

**Psychiatrische und
Psychotherapeutische Klinik**
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Kornhuber
Priv. Doz. Dr. med. Juan Manuel Maler

Telefon: 09131 85-44102
Fax: 09131 85-34862
direktion-psych@uk-erlangen.de
Schwabachanlage 6 (Kopfkliniken)
91054 Erlangen

Öffentliche Verkehrsmittel:
Buslinie 290, Haltestelle Maximiliansplatz/Klini-
ken

30.06.2024

NADIM (Teil 1 und 2) – Schlussbericht

Verbundprojekt: Früherkennung Neurodegenerativer Erkrankungen aus Blutproben (NADIM)

Teilvorhaben: NADIM – Identifikation von molekularen Biomarkern der Alzheimer Krankheit in Zellen des Blutes und des Liquors sowie Entwicklung eines darauf basierenden klinisch-diagnostischen Systems

ZE: Psychiatrische und Psychotherapeutische Universitätsklinik Erlangen; Projektleiter: Priv. Doz. Dr. med. Juan Manuel Maler

Förderkennzeichen: 13GW0406E

NADIM – Kurzbericht (Teil 1)

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

Derzeit sind allein in Deutschland 1,8 Mio. Menschen von einer Demenz betroffen, die in den meisten Fällen auf einer Alzheimerkrankheit zurückgeht. Aufgrund des Fehlens zuverlässiger blutbasierter Tests ist die laborchemische Diagnostik der Alzheimerkrankheit sehr aufwendig, da sie auf der Liquordiagnostik beruht. Blutbasierte diagnostische Methoden werden derzeit intensiv beforscht, sind aber noch nicht verlässlich genug, um in der Routinediagnostik eingesetzt werden zu können. Ziel des Gesamtvorhabens war die Entwicklung eines neuartigen technologischen Konzepts, mit dem die Erfassung biochemischer Marker der Neurodegeneration erheblich erweitert werden soll, um hieraus ein niederschwelliges diagnostisches Verfahren zur Früh- und Verlaufsdiagnostik der Alzheimerkrankheit anhand von Blutproben abzuleiten. Damit würden sich mehr Patienten früher und ggf. wiederholt untersuchen lassen, was weitreichende Perspektiven im Hinblick auf die Verlaufsdiagnostik und etwaige frühzeitige Interventionen, aber auch Präventionsmaßnahmen eröffnet. Gegenüber anderen Ansätzen, z.B. die in der Routinediagnostik regelmäßig eingesetzten ELISA-basierten Verfahren, bietet der vorgeschlagene Lösungsweg eine „doppelte“ Spezifität, da nicht nur das eigentliche Markermolekül detektiert

wird, sondern gleichzeitig eine morphologische und immunologische Charakterisierung des zugehörigen Phagozyten erfolgt. Gleichzeitig reduzieren sich Störgrößen wie Matrixeffekte, Antigenmaskierung u.a., die in proteinreichen biologischen Proben wie Plasma und Serum den Nachweis erheblich erschweren.

Bisherige, ursächlich angreifende pharmazeutische Ansätze, wie sie z.B. in diversen A β -Immunisierungsstudien untersucht wurden, verliefen vermutlich deshalb enttäuschend, weil sie erst im späten Stadium der Demenz angewendet wurden. Darum ist die Wissenschaft sich darüber einig, daß eine erfolgreiche Intervention vor dem Auftreten klinischer Anzeichen stattfinden muß. Ein prädiktiver Test, wie er im vorgestellten Projekt angestrebt wird, würde für die Entwicklung neuer Therapeutika eine erhebliche Unterstützung bedeuten, da der in Frage kommende Personenkreis für neue Behandlungsansätze verkleinert und Personen mit erhöhtem Risiko treffsicher identifiziert werden könnten. Gleichzeitig wäre damit eine Verlaufskontrolle im Hinblick auf das Monitoring künftiger Therapien leichter möglich.

Die Schwierigkeiten in der Übertragung der etablierten Amyloid- β /Tau-Analytik vom Liquor auf das Blut werden u.a. mit der stark regulierten Blut-Hirn-Schranke, dem kleinen Volumen des Gehirns bezogen auf den Gesamtorganismus und dadurch bedingten Verdünnungseffekten und nicht zuletzt mit der großen Zahl an Bindungsproteinen und degradierenden Enzymen im Blut erklärt. Eine wesentliche Strategie zielt daher auf die Entwicklung von Assays mit einem Panel von (möglichst wenigen) Analyten, die die der Alzheimerkrankheit zugrundeliegende Pathophysiologie, d.h. Amyloid- und Tau-Stoffwechsel sowie Neurodegeneration möglichst gut abbilden und nicht nur mit ihr korrelieren. Techniken, die bei dieser Frage bisher zum Einsatz kamen sind u.a. die Analyse des Plasmaproteoms und -lipidoms, der Nachweis von Autoantikörpern sowie genomische Analysen, Analysen des Transkriptoms und der regulatorischen mikroRNA. Letztlich sind diese Ansätze aber dennoch weit von ihrer klinischen Einsetzbarkeit entfernt, da es insbesondere Schwierigkeiten bei der Standardisierung gibt und oft die Frage offenbleibt, ob die gemessenen Biomarker die ZNS-Pathologie widerspiegeln.

2. Ablauf des Vorhabens

Die Psychiatrische und Psychotherapeutische Universitätsklinik Erlangen verfügt über eine langjährige wissenschaftliche Expertise in der Früh- und Differentialdiagnostik der Alzheimerkrankheit und auch anderer Demenzformen sowie in der Untersuchung immunologischer Fragestellungen in Zusammenhang mit diesen Erkrankungen. Mit dem hier geförderten Projekt bot sich die Chance, diese Expertise in Kooperation mit den Projektpartnern in die Entwicklung eines neuartigen Systems zur zellbasierten Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen einfließen zu lassen, das sich in Teilen an einem in der Tumorfürhdiagnostik bereits erfolgreich eingeführten Verfahren orientiert (**E**pitope **D**etection **i**n **M**onocytes, EDIM). Für die am Verbund beteiligten Partner bot sich die Möglichkeit, die am System vorgenommenen Entwicklungsschritte unmittelbar in der klinischen Routine und an realen Patientenproben zu validieren. Die Kooperationen der Psychiatrischen Universitätsklinik mit den am Verbund beteiligten Partnern wurden allesamt mit dem NADIM-Projekt initiiert.

Die Bearbeitung des Projekts wurde im April 2020 begonnen. Aufgrund der Corona-Pandemie gab es neben Lieferkettenverzögerungen insbesondere in der Anfangsphase des Projekts ein deutlich geringeres Patientenaufkommen als erwartet, da die elektiven Termine zur Gedächtnisabklärung von den meist älteren und damit gefährdeteren Patienten aufgeschoben oder abgesagt wurden. Hierdurch entstanden Verzögerung insbesondere in den Projektteilen, die sich auf die Analyse von Liquorzellen bezogen. Diese anfänglichen Verzögerungen konnten im Verlauf durch eine kostenneutrale Verlängerung der Förderung in weiten Teilen kompensiert werden.

Ferner war es im ersten Projektjahr nicht möglich, eine(n) qualifizierte(n) MTA zu gewinnen, weshalb die Mittel zur Erreichung des Projektzieles umgewidmet wurden und der Finanzierung einer weiteren Wissenschaftlerstelle dienten. Dies war insbesondere für die Weiterentwicklung der RCMIA-Demonstratoren hilfreich, da eine umfangreiche Expertise aus dem Bereich der MELC (Multi-Epitope-Ligand-Cartography)-Technik in das Projekt einfließen konnte.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Die geplanten Forschungs- und Entwicklungsarbeiten konnten weitgehend wie geplant durchgeführt werden und auch die gesteckten Ziele wurden weitgehend erreicht:

AP1 Entwicklung spezifischer Nachweisreagenzien für AD

Kommerzielle Antikörper gegen etablierte und erweiterte demenzrelevante Epitope konnten planmäßig an Patientenproben getestet werden und es erfolgte die Festlegung von Biomarkern für die Entwicklung eigener spezifischer Antikörper. Für die weitere EDIM-basierte Analyse wurde ein Antikörper-Tableau zur fortlaufenden Analyse festgelegt und hier im Verlauf auch die ersten im Rahmen des Projekts entwickelten Antikörper (anti-pTau181) eingebunden. Es folgte die Festlegung eines ersten EDIM-basierten diagnostischen Konzepts. Der erste RCMIA-Demonstrator wurde evaluiert, darauf basierend von den Projektpartnern optimiert und in einer überarbeiteten Fassung erneut erprobt

AP3 Anreicherung und Konservierung von Zellmaterial aus Blut/Liquor für Archivierung und Bio-banking

Verfahren zur Anreicherung von CD14⁺ PBMCs sowie von Liquorzellen wurden erfolgreich entwickelt. Ein Fixierprotokoll mit für Fluidik optimierter Anhaftung und Eignung für Archivierung wurde etabliert. Als Nebenergebnis wurde eine Stabilisierungslösung zur Lagerung (ggf. Transport) von Liquorzellen entwickelt

AP4 Umfassende Charakterisierung von Immunzellen aus Liquor/Blut

Die Charakterisierung von PBMCs unter Einbeziehung etablierter und erweiterter AD-Marker ist erfolgt, nach mehreren Pilotstudien und darauf basierenden Anpassungen des Verfahrens konnte zuletzt an einer kleinen Patientenkohorte eine Korrelation zwischen pTau-EDIM-Score in PBMCs und zeitgleich ermittelten pTau-Werten im Liquor ermittelt werden. Mit den in AP3 erarbeiteten Protokollen erfolgte eine fortlaufende Anreicherung, Fixierung und Archivierung von Blut-PBMCs und Liquorzellen zur späteren Analyse. Mit dem überarbeiteten RCMIA-Aufbau war der Nachweis pTau181-positiver Zellen im Liquor möglich.

AP5 Entwicklung einer Blut-basierten Demenzdiagnostik mittels RCMIA-Instrument

Ergänzend zu pTau erwies sich der EDIM-Score für Neurogranin als vielversprechender Kandidat für eine etwaige Kombination von Biomarkern. Der Nachweis phagozytierter aggregierter vs. nicht-aggregierter Formen von A β ₁₋₄₂ und pTau gelang dagegen nicht.

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

Das RCMIA-Instrument konnte erfolgreich in den klinischen Workflow der neurochemischen Demenzdiagnostik integriert werden. Mit Hilfe einer im Rahmen des Projekts entwickelten Stabilisierungslösung waren Liquorzellanalysen noch am Folgetag der Abnahme möglich. Dank Integration von Multi-Epitope-Ligand-Cartography-Technik (MELC) und Archivierung waren mehrzeitige Mehrfachfärbungen an denselben Zellen möglich.

Das vorliegende Projekt war eines von 5 Teilprojekten innerhalb des nationalen Verbundvorhabens „Früherkennung Neurodegenerativer Erkrankungen aus Blutproben (NADIM)“. Neben der

Psychiatrischen und Psychotherapeutischen Universitätsklinik Erlangen waren folgende Partner beteiligt: Partner 1 (Projektkoordinator): Dr. Sebastian Krause, INVIGATE GmbH, 07745 Jena; Partner 2: Dr. Wolfgang Göhde, Quantum Analysis GmbH, 48149 Münster; Partner 3: Dr. Werner Luttmann, Immunotools GmbH, 26169 Friesoythe; Partner 4: Prof. Dr. Wolfgang Göhde, Cytecs GmbH, 48161 Münster.

Das vorliegende Teilprojekt der Psychiatrischen Universitätsklinik diente der Festlegung diagnostischer Marker für die Phagozyten-basierte Analyse von Blut und Liquorproben bei Alzheimer-Krankheit sowie der Testung des von den Kooperationspartnern entwickelten und bereitgestellten Apparateaufbaus sowie der Antikörper und Verbrauchsmaterialien in der klinischen Routine. Dabei erfolgten die Ausrichtung der Arbeiten und die sich daraus ergebenden Anpassungen des Arbeitsplanes in enger Abstimmung mit dem Verbundkoordinator. Die Modalitäten zur Zusammenarbeit und zur künftigen Verwertung der Ergebnisse innerhalb des Konsortiums wurde über einen Kooperationsvertrag geregelt, dem alle Parteien des Verbundvorhabens bis zum 24.08.2020 rechtskräftig zugestimmt haben. Während der Bearbeitung des Projektes fanden regelmäßige Verbund-Treffen statt. Hierbei konnten die Zwischenergebnisse der Partner eingehend diskutiert und das weitere gemeinsame Vorgehen auf Verbundebene detailliert abgestimmt werden. Insbesondere mit dem Verbundkoordinator bestand regelmäßiger Austausch in Form von E-Mail-Kommunikation sowie Telefon- und Video-Anrufen.

NADIM – Eingehende Darstellung (Teil 2)

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Das vorliegende Teilprojekt der Psychiatrischen Universitätsklinik diente einerseits der Identifikation bzw. Festlegung potentieller diagnostischer Marker für die Phagozyten-basierte Analyse von Blut und Liquorproben bei Alzheimer-Krankheit (AD) sowie der iterativen Testung des von den Kooperationspartnern entwickelten und bereitgestellten Apparateaufbaus sowie der im Rahmen des Projekts entwickelten Antikörper und Verbrauchsmaterialien in der klinischen Routine. Bezogen auf die initial in den einzelnen Arbeitspaketen festgelegten Ziele wurden folgende Ergebnisse erzielt:

AP1 Entwicklung spezifischer Nachweisreagenzien für die AD

AP1-1 Identifizierung und Charakterisierung etablierter Marker der AD-Diagnostik innerhalb von Blut-Phagozyten

Die Entwicklung des Zellkulturmodells auf Basis der THP-1-Zelllinie bzw. primärer Monozyten ex vivo wurde zunächst zurückgestellt, da sich ein Teil der avisierten Alzheimer-Biomarker mithilfe von kommerziell erhältlichen Antikörpern bereits in Phagozyten aus Patientenvollblut nachweisen ließ und somit die aufwendigen Vorversuche mit o.g. Zelllinien entfallen konnten. Stattdessen wurde das Modell primär für den Einsatz bei den Projektpartnern adaptiert (s.a. AP1-3).

Hierdurch konnte frühzeitig mit der in AP4-1 vorgesehenen durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung aus Patientenblut begonnen werden. Im einzelnen konnten Gesamt-Tau- und Phospho-Tau-Protein in Phagozyten aus Patientenblut intrazellulär nachgewiesen werden, allerdings auch in einer anderen Zellpopulation als erwartet. Diese wurde im Verlauf weiter mikroskopisch und durchflusszytometrisch charakterisiert, um sie auf Eignung für einen etwaigen

diagnostischen Ansatz zu prüfen. Dabei erwies sie sich als Eosinophilenpopulation mit hoher Autofluoreszenz und unspezifischen Signalen, sodass dieser Ansatz nicht weiterverfolgt wurde. Ferner fiel in den fortlaufenden Untersuchungen an Patientenblut auf, dass immer wieder größere Anteile degranulierter Granulozyten nachweisbar waren. Auch dieses Phänomen wurde auf seine potentielle Eignung zu diagnostischen Zwecken hin überprüft. Allerdings ließ sich auch hier keine krankheitsspezifische Verteilung feststellen. Es zeigte sich vielmehr, dass die Degranulierung stark von dem präanalytischen Umgang mit der Blutprobe abhing, insbesondere Erschütterung, wie sie zum Beispiel durch den üblichen Transport mittels Rohrpostsystem auftreten können. Aufgrund solcher Einschränkung im Hinblick auf einen etwaigen praktischen Einsatz in der Demenzdiagnostik wurde auch dieser Ansatz verworfen.

Der Nachweis von Phagozyten-Amyloid-Protein war erschwert, da hier im Besonderen zwischen von den Phagozyten selbst produzierten und phagozytierten APP-Fragmenten unterschieden werden muß. Trotz der Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen autochthonen und phagozytierten Amyloidvorläuferprotein (APP) zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Analyse im Rahmen einer ersten kleinen Pilotstudie mit Patientenproben, dass hier eine Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen nach entsprechender Optimierung möglich erscheint, wohingegen der Nachweis des $A\beta_{1-42}$ -Peptids mit den verwendeten kommerziell erhältlichen Antikörpern weniger erfolgversprechend war (Abb. 1).

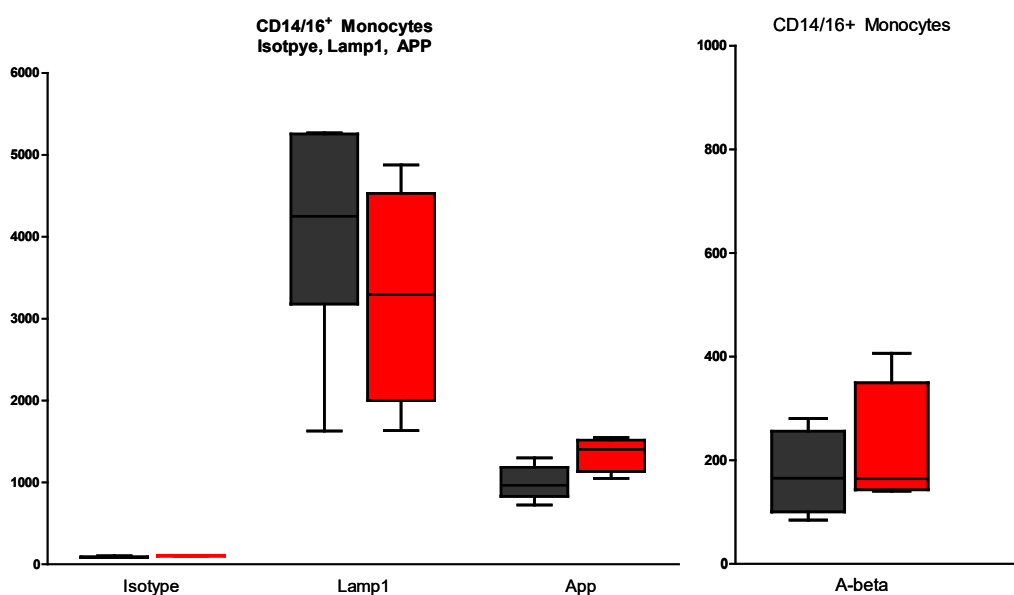


Abb. 1 Nachweis von Amyloid Precursor Protein (APP) und Amyloid- β_{1-42} -Peptid (Abeta) in $CD14^+/CD16^+$ Monozyten aus Blutproben von Patienten (rot) vs. nichtdementen Kontrollpersonen (grau), $n = 5-8$. Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) fungiert als intrazelluläre Kontrollfärbung.

Auf Basis der Befunde mit kommerziell erhältlichen Antikörpern wurden planmäßig und in Abstimmung mit dem Kooperationspartner INV die Epitope/Markerproteine für die noch zu erzeugenden, für die intrazelluläre EDIM-Analyse optimierten monoklonalen Antikörper festgelegt.

AP1-2 Erfassung erweiterter Marker innerhalb von Blut-Phagozyten

Analog zu AP1-1 wurde die Bestimmung erweiterter Marker zur Erfassung einer Synapsenfunktion bzw. -degeneration und zur Differenzierung gegenüber Nicht-Alzheimer-Demenzen mit Hilfe direkt markierter, kommerziell erhältlicher Antikörper und durchflusszytometrischer Methoden wurde planmäßig abgeschlossen. Hier erschienen alpha-Synuclein und Neurogranin, bedingt auch Synaptophysin vielversprechend, so dass diese auch als Zielproteine für die Antikörperherstellung durch den Kooperationspartner (INV) festgelegt wurden (Abb. 2 und 3). Zusätzlich wurde aufgrund seiner zunehmenden Bedeutung für einen frühzeitigen Nachweis einer Aktivierung von Astroglia auch das saure Gliafaserprotein (GFAP) als Zielprotein festgelegt. Mit kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen die Antigene Synapsin I/II/III und Synaptopodin als erweiterte Marker gelang eine intrazelluläre Anfärbung dagegen nicht (Abb. 3).

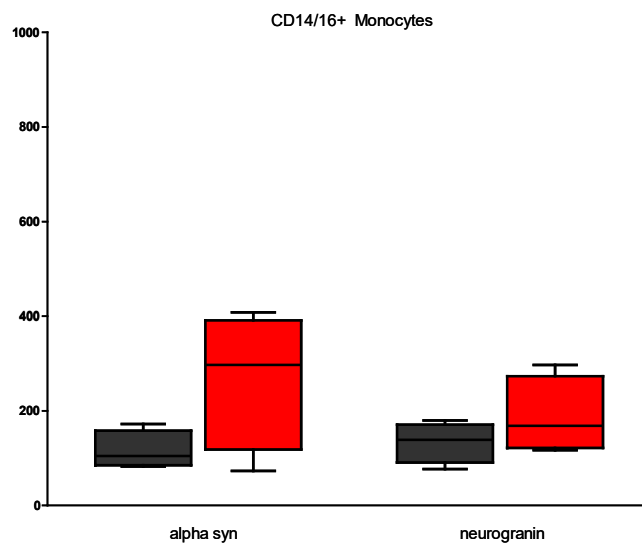


Abb. 2 Nachweis von α -Synuclein und Neurogranin in CD14⁺/CD16⁺ Monozyten aus Blutproben von Patienten (rot) vs. nichtdementen Kontrollpersonen (grau), n= 5-8.

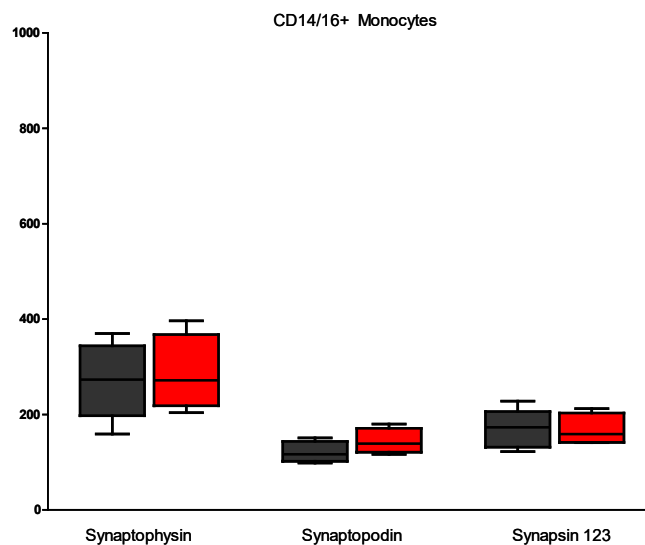


Abb. 3 Nachweis der synaptischen Proteine Synaptophysin, Synaptopodin und Synapsin in CD14⁺/CD16⁺ Monozyten aus Blutproben von Patienten (rot) vs. nichtdementen Kontrollpersonen (grau), n= 5-8.

Die Arbeiten zu AP1-1 und AP1-2 wurden mit der Festlegung der Biomarker zur Entwicklung von für die intrazelluläre Detektion phagozytierten Materials geeigneten Antikörpern planmäßig abgeschlossen. Es wurde ein Tableau von Antikörpern festgelegt, das zur Charakterisierung der Blut-Phagozyten bei AD in die EDIM-basierte Analyse weiterverwendet wurde. Ergänzend zu den CD14⁺/CD16⁺ Phagozyten wurde zusätzlich die Gruppe CD14⁺/CD16⁻ Phagozyten einbezogen. Das Antikörper-Panel bestand aus anti-Lamp (Positivkontrolle), anti-PhosphoTau181 (INV und kommerziell), anti-Neurogranin, anti-Tau, anti-Synaptophysin und anti-alpha Synuclein. Die Analysen wurden vorerst bis zur Verfügbarkeit der im Rahmen des Projekts entwickelten Antikörper mit kommerziell erhältlichen weitergeführt, um die Datenbasis für die Entwicklung eines EDIM-basierten diagnostischen Algorithmus zu vergrößern und auch kleinere Subgruppen nach ATN-Einteilung (**A**myloidopathie/**T**auopathie/**N**eurodegeneration) analysieren zu können.

AP1-3 Antikörper-Evaluierung im Phagozytose-Modell für EDIM-Anwendung:

Das THP-1-Zellkulturmodell wurde wie geplant für die Verwendung beim Kooperationspartner (INV) adaptiert und von diesem für Vorversuche zur Zellanheftung und zur Lokalisation phagozytierten Materials eingesetzt. Statt der ursprünglich geplanten fixierten primären Monozyten-/Makrophagen-Kulturen wurden wegen ihrer für das Projekt größeren Aussagekraft direkt aus Vollblut isolierte Phagozyten angefärbt und den Kooperationspartnern (QA, INV) darauf basierend Testpräparate zur Verfügung gestellt.

Aufgrund der höheren Aussagekraft für das angestrebte diagnostische System und der zuletzt guten Verfügbarkeit von Patientenproben wurde das ursprünglich geplante Suspensionszellkulturmodell nicht weiter entwickelt, da sich hier insbesondere der Nachweis einer vollständigen Phagozytose des Antigens nicht zuverlässig erbringen ließ und somit unklar blieb, ob phagozytiertes oder anhaftendes Antigen detektiert wurde. Auch erwies sich die lichtmikroskopische Beurteilbarkeit der Zellen diesbezüglich als schwierig.

Im weiteren Verlauf konnten erstmals auch im Rahmen des Projekts entwickelte Antikörper gegen phosphoTau-Protein (INV) an CD14⁺/CD16⁺ Phagozyten aus Vollblut untersucht werden. Die so erzielten Färbungen übertrafen hierbei die Vergleichsfärbungen mit kommerziell erhältlichen Antikörpern (s.a. AP4-1, Abb. 11). Auf Basis der durchflußzytometrischen Daten mit den im Rahmen des Projekts neu entwickelten und direkt markierten anti-phosphoTau-Antikörpern wurde ein erstes EDIM-basiertes diagnostisches Konzept zur Unterscheidung zwischen vorliegender Alzheimerkrankheit und nicht dementen Kontrollpersonen etabliert (Abb. 4).

Eine Unterscheidung zwischen krank und gesund allein anhand der durchflußzytometrischen Daten und nur auf Basis eines einzelnen Markers hat sich dabei – wenig überraschend – bisher noch als schwierig erwiesen, weshalb wir zunächst weiter die N-Zahl der Messungen erhöhten. Hierbei zeigte sich im zeitlichen Verlauf und in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörper-Charge eine zunehmende Nivellierung in der Diskriminierung der Probandengruppen. Aus dem Grund erfolgte nochmals eine eingehende Überprüfung und Optimierung/Standardisierung der eingesetzten Verbrauchsmittel, insbesondere der Permeabilisierungs-/Fixierungs-Puffer und der direkt markierten Antikörperchargen.

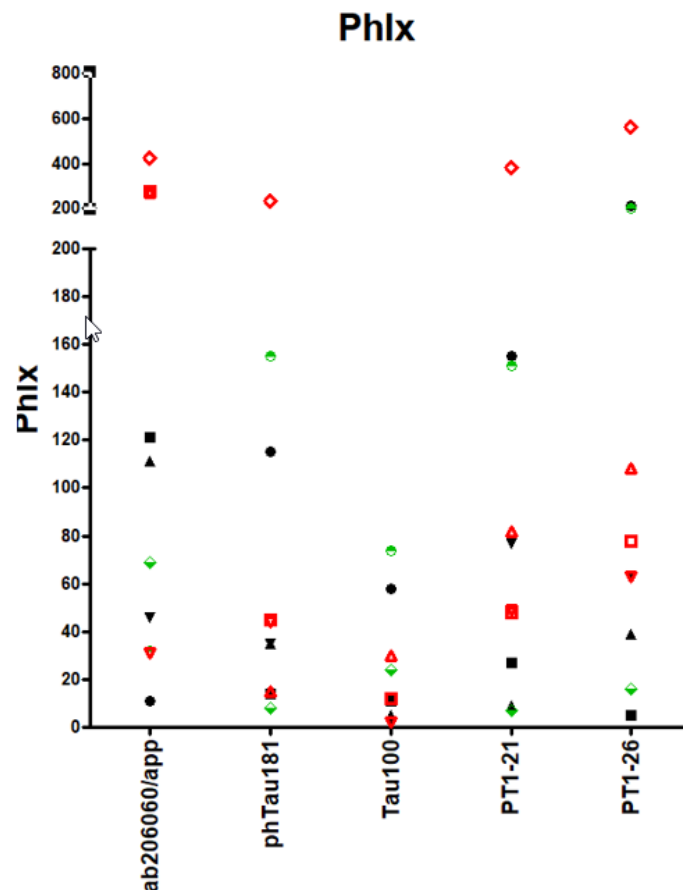


Abb. 4 Optimierte Auswertung als Basis eines EDIM-basierten diagnostischen Konzepts zur Früherkennung Alzheimer-assoziierten Veränderungen in CD14⁺/CD16⁺ Phagozyten aus Vollblut. Die im Rahmen des Projekts eigenentwickelten und direkt markierten monoklonalen Antikörper (PT1-21, PT1-26) erwiesen sich hier im Vergleich zu kommerziellen anti-phosphoTau-Antikörpern als überlegen. Phlx = % positive Zellen x MFI der positiven Zellen. rot = AD, grün = Grenzfälle, schwarz = Kontrollen.

AP1-4 Evaluierung innerhalb eines vorläufigen RCMIA-Modellaufbaus

Mit den etablierten Färbeprotokollen war eine Immunphänotypisierung von PBMC aus Patientenblut bereits möglich (siehe AP1-1). Die gleiche Zellaufarbeitung erlaubte auch eine mikroskopische Analyse als Voraussetzung für die Analyse auf dem RCMIA-Gerät.

Mit Hilfe eines vorläufigen RCMIA-Modellaufbaus war der Nachweis CD14⁺ bzw. CD16⁺ angefarbter Phagozyten aus Patientenblut bereits grundsätzlich möglich, jedoch erwies sich die Lichtempfindlichkeit und die Auflösung für die schwächere intrazelluläre Färbung als noch zu gering. Hier erfolgte eine Überarbeitung des Aufbaus durch die Kooperationspartner (QA, CYT), so dass nun eine verbesserte Version, u.a. mit lichtstärkerem Objektiv (40x) und modifizierter Strahlenteilung, seit Anfang 2022 zur Verfügung steht. An diesem Demonstrator erfolgen derzeit die Anpassungen des Färbeprotokolls und der Schwellenwerte für eine Übertragung der durchflusszytometrischen Färb- und Analysestrategien auf das RCMIA-System (Abb. 5).

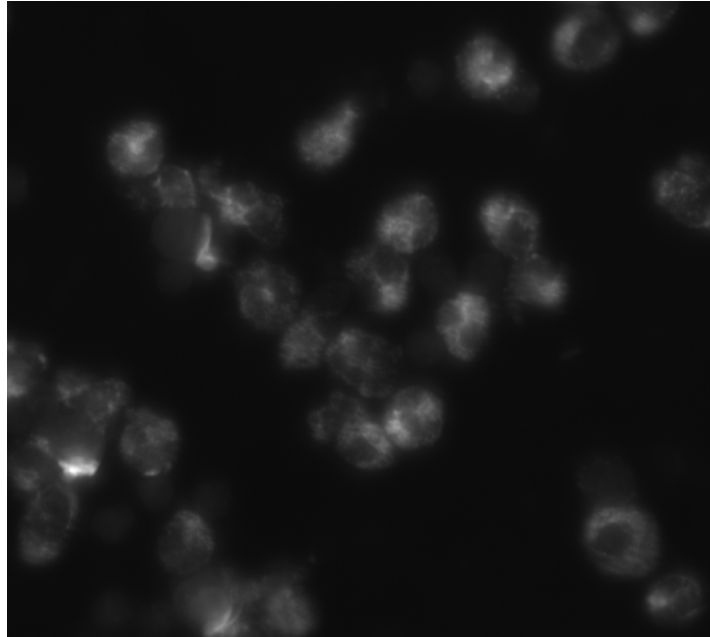


Abb. 5 Immunfluoreszenzfärbung von PBMC aus Vollblut nach durchflusszytometrischem Färbeprotokoll mit direkt markiertem PT1-26 Antikörper der Kooperationspartner (INV/IMT) und dem ersten RCMIA-Demonstrator (QA/CYT). Gut erkennbar ist die hohe subzelluläre Auflösung als Voraussetzung für die Übertragung der EDIM-Analyse auf das RCMIA-System.

Durch den Zugewinn wissenschaftlicher Expertise nach Umwidmung der Personalmittel war es darüber hinaus möglich, mit einem bereits existierenden Multi-Epitope-Ligand-Cartography-System (MELC) eine basale Immunphänotypisierung an Blutproben zu etablieren, die nach Anpassung der Fluidik im Verlauf auf das RCMIA-System übertragen wurde (Abb. 6). Für die Immunphänotypisierung mittels der sequenziellen Färbetechnologie wurde zunächst ein Protokoll zur Anreicherung und Fixierung von PMBCs auf einem Deckglas etabliert. Damit wurde gewährleistet, dass eine gewisse Quantität an Zellen über den Zeitraum der Analyse (Stunden bis Tage) stabil auf dem Objektträger haften bleibt.

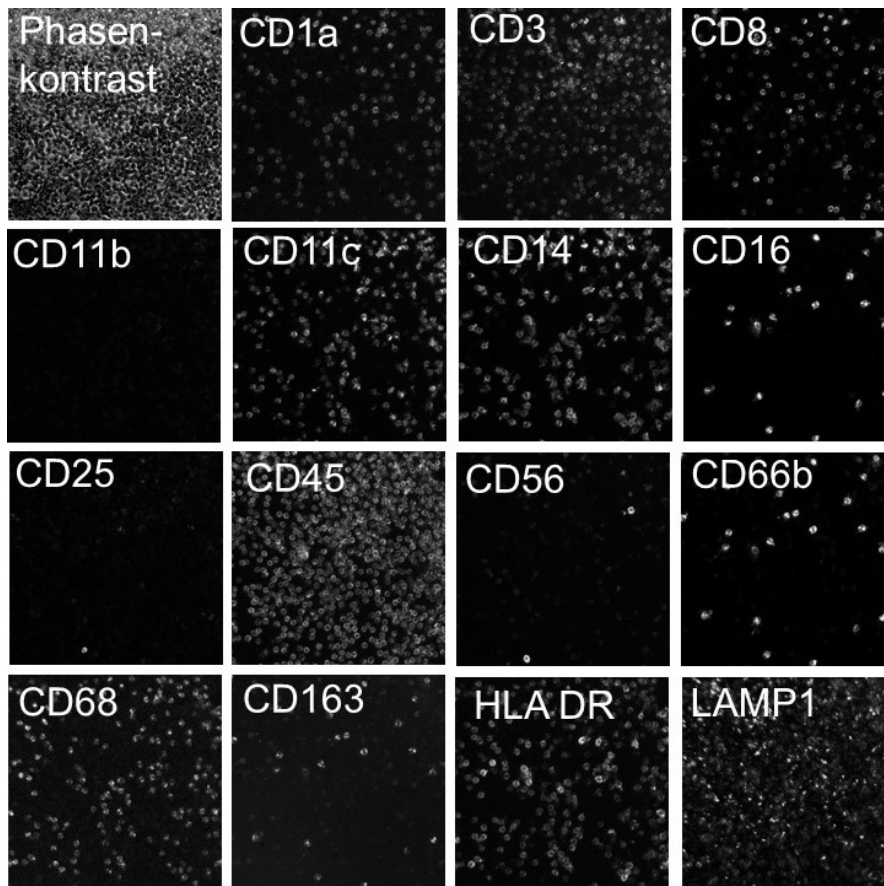


Abb. 6 Immunocytochemische Phänotypisierung von PMBCs mittels MELC-Technologie. Die Fluoreszenzbildgalerie zeigt den gleichen Ausschnitt eines PBMC-Präparats, das sequentiell mit verschiedenen Antikörpern angefärbt wurden.

Bei den Versuchsreihen mit dem ersten Demonstrator hatte sich gezeigt, dass die Auflösung und die Lichtempfindlichkeit für die angestrebte Analyse der Population CD14⁺/CD16⁺-Phagozyten noch zu gering war. Es erfolgte ein Austausch des optischen Aufbaus – u.a. des Objektivs und des Strahlenteilers – durch die Kooperationspartner (QA, CYT). Mit dem daraus resultierenden leistungsstärkeren System wurden zunächst Testreihen von Antikörperfärbungen mit anschließender mikroskopischer Beurteilung durchgeführt. Zur Testung wurden kommerziell erhältliche, gut etablierte Antikörper eingesetzt. Zum einen wurden Oberflächenmarker (CD45, CD4, CD8, CD14) zur Evaluation verwendet, aber auch intrazelluläre Antikörper wie CD107a. Letztendlich wurden auch die im Rahmen des Projekts entwickelten Antikörper gegen phosphoTau181 zur finalen Eignungsprüfung des Systems eingesetzt.

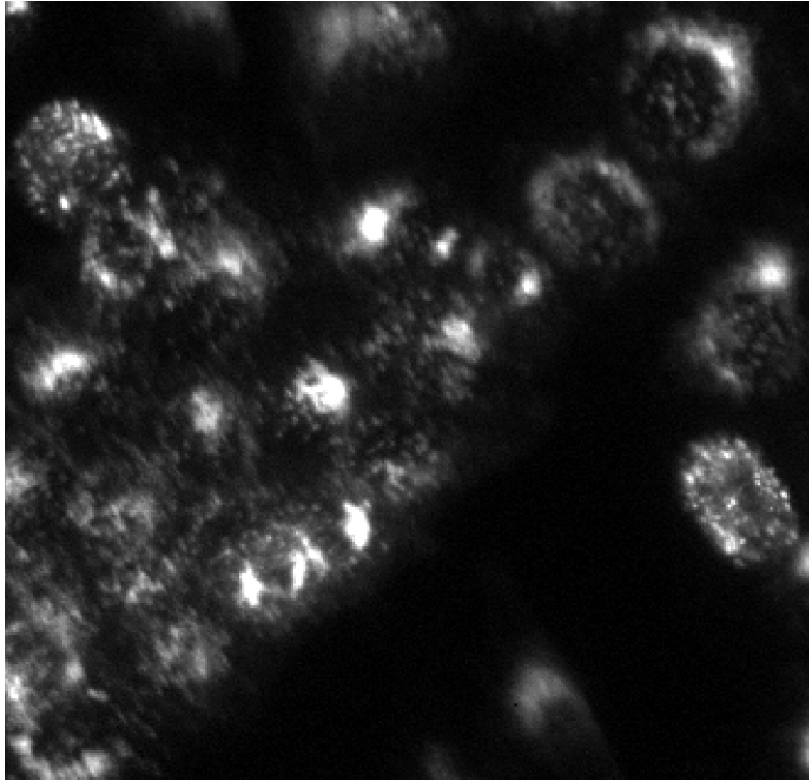


Abb. 7: pTau181-Anfärbung von PMBCs (RCMIA-Gerät v2, 40x Objektiv; Aufnahmedauer 300ms)

Die Signale des anti-pTau181-Antikörpers lassen sich mit der 2. Iteration des RCMIA-Demonstrator erheblich empfindlicher nachweisen, als bei einem Fluoreszenz-mikroskopischen Vergleichssystem. Der enorme Zeitvorteil durch die nun deutlich geringeren Aufnahmezeiten der Einzelbilder ermöglicht es nun, ein Fluoreszenzimaging von großen Probenbereichen (z.B. 5x5 mm) durchzuführen.

Als Vergleichssystem wurde ein System der Firma Keyence (BZ X810) verwendet. Abbildung 8 zeigt hierzu eine CD14-Färbung an PMBCs. Die Oberflächen-Lokalisation des CD14-Antigens geht sehr deutlich aus den Aufnahmen hervor. Das vorliegende System sollte es damit ermöglichen, oberflächenassoziierte von intrazellulären Signalen zu unterscheiden und hierfür entsprechende Analyse-Algorithmen anzuwenden. Gleichzeitig zu beobachten ist ein sehr gutes Kontrastverhältnis, sehr helle Elemente grenzen sich sehr deutlich vor einem gleichmäßig dunklen Hintergrund ab. Hier konnten wurde mit dem nun verbauten Objektiv ZEISS CE Plan-Neofluar 40x/0.75 eine entscheidende Verbesserung erreicht (CYT). Die zuverlässige örtliche Abgrenzung der Fluoreszenz-Signale sehen wir im Kontext des Projektes als sehr wichtig an, da bei den zu erfassenden Zellzahlen eine dichte Anordnung der Zellen auf der Probenfläche notwendig wird und dabei eine robuste Zuordnung der Fluoreszenzsignale auch bei nah aneinander liegenden Zellen erreicht werden sollte. Sowohl hinsichtlich des optischen Auflösungsvermögens als auch bezüglich der erreichbaren Sensitivität in der bildgebenden Erfassung der Fluoreszenzsignale ist die Leistungsfähigkeit des uns zur Verfügung gestellten RCMIA-Demonstrators dem Keyence-Gerät überlegen.

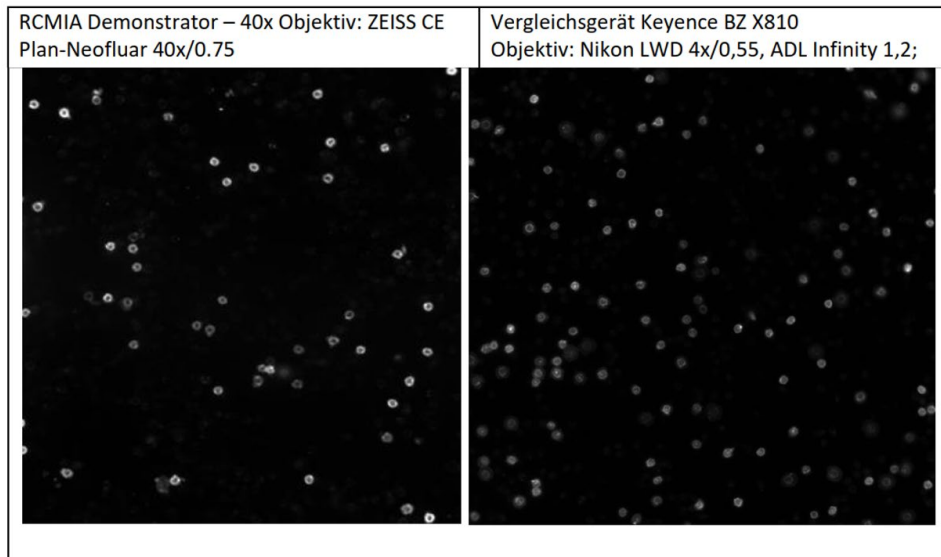


Abb. 8: CD14-Anfärbung von PBMCs – Vergleich RCMIA-Demonstrator und Keyence BZ X810

AP3 Anreicherung und Konservierung von Zellmaterial aus Blut/Liquor für Archivierung und Bio-banking

In Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner IMT wurden verschiedene Fixierprotokolle direkt an Vollblutproben von Patienten verglichen. Ein Fixierprotokoll, das Zellverlust bei sequentieller Mehrfachfärbung vermeidet und sich damit für die RCMIA-gestützte Analyse eignet, konnte etabliert werden. Ferner wurden Zellanreicherungsverfahren aus Vollblut unter Verwendung von Silan-beschichteten Objektträgern erprobt. Silan-beschichtete Glasoberflächen führten infolge elektrostatischer Wechselwirkungen zu einer stabilen Adhärenz von Zellen. Auch für die Liquorzellpräparation konnten Silan-beschichtete Objektträger eingesetzt werden.

Insgesamt wurden 4 verschiedene Fixier-/Konservierungsmethoden getestet (Tabelle 1). Dabei wurde die Probenqualität hinsichtlich a) Adhärenz und Zellmorphologie und b) der Antikörperfärbung überprüft. Letztendlich wurden sehr gute Ergebnisse mit Protokoll 2b (Aceton-Fixierung bei -20°C) und 3 (PFA-Fixierung, RT) erzielt. Dieses wurde für die weiteren Analysen von Blut-/Liquorzellen beibehalten, da es in der Antigenfärbung die beste Spezifität gewährleistete.

	Vorbehandlung	1. Färbung		Lagerung	2. Färbung	
		Probenqualität	Resultat		Probenqualität	Resultat
1	keine (nativ)	Vielzahl der Zellen bleiben nicht haften	---	---	---	---
2a	Aceton RT; 10 s	Viele Zellen schwimmen ab	---	---	---	---
2b	RT; 10 s -20 °C; 10 min	Zellen bleiben haften	Durchgehend sehr gute Antigenfärbung	2 und 4 Monate	Zellen bleiben haften	Durchgehend sehr gute Antigenfärbung
3	PFA	Zellen bleiben haften	Einige Antikörper gehen tadellos, bei manchen sind unspezifische Färbungen erkennbar	2 und 4 Monate	Zellen bleiben haften	Einige Antikörper gehen tadellos, bei manchen sind unspezifische Färbungen erkennbar

Tabelle 1: Fixierprotokolle zur Archivierung von Blut-/Liquorproben

Die im Umgang mit Blutproben gewonnenen Erfahrung wurden in einem nächsten Schritt auf Liquor übertragen. Dabei zeigte sich, dass Liquorzellen aus den verfügbaren und prinzipiell hohen Volumina (ca. 10ml) durchflusszytometrisch grundsätzlich nachweisbar sind, aber die Zellausbeute sehr schwankt (Abb. 9). Weiter erschwerend ergab sich eine hoher Zellverlust bei den Manipulationen zur Aufkonzentration und Färbung der Zellen auf einer kleinen RCMIA-kompatiblen Fläche. Durch Optimierung der Präanalytik ließ sich die Zellausbeute verbessern. In diesem Rahmen wurde auch eine Stabilisierungslösung entwickelt, die eine Analyse von Liquorzellen auch am Folgetag der Abnahme erlaubt und sich potentiell für den Probenversand eignet.

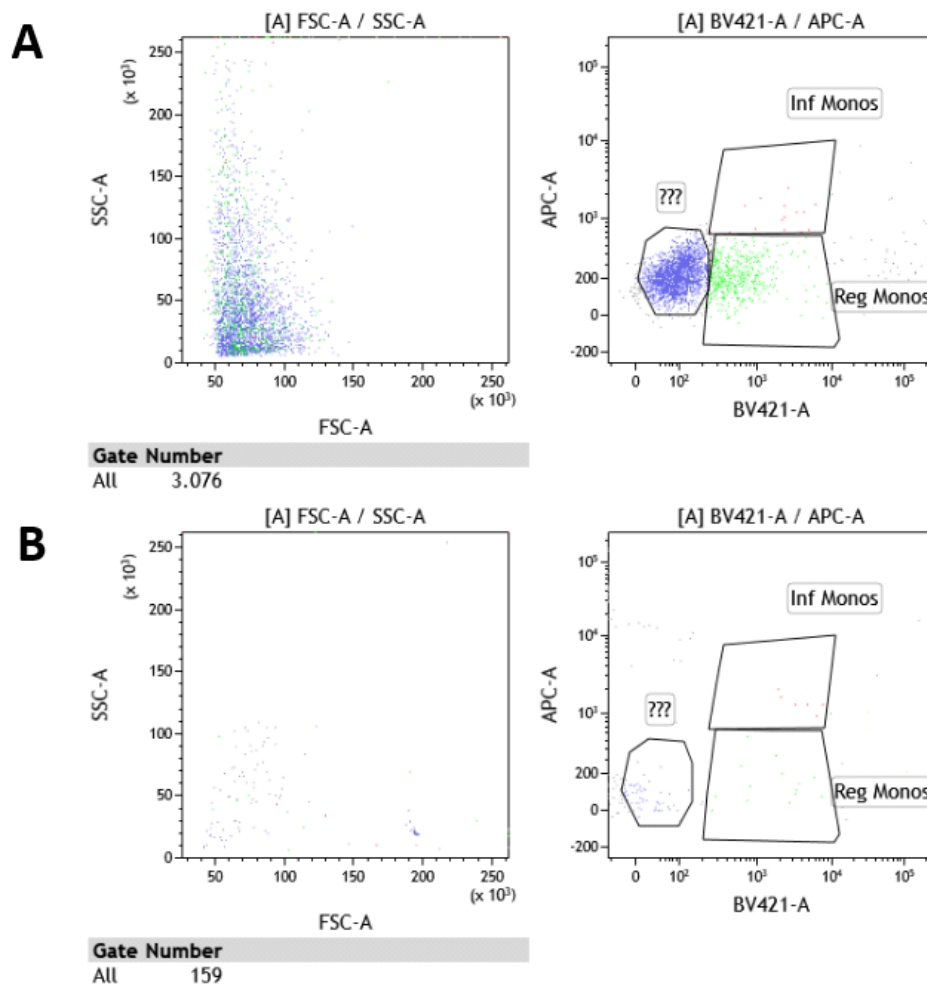


Abb. 9 Durchflußzytometrische Analyse von Liquorzellen. Das CD14-Oberflächenantigen wurde mit dem Antikörper BV421-A angefärbt. A und B zeigen die Schwankungsbreite in der Zahl gemessener Ereignisse in 2 verschiedenen Patientenproben.

Aufgrund der im Vergleich zu Blutphagozyten deutlich schlechteren Haftung wurde für die Konservierung von Liquorzellen nochmals ein erheblich verbessertes Protokoll entwickelt und somit das Ziel erreicht, die Liquorzellen zuverlässig auf eine kleine RCMIA-kompatible Deckglasoberfläche aufzubringen. Hierzu war es notwendig die Liquorzellen über mehrere Zentrifugationschritte (verschiedene g-Zahlen und Volumina) aufzukonzentrieren, so dass am Ende ein Restvolumen von ca. 10 μ l auf ein beschichtetes Deckglas aufgebracht werden konnte. Ein

nochmaliges Zentrifugieren mit anschließender Sedimentation hatte zur Folge, dass die Liquorzellen stabil auf dem Deckglas haften blieben.

Hinsichtlich der Archivierbarkeit der Präparate wurde die strukturelle Beschaffenheit der Zellen zum einen mittels lichtmikroskopischer Methoden, aber auch mit sequentieller Immunfluoreszenzfärbung überprüft. Es wurde frisches Probenmaterial von Vollblut und auch Liquorzellen verwendet. Diese Proben wurden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (initial und nach 2 und 4 Monaten) mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Hinsichtlich der Morphologie aber auch des Antigenfärbemusters wurden mit der zweiten Iteration des RCMIA-Demonstrators für jeden Zeitpunkt sehr zufriedenstellende Ergebnisse erzielt (Abb. 10). Es konnte somit ein Fixierprotokoll für die langfristige Archivierung etabliert werden, das Zellverlust bei sequentieller Mehrfachfärbung im mikrofluidischen Verfahren vermeidet und sich damit für die RCMIA-gestützte Analyse eignet. Es ist somit wahrscheinlich, dass sich eine Lagerung bei -80 °C, auch über mehrer als 4 Monate nicht negativ auf das Probenmaterial auswirkt.

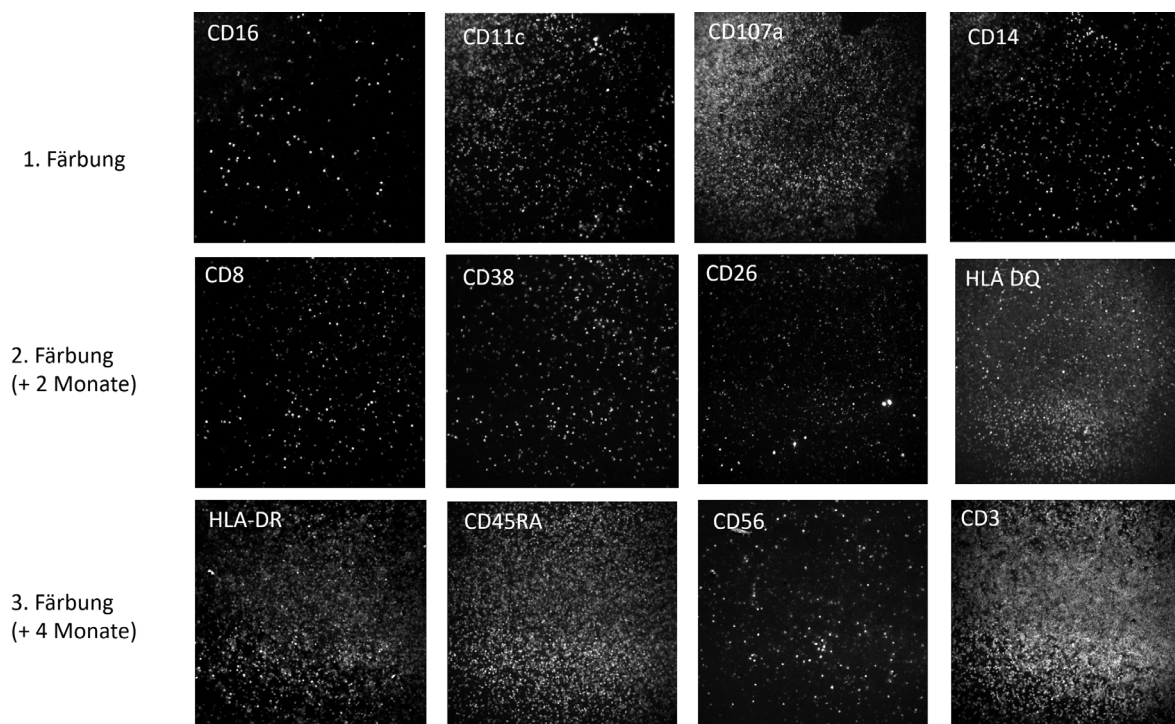


Abb. 10: Wiederholte sequentielle Immunfärbung von archivierten PMBCs

AP4 Umfassende Charakterisierung von Immunzellen aus Liquor/Blut

AP4-1 Immunphänotypisierung von Blut-PBMC mittels Durchflußzytometrie

Die im ersten Förderjahr etablierten Färbeprotokolle für die durchflußzytometrische Immunphänotypisierung erlaubten zwar eine mikroskopische Beurteilung, jedoch wurden hierbei innerhalb der Vollblutfärbungen Zellpopulationen wie die Eosinophilen auch unspezifisch angefärbt. Durch entsprechende Gatingstrategien konnte dieses Problem in der Durchflußzytometrie gelöst werden. Eine Pilotstudie mit Patientenproben konnte zeigen, dass die von den Kooperationspartnern entwickelten und direkt markierten Antikörper zur intrazellulären p181Tau-Färbung den kommerziellen überlegen sind und insbesondere der Klon 26 (PT1-26) zur Diskriminierung der Patientenproben von Kontrollpersonen vielversprechend ist (Abb. 11).

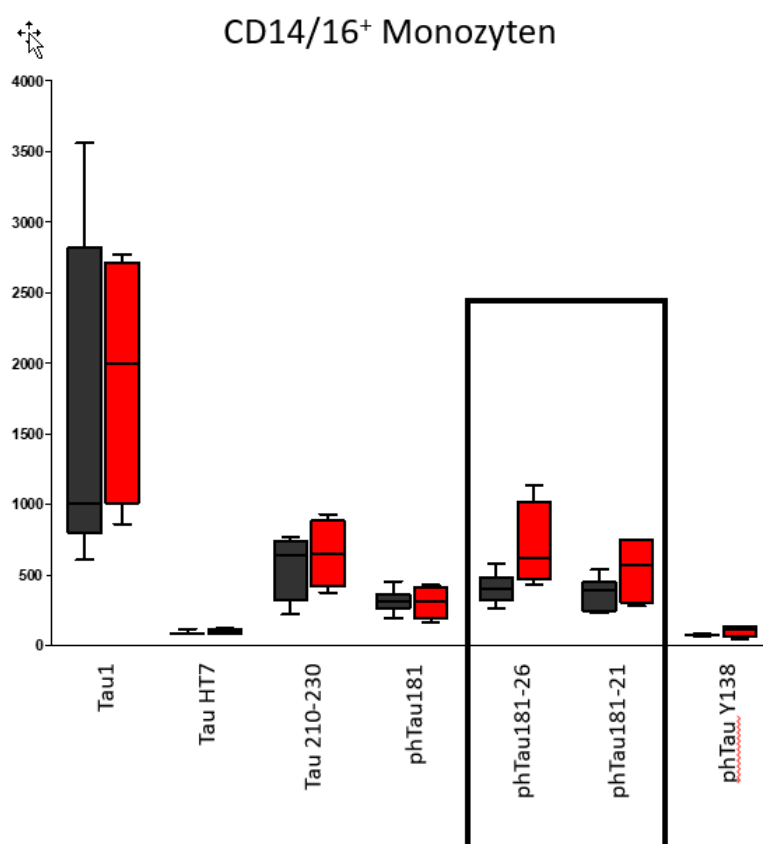


Abb. 11 Nachweis von intrazellulärem 181pTau mittels im Rahmen des Projekts eigenentwickelten und direkt markierten monoklonalen Antikörpern (phTau181-26 und phTau181-21) im Vergleich mit entsprechenden kommerziellen anti-phosphoTau-Antikörpern und anti-Gesamt-Tau-Antikörpern (Tau1). CD14⁺/CD16⁺ Monozyten aus Patientenproben (rot) vs. nichtdementen Kontrollpersonen (grau), n= 5-8.

Nach den vielversprechenden Ergebnissen der Pilotstudie zum Färbeverhalten der von unseren Kooperationspartnern entwickelten Antikörper führten wir diese fort, um mit einer größeren Patientenzahl die Diskrimination von Subgruppen nach ATN-Klassifikation prüfen zu können, d.h. in Abhängigkeit vom Vorliegen einer Amyloidopathie (A+), einer Tauopathie (T+) oder einer Neurodegeneration (N+) (Tab. 2, Abb. 12).

Klassifizierung	Abkürzung
Tauopathie	A-T+
Tauopathie + Amyloidopathie	A+T+
Amyloidopathie	A+T-
Kontrollpersonen	A-T-N-

Tab. 2: ATN-Klassifikation

Dabei zeigte sich im Verlauf die unter AP1-3 beschriebene Nivellierung der Diskrimination der PhosphoTau-Färbung, die in der noch nicht ausreichenden Standardisierung der Färbereagenzien begründet zu sein schien (Abb. 12).

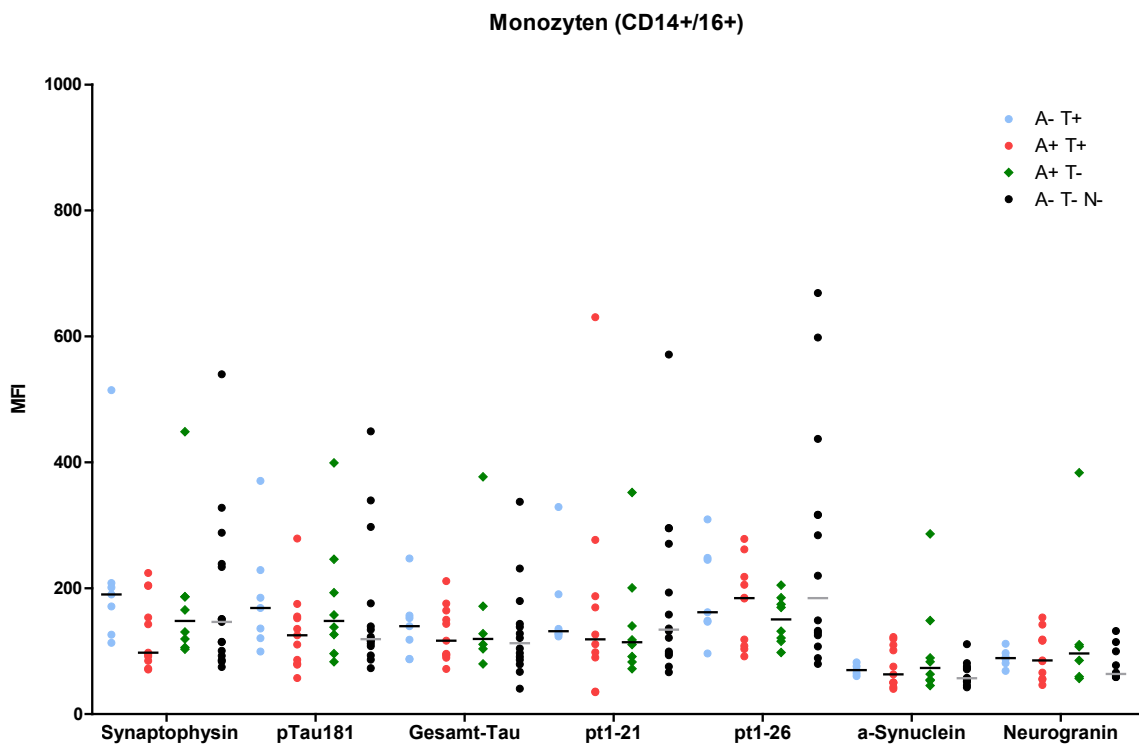


Abb. 12: EDIM-basierte Analyse von Demenzbiomarkern in CD14⁺/CD16⁺ Blut-PBMCs in Abhängigkeit von dem Vorliegen einer Amyloidopathie, Tauopathie und/oder Neurodegeneration nach ATN-Klassifikation.

Es erfolgte eine Anpassung der Reagenzien und Färbeprotokolle, um eine weitere kleine Pilotstudie an Patientenproben durchführen zu können, die derzeit noch (förderungsunabhängig) von den Projektpartnern weiter fortgeführt wird und die noch in Entwicklung befindlichen Antikörper einbezieht. In einer ersten Analyse zeigte sich dabei eine Korrelation des EDIM-Scores der pTau-Färbung in PBMCs mit den im Rahmen der Routine-Demenzdiagnostik ermittelten pTau-Werten im Liquor (Abb. 13).

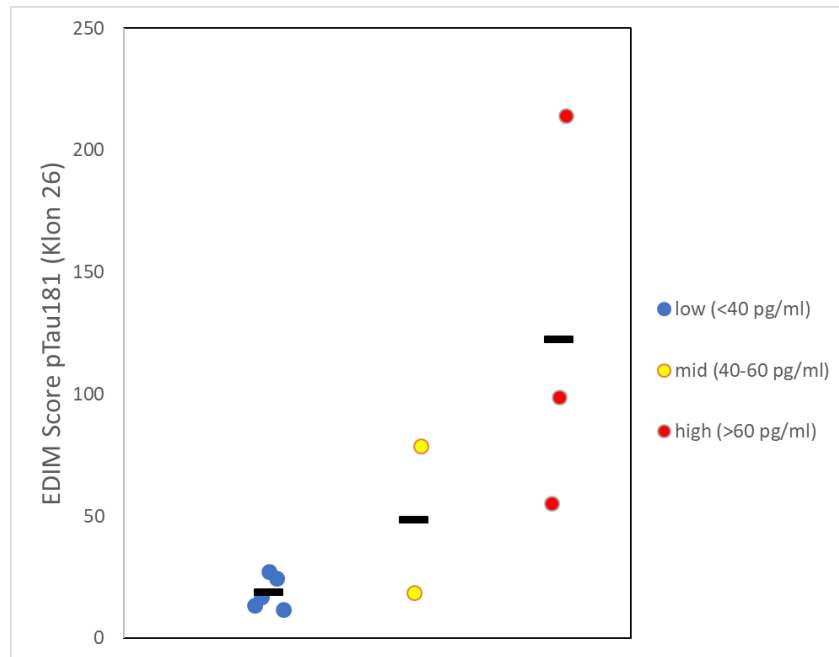


Abb. 13 Vergleich des EDIM-Scores in PBMCs nach überarbeitetem Fixier-/Färbeprotokoll mit den zeitgleich im Rahmen der klinischen Routinediagnostik im Liquor ermittelten pTau-Werten

Auf die Bestimmung des für Phagozytenreifung und -migration relevanten Zytokin-/Chemokinprofils wurde verzichtet zugunsten einer Umwidmung der ursprünglich dafür vorgesehenen Sachmittel zu Personalmitteln für die kostenneutrale Laufzeitverlängerung des Projekts.

AP4-2/AP4-3 Mikroskopgestützte Immunphänotypisierung von Liquorzellen und Quantifizierung des Verteilungsmusters der ermittelten Phagozytenpopulationen bzw. der phagozytierten Proteine und Proteinfragmente

Bezüglich der anfänglich mikroskopgestützten Immunphänotypisierung von Liquorzellen zeigte sich, dass sich das in der Vollblutanalyse eingesetzte Färbeprotokoll zur Oberflächenmarkerbasierten Klassifizierung der Zellen und das darauf basierende durchflusszytometrische Auswerteschema nicht auf Liquorzellen übertragen ließen. Insbesondere ließ sich hier die CD14⁺/CD16⁺ Zellpopulation (n=5) nicht bzw. nur unsicher nachweisen und auch die Zuordnung der größeren Zellpopulationen war hier nicht ohne weiteres möglich, da sie nicht der Verteilung im Blut entsprach (s.a. Abb. 9).

Aus diesem Grund erfolgte der Übergang zur primär RCMA-basierten Klassifizierung, da mit dem überarbeiteten Demonstrator schwache Signale besser erfasst und durch die Scan-Funktionalität gleichzeitig eine größere Anzahl an Zellen beurteilt werden konnten. Durch die erfolgreiche Etablierung eines ersten Anreicherungsprotokolls von Liquorzellen auf spezifisch beschichteten Objektträgern (Abb. 14) wurde die Basis geschaffen, um Liquorzellen mittels RCMA mikroskopisch zu analysieren und zunächst eine breite Immunphänotypisierung durchzuführen.

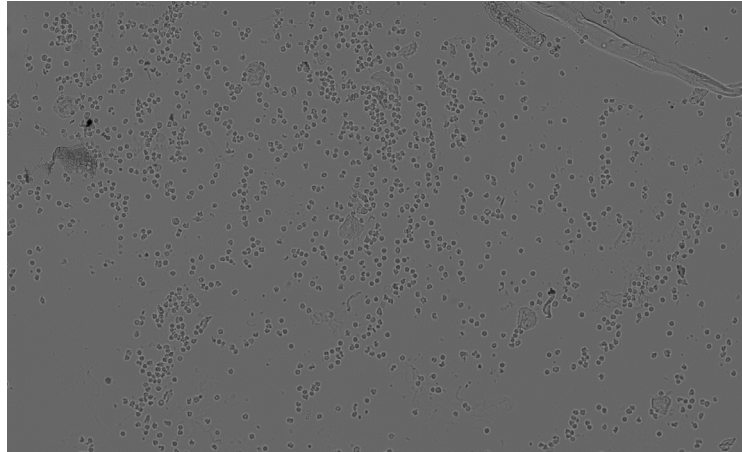


Abb. 14: Durchlichtaufnahme von angereicherten Liquorzellen auf spezifisch beschichtetem Trägermaterial

So wurden zur Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen verschiedene Antikörper gegen zelluläre Antigene (z.B. CD3 für T-Zellen, CD19 für B-Zellen, CD16/56 für NK-Zellen usw.) eingesetzt sowie auch Antikörper, die Auskunft über den Aktivierungszustand der Zellen geben (z.B. HLA-DR auf aktivierten Effektorlymphozyten) (s.a. Abb.15).

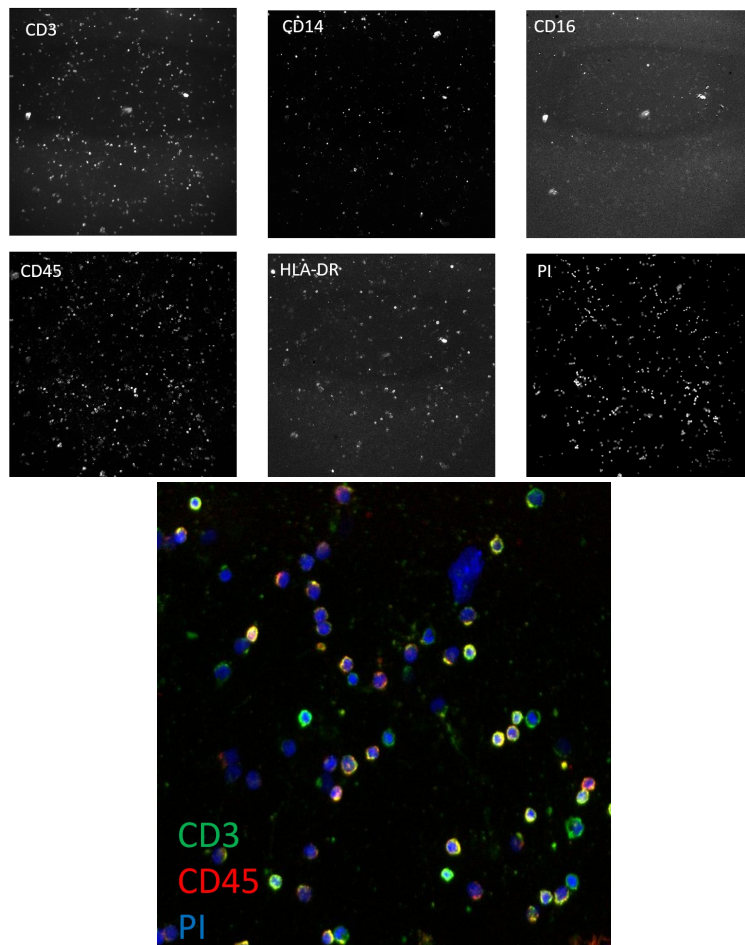


Abb. 15: Multi-Antigen-Färbung von Liquorzellen mit dem RCMIA-Vorgängermodell. Das obere Panel zeigt 6 sequenzielle Antikörperfärbungen zur Immunphänotypisierung, die untere Abbildung ein Overlay von CD3, CD45 und PI.

Die ursprünglich beabsichtigte Mikroskop-gestützte Bestimmung der relativen Anteile etwaiger A β -/Tau-/Neurogranin-/etc.-positiver Zellen an der Gesamtpopulation gelang ebensowenig wie der Nachweis posttranslationaler Modifikationen zur Beurteilung der Gewebsherkunft von APP-Fragmenten.

Um eine Quantifizierung von phagozytierten Proteinen vornehmen zu können, wurde das in AP1-3 entwickelte und auch von den Kooperationspartnern genutzte Phagozytose-Modell eingesetzt. Hierbei wurden THP-1 Zellen mit Beads von einer Größe von 1 μ m inkubiert. Die phagozytierten Partikel wurden dann mit dem RCMIA-Gerät (Abb. 16), aber auch mit einem Vergleichsgerät (Keyence BZ X800, Abb. 17) mikroskopisch untersucht. Die erreichte Auflösung der 1 μ m Beads ist sowohl im Hellfeld als auch im Fluoreszenzbild hervorragend. Die Auflösung des RCMIA-Geräts ist dem BZ-X800 mindestens ebenbürtig und die Auflösung bleibt über den gesamten Bildbereich (ca. 180x180 μ m) des RCMIA-Demonstrators konstant. Die Elemente an den Bildrandbereichen können ebenso detailgetreu wiedergegeben werden, wie die Elemente in der Bildmitte. Insbesondere für die Akquise großflächiger Aufnahmen (Stiching) können wir somit davon ausgehen, dass der gewählte Aufnahmebereich (180x180 μ m) bei dem verbauten Objektiv so beibehalten werden kann. Das RCMIA-Gerät ist auch dem Vergleichsgerät in puncto Auflösungsvermögen überlegen. Somit sind die mikroskopischen Voraussetzungen gegeben, phagozytierte Proteine und Proteinfragmente zu quantifizieren.

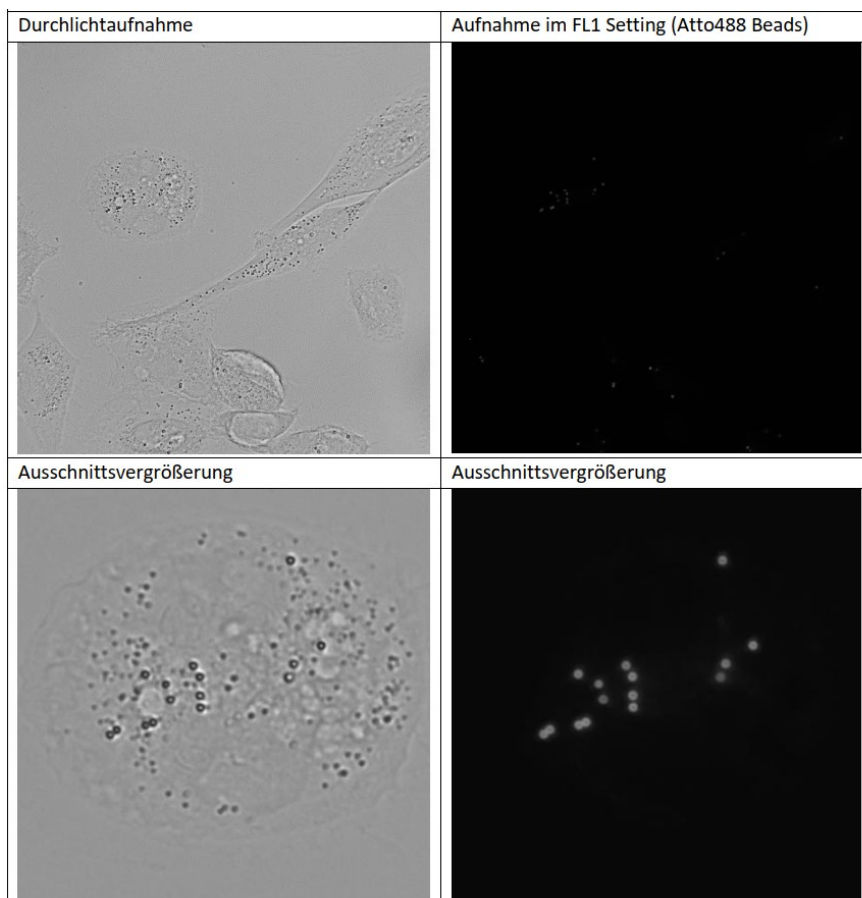


Abb. 16: Phagozytosenachweis mittels RCMIA-Demonstrator (40x Objektiv: Zeiss CE Plan-Neofluar 40x/0.75). Phagozytose von 1 μ m Atto488-beschichteten Polymerpartikeln durch THP-1 Zellen.

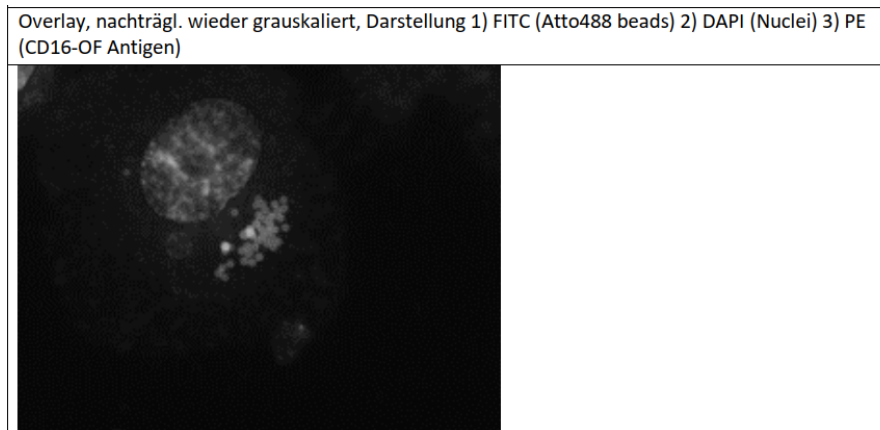


Abb. 17: Phagozytosenachweis mittels Vergleichsgerät Keyence BZ X800 (PlanApo 40x 0.95/0.25). Phagozytose von 1 μ m Atto488-beschichteten Polymerpartikeln durch THP-1 Zellen

AP4-4 Vergleichende RCMIA-Analysen mit Liquor zur Evaluierung der Übertragbarkeit der blutbasierten Diagnostik

Sowohl bezüglich des optischen Auflösungsvermögens als auch bezüglich der erreichbaren Sensitivität in der bildgebenden Erfassung der Fluoreszenzsignale war die Leistungsfähigkeit des zweiten RCMIA-Demonstrators sehr überzeugend. Auch war die einwandfreie Funktionalität der Färbekammer und des steuerbaren X/Y Tisches innerhalb des Systems gegeben. Die am Ende des Projektzeitraums avisierte dritte Ausbaustufe des RCMIA Instruments mit 4 quasi-synchronen FL-Emissions-Kanälen (CYT, QA) bringt noch weitere entscheidende Verbesserungen für die zeitsparende Erfassung mehrerer FL-Kanäle, konnte aber im klinischen Umfeld nicht mehr getestet werden.

Bei Erfassung von Testdaten zeigte sich, dass sich im Laufe eines sequentiellen Färbeprozesses mit fortschreitender Analyse ein zunehmender Shift in Z-Richtung einstellte. Die anfangs scharf fokussierte Probe entfokussierte sich mit jedem neuen Antikörperfärbeszyklus. Mit den so gewonnenen Daten war es darum – trotz leistungsfähigem Demonstrator – zunächst noch nicht möglich, eine phänotypische Differenzierung der Vollblut- bzw. Liquorzellen vorzunehmen (Abb. 18).

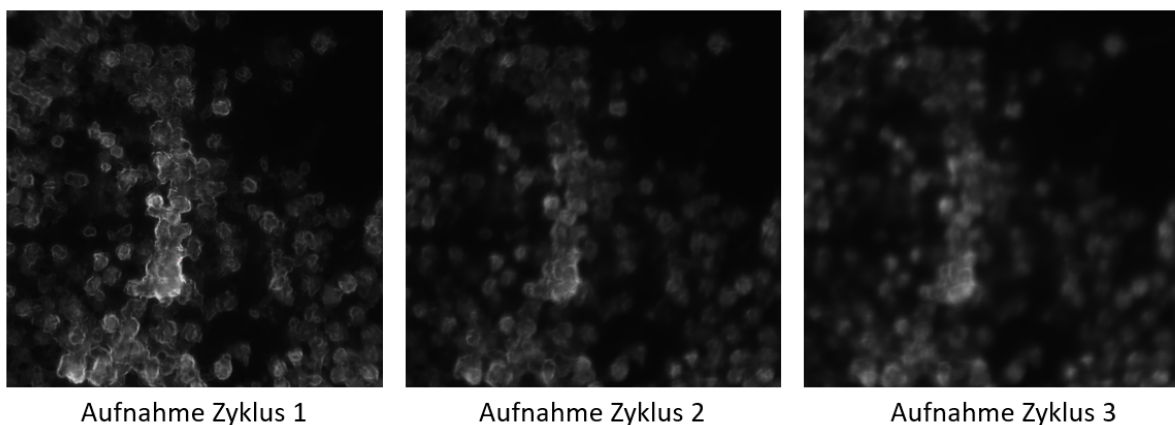


Abb. 18: Testreihe zur Messung des Z-Shifts mit einem Zellpräparat. Aufnahmezyklen 1-3.

Grund des Defokussierungsproblems war ein Aufquellen der Kunststoffteile der Inkubationskammer im Kontakt mit PBS-Pufferlösung. Dieser Prozess sorgte für eine kontinuierliche Distanzierung des Präparats vom Objektiv. Durch Überarbeitung der Inkubationskammern ließ sich das Problem schließlich beheben, so dass Multipitopfärbungen einschließlich des im Rahmen des Projekts entwickelten pTau-Antikörpers erfolgreich verliefen und den Nachweis einer distinkten pTau-positiven Zellpopulation erbrachten (Abb. 19).

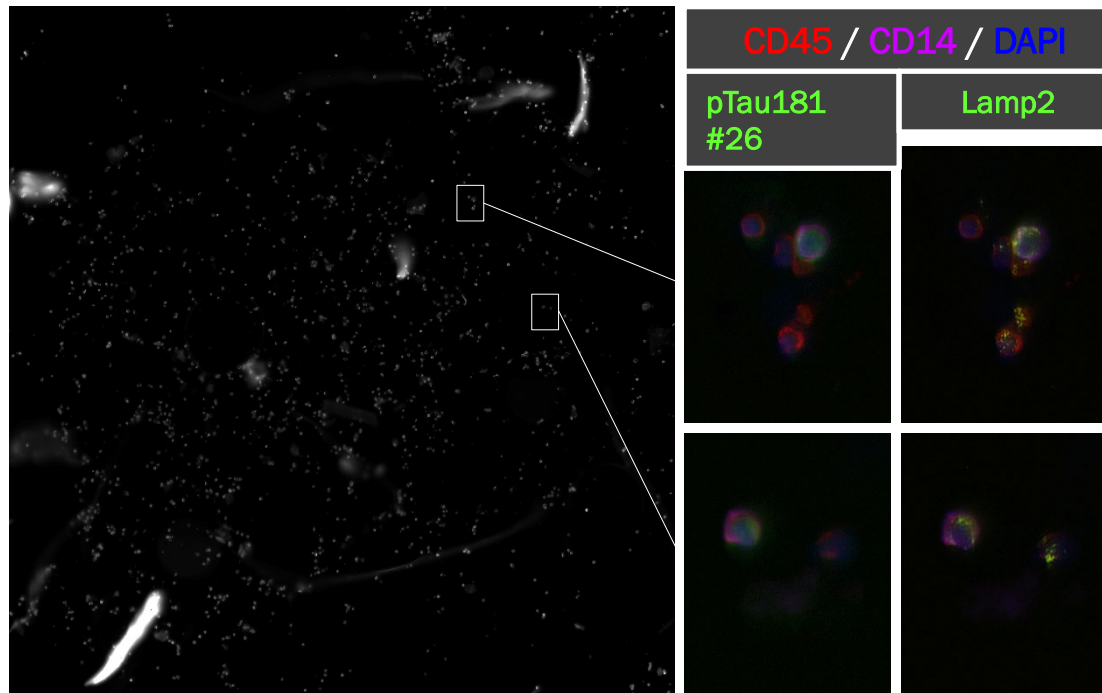


Abb. 19: Sequentielle Multipitop-Färbung einschließlich pTau181 (Klon 26) an Liquorzellen (RCMIA v2, überarbeitete Inkubationskammer)

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

AP5-1 Entwicklung des EDIM-basierten diagnostischen Konzepts zur Früherkennung Alzheimer-assoziierter Veränderungen im Vollblut

Das in AP4-1 erläuterte diagnostische Konzept zeigte in einer kleinen Kohorte bereits eine gute Korrelation zu den Routineliquorwerten für pTau (Abb. 13). Im Rahmen der fortlaufenden Pilotstudie konnten zwischenzeitlich auch für Neurogranin EDIM-Scores ermittelt und mit dem Erlangen Score verglichen werden, der die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Alzheimerkrankheit anhand der Liquor-Biomarker $A\beta_{1-42}$, $A\beta$ -Ratio, Tau und pTau graduiert (0=weder Amyloidopathie noch Tauopathie, 4=Amyloido- und Tauopathie). Hier zeigte sich zwar ein Trend, jedoch erlaubten die Neurogranin-EDIM-Scores keine scharfe Abgrenzung zwischen Demenzbiomarkerpositiven und -negativen Patientengruppen (Abb. 20). Somit erscheint eine Kombination der PBMC-EDIM-Scores für Neurogranin und pTau vielversprechend und wird von den Projektpartnern weiterverfolgt, kann aber aufgrund der geringen Fallzahlen zum Berichtszeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden.

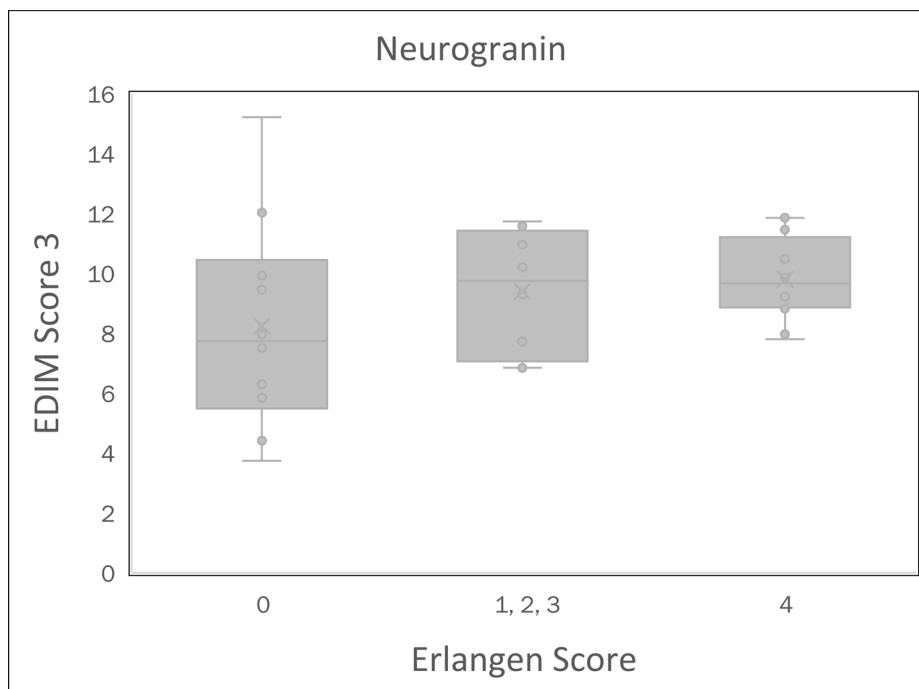


Abb. 20 Vergleich des EDIM-Scores für Neurogranin mit dem Erlangen-Score auf Basis der Routine-Demenzbiomarker im Liquor als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Alzheimerkrankheit

Die Differenzierung zwischen phagozytierten aggregierten versus nicht aggregierten Formen von $A\beta_{1-42}$ und pTau gelang mit den verfügbaren kommerziellen Antikörpern nicht und auch die Immunisierungsläufe der Projektpartner (INV) erbrachten diesbezüglich bisher noch keine vielversprechenden Klone.

AP5-2 Translation der chemisch-biologischen Detektionsprinzipien auf das bildgebende Verfahren des RCMIA-Systems

Das in AP4-1 bzw. AP5-1 erläuterte EDIM-basierte diagnostische Konzept konnte im ursprünglichen Projektzeitraum aufgrund der an den RCMIA-Demonstratoren, zuletzt aber an den Inkubationskammern erforderlichen Anpassungen noch nicht umfassend in der laufenden klinischen Diagnostik getestet werden. Im Rahmen der Laufzeitverlängerung des Projekts gelang aber mit der letzten Iteration des RCMIA-Systems erstmals eine sequentielle Multipitop-Analyse, im Rahmen derer mit dem von den Kooperationspartnern entwickelten pTau181-Antikörper (Klon 26) einzelne Liquorzellen aus Liquorproben der laufenden klinischen Diagnostik intrazellulär angefärbt wurden.

AP5-3 Testung und Einbindung zusätzlich geschaffener Funktionalitäten in den diagnostischen Ablauf

Die letzte Version des RCMIA-Geräts wurde im Rahmen der Laufzeitverlängerung und gemeinsam mit den Kooperationspartnern gegenwärtig auch darüber hinaus im Rahmen der weitergeführten Pilotstudie einem Praxistest unterzogen. Hierbei zeigten sich weiterhin die schon vorher beobachteten großen individuellen Schwankungen in der Liquorzellausbeute. Zwischenzeitlich konnten aber zahlreiche potentielle Störfaktoren in der Präanalytik beseitigt werden, mit Hilfe der im Rahmen des Projekts entwickelten Stabilisierungslösung erbrachte sogar eine Analyse am Folgetag gute Ergebnisse. Daher ist hier tatsächlich von einer Patientengröße auszugehen,

an die die Analysestrategie angepasst werden muss, z.B. durch Erweiterung der gescannten Fläche und entsprechende Anpassungen der Software-Module (IMT, QA).

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

AP6-1 Standardisierung des diagnostischen Verfahrens

Im Rahmen des in AP5-3 erfolgten Praxistest erfolgte eine Integration des RCMIA-Systems in den Workflow der routinemäßigen neurochemischen Demenzdiagnostik. Dabei konnte die Bearbeitung der Proben auf eine Maximierung der Liquorzellausbeute hin optimiert werden. Mit Hilfe der o.g. Stabilisierungslösung konnten RCMIA-Analysen an Liquorzellen noch am Folgetag erfolgen. Auch wurde der Zellverlust bei Wechsel der Probengefäße auf ein Mindestmaß reduziert. Der mikrofluidische Ansatz der Probenanfärbung birgt in der Praxis zwar Risiken des Zellverlusts durch Scherkräfte, stellt aber andererseits einen wichtigen Faktor für die Standardisierung und Beschleunigung der Färbung dar. Die letzte Iteration des RCMIA-Geräts zu einem Mehrkanalsystem (s. Schlussbericht Cytecs), dessen Testung nicht mehr Teil des Projekts war, stellt einen weiteren Schritt hin zur Verkürzung der Dauer einer Mehrfachanalyse dar, da hiermit simultane und sequentielle Mehrfachfärbungen möglich werden.

AP6-2 Verbreitung der Ergebnisse, Austausch mit der wissenschaftlichen Fachwelt

Publikationen in wissenschaftlichen Fachjournalen sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht erfolgt. Allerdings wurde die RCMIA-Plattform von den Projektpartnern (Dr. Luttmann, Immunotools) im europäischen Ausland präsentiert und stieß dort in wissenschaftlichen Fachkreisen auf großes Interesse. Dieses Interesse bündelt der sog. „FlowSiAM-Award“ im Hinblick auf wissenschaftliche Vernetzung und der Planung von (multizentrischen) Studien an größeren Patientenkohorten mit Ausrichtung auf Neurodegeneration.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die bereitgestellten Mittel wurden weitgehend wie geplant eingesetzt und flossen mit einem Anteil von über 90% in die Finanzierung des wissenschaftlichen Personals. Aufgrund des kontinuierlichen Patientenprobenzugangs und des iterativen Charakters der RCMIA-Systementwicklung war eine Verkürzung der Bearbeitungszeit oder blockweise Personalplanung nicht möglich. Die Verwendung der Verbrauchsmittel erfolgte weitgehend wie ursprünglich geplant. Ein Teil der Sachmittel wurde im Sinne einer kostenneutralen Laufzeitverlängerung nach Bewilligung in Personalmittel umgewidmet. Im Zuge des Projekts wurden keine Aufträge vergeben. Aufgrund der Corona-Pandemie wurden Reisen anfänglich zurückgestellt. Im weiteren Verlauf konnten die Absprachen mit den Projektpartnern und die Projekttreffen weitgehend mit Hilfe von Videokonferenzsystemen erfolgen. Notwendige Treffen in Präsenz erfolgten primär am hiesigen Standort, da dies Optimierungsarbeiten am RCMIA-System im klinischen Kontext ermöglichte. Somit wurden insgesamt keine Reisekosten verausgabt. Für das Projekt mussten keine Investitionen getätigt werden, da die labortechnische Ausstattung und die benötigten Flächen vorhanden waren.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Innerhalb des Projekts sollte ein anspruchsvolles System aus optischer und mikrofluidischer Apparatur, spezifischen Antikörpern, diversen Verbrauchsmaterialien und Analysesoftware

entwickelt werden, was einen hohen Anteil an risikoreicher Forschungs- und Entwicklungsarbeit beinhaltete. Der weit überwiegende Teil der Teilprojektkosten entfiel daher auf die Finanzierung wissenschaftlichen Personals (s.o.). Im Verlauf des Projekts ergaben sich anfangs Pandemiebedingte Verzögerungen, weshalb eine kostenneutrale Laufzeitverlängerung beantragt und bewilligt wurde. Auch zeigte sich, dass der Routineanteil des Projekts angesichts der notwendigen Anpassungen am System, die in mehreren Iterationen umgesetzt wurden, deutlich geringer ausfiel als ursprünglich geplant. Aus diesem Grund wurde eine kostenneutrale Umwidmung der ursprünglich bewilligten MTA-Stelle in eine wissenschaftliche Stelle beantragt und bewilligt. Die Verwendung der eingesetzten Mittel erfolgte somit insgesamt sparsam. So wurde beispielsweise auf Reisen ganz verzichtet, da sich hier Videokonferenzen und die Besuche der Projektpartner vor Ort als ausreichend praktikabel erwiesen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Bereits in der zweiten Version des Demonstrators zeigte sich das RCMIA-System als flexible Plattform für die Analyse seltener Zellpopulationen, die auf großes Interesse in der wissenschaftlichen Gemeinde stößt. Derzeit erfolgt eine Vernetzung unter dem Dach des „FlowSiAM-Awards“ (IMT) für künftige Kooperationen, insbesondere im Hinblick auf die weitere, vertiefte Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen an größeren Patientenkohorten, die z.B. auch die Parkinson-Erkrankung einschließt.

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

Während der gesamten Laufzeit des Projektes sind keine Ergebnisse seitens Dritter bekannt geworden, die einen Einfluss auf die wissenschaftlich/technische Umsetzungsfähigkeit oder die künftige Verwertungsaussicht in Bezug auf das Gesamtvorhaben und auch auf unser Teilprojekt hätten.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Bisher sind noch keine Veröffentlichungen zu den Projektergebnissen erfolgt.

Erlangen, 30.06.2024

Priv. Doz. Dr. med. Juan Manuel Maler