Schulze-Rothe, S., Müller, J., Wenzel, K. (2019). Determination of Agonistically Acting Autoantibodies to the Adrenergic Beta-1 Receptor by Cellular Bioassay. In: Houen, G. (eds) *Autoantibodies. Methods in Molecular Biology*, vol 1901. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8949-2_8