Schlussbericht – Teilprojekt zum Verbundvorhaben „NADIM“: Erforschung von Detektionsreagenzien für den Nachweis von molekularen Markern der Alzheimer-Krankheit in Zellen des Blutes

Förderkennzeichen: 13GW0406C

# I. Kurze Darstellung

**1. Aufgabenstellung:**

Die Alzheimer-Krankheit und andere Formen von Demenz beeinträchtigen immer mehr Menschen im fortgeschrittenen Lebensalter und Prognosen gehen davon aus, dass sich dieser Trend in den nächsten Jahren weiter fortsetzen wird. Dementielle Erkrankungen können bisher kaum therapiert werden, weil sich erste Symptome erst Jahre nach Ausbruch der Krankheit zeigen. Zu diesem Zeitpunkt sind Veränderungen im Gehirn bereits weit fortgeschritten und das Zeitfenster, den Verlauf der Krankheit positiv zu beeinflussen, ist nahezu geschlossen. Eine Früherkennung könnte viele neue Optionen bieten um Therapiemöglichkeiten zu verbessern und damit die Schwere der Erkrankung abzumildern. So konnte beispielsweise in einer kürzlich veröffentlichten Studie, die erfolgreiche Reduzierung von β-Amyloid-Plaques im Gehirn durch eine Dopamin-Therapie gezeigt werden. [1] Doch auch hier gilt: effektive Therapien, müssen frühestmöglich begonnen werden, bestenfalls, bevor es zu einem massiven Absterben von Neuronen kommt und diese damit irreversibel verloren sind.

Erst in den letzten Jahren werden Ansätze verfolgt, bei denen Biomarker für Alzheimer erforscht werden und in neuen bildgebenden Verfahren getestet werden. Die Bestimmung von hyperphosphoryliertem Tau und bestimmten Aβ-Peptiden in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) findet in seiner diagnostischen Aussagekraft immer mehr Akzeptanz in der Wissenschaft [2]. Weitere Bestrebungen erforschen u.a. die Rolle von Biomarkern bei der Proteinaggregation, Neuro-inflammation und -degeneration. Mit der Entdeckung, dass sich auch im Blut periphere Tau- Oligomere und Amyloid-Varianten detektieren lassen, bietet sich die Möglichkeit der Alzheimerdiagnose über eine weniger invasive Technik als die Lumbalpunktion. Dieser Ansatz des Nachweises von Alzheimer-assoziierten Signaturen im Blut soll mit dem Verbundvorhaben „NADIM“ verfolgt werden. Dabei liegt der Fokus auf der Analyse von spezifischen Monozytenpopulationen. Diese Zellen sind befähigt, molekulare Muster von Pathogen oder apoptotischen Zellen zu erkennen und sie im Anschluss durch Phagozytose aufzunehmen. In der Zelle schließt sich ein proteolytischer Aufschluss der phagozytierten Strukturen an, was in kleineren Peptidfragmenten resultiert, welche noch einige Zeit nachweisbar sind. Diese Fragmente sollen im Patientenblut auf das etwaige Vorhandensein von Alzheimer spezifischen Epitopen untersucht werden. Da einige Monozyten auch zum Übertritt der Blut-Hirnschranke in der Lage sind, bietet sich hier potenziell die Möglichkeit, krankheitsassoziierte Signaturen, die zuvor in der CSF aufgenommen wurden, im Blut zu detektieren.

Im Verbundvorhaben war die ImmunoTools GmbH für die Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern verantwortlich, um diese als Sonden für den im Projekt beabsichtigten intrazellulären Epitopnachweis verfügbar zu machen. Auch sollte eine Software gefunden- beziehungsweise entwickelt werden, die in der Lage ist, Zellen aus Blut und Liquor auf phagozytierte Alzheimer assoziierte Marker zu analysieren. Es wurde untersucht, welche Oberflächenbehandlung für eine Zellanreicherung in einer zellentragenden Kammer geeignet ist und wie sich diese Zellen für einen längeren Zeitraum konservieren lassen, um sie gegebenenfalls einer späteren Analyse zu unterziehen. Eine weitere Aufgabe war die Harmonisierung der Fluidik des Demonstrators mit der Zellkammer und der gründlichen Testung des Systems in der praktischen Anwendung. Dafür wurden unterschiedliche

Kammerformen und Materialien untersucht und Puffer entwickelt, die zuverlässige Ergebnisse während der Messung liefern.

**2. Wissenschaftlicher und technischer Stand:**

Aktuell ist man bei der Diagnostik der Alzheimer-Krankheit auf eine aufwendige Lumbalpunktion angewiesen. Die daraus gewonnene Cerebrospinalflüssigkeit wird über klassische Immunassays auf hyperphosphoryliertes Tau und bestimmte Aβ-Peptide untersucht und kann schon Jahre vor dem Auftreten erster Krankheitssymptome auffällige Resultate anzeigen.

Der Ansatz, die Diagnostik auf Blut zu verlagern, stützt sich auf ermutigende Ergebnisse, die über die EDIM-Technologie erzielt werden konnten [3]. Im Kontext der Krebsfrühdiagnostik ließen sich bei der zytometrischen Analyse von Mitochondrien molekulare Signaturen entdecken, die auf eine Krebserkrankung hinweisen. Dieses Prinzip soll in diesem Projekt um eine weitere bildgebende Methode ergänzt werden. Die Durchflusszytometrie bietet die Chance sehr viele Zellen in kurzer Zeit zu analysieren. Allerdings können bisher internalisierte Strukturen parallel nur mit ein bis zwei Antikörpern angefärbt werden. Danach sind die gemessenen Zellen für weitere Analysen verloren. Der bildgebende Ansatz ermöglicht die wiederholte Untersuchung der gleichen Probe hinsichtlich einer ganzen Reihe von krankheitsassoziierten Epitopen. Dies ist insbesondere bei der Analyse von Liquor interessant, der sich bisher aufgrund der extrem niedrigen Zellzahl, die in diesem Probenmaterial anzutreffen ist, der durchflusszytometrischen Untersuchung weitestgehend entzieht.

**3. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:**

Als kommerzieller Verkäufer von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, bestand bereits eine weitreichende Expertise zur Kopplung von Antikörpern an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Neu entwickelte Antikörper konnten so effizient mit den gewünschten Fluorochromen gekoppelt werden. Außerdem konnte bei der Methodenentwicklung auf eine Reihe von Antikörpern gegen die gängigsten Zelloberflächenmarkern zurückgegriffen werden, die zum Teil aus Vorarbeiten des Forschungslabors der Immunotools GmbH entstanden sind und sich im regulären Verkauf befinden. Zusätzlich gab es aus zurückliegenden FuE-Aktivitäten innerhalb europäischer Verbundforschungs-projekte [MABPROF-Hochdurchsatztechnologie, RETHRIM, PARAGONE] bereits Vorkenntnisse aus dem Bereich der Kopplungschemie, welche in die Erprobung und Behandlung der Zellkammer fließen konnten.

Im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie mussten die entsprechenden Kompetenzen erst sukzessiv erworben werden. Insbesondere war dem Aspekt Sorge zu tragen, dass die Arbeiten an den sich sehr unterschiedlich verhaltenden Blut- und Liquorproben spezifisch abgestimmte Vorgehensweisen erforderten.

**4. Ablauf des Vorhabens:**

Im März 2020 begann die Bearbeitung der ersten Arbeitspakete. Zunächst wurde ausschließlich mit Blut als Ausgangsmaterial gearbeitet und die Grundlagen für die Aufarbeitung von Zellen, Zellfixier- und Färbeprotokolle wurden erprobt. Anfangs erfolgte die Auswertung der erstellten Präparate mit einem modellhaften Aufbau, der im weiteren Verlauf des Projektes durch einen vom Projektpartner bereitgestellten Demonstrator ersetzt wurde. Hinzu kam die Testung verschiedener Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper und deren Eignung für die Anwendung am Demonstrator. Da es für das Projekt essentiell war, die eher seltenen Monozyten aus den Blutzellsuspensionen auf einem Trägermaterial anzureichern, wurde zahlreiche Protokolle ausprobiert und verschiedene

Parameter angepasst, bis eine Methode gefunden war, die zufriedenstellende Ergebnisse erzielte. Eine reproduzierbare Anreicherung von $CD14^+$ Zielzellen auf Glas als Trägermaterial bei einer gleichzeitigen Reduzierung von $CD16^+$ Granulozyten konnte erfolgreich etabliert werden. Parallel dazu wurde eine Python-basierte Software entwickelt, die mit Hilfe von Hell-Dunkel-Diskriminierung eine halbautomatische Zellerkennung umsetzt. Im weiteren Verlauf konnten zusätzliche Funktionen zur Bestimmung morphologischer Parameter und die Erfassung von zwei oder mehr Fluoreszenzparametern erfolgreich in der Software implementiert werden. Eine Überführung dieser gewonnenen Rohdaten mit dem „Multiplot“ Tool ermöglichte eine Visualisierung der Daten in einem Streudiagramm. Damit gelang es, die Ergebnisse von Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie miteinander zu korrelieren und eine vergleichbare Sensitivität für beide Methoden nachzuweisen. Dieser Projektteil wurde erfolgreich in der ursprünglichen Zeitplanung bis zum Halbzeitmeilenstein umgesetzt. In der anschließenden Projektphase wurde das Kammerdesign und die Auswahl der Trägermaterials optimiert, um für verbesserte Strömungsbedingungen in der Zellkammer zu sorgen. Dann konnte die überarbeitete Zellkammerversion und die Fluidik des RCMIA-Systems miteinander getestet und serielle Färbungen mit entsprechenden Bleichschritten durchgeführt werden. Die gleichzeitige Weiterentwicklung der Software konzentrierte sich nun auf die Erfassung und Verarbeitung großer Datenmengen, wie sie bei mehreren mm großen Aufnahmen entstehen. Pandemiebedingt bestand erst gegen Ende des Projektes die Möglichkeit, mit Liquor zu arbeiten. Dies resultierte in einer mehrmonatigen Verzögerung des Projektfortschritts, da die Arbeit mit Liquor als Probenmaterial ganz besondere Ansprüche stellt und es nötig war, hierfür neue Methoden zu entwickeln. Durch die vom Projektträger gewährte kostenneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit um 12 Monate konnten die Arbeiten in diesem Bereich weiter fortgeführt werden.

**5. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen:**

Die Arbeitspakete konnten zum überwiegenden Teil wie geplant umgesetzt werden. Die im Antrag gefassten Ziele wurden weitestgehend erreicht:

1. Die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Antikörper, die sich gegen Oberflächenmarker und einige Demenzmarker richten, welche uns von unserem Partner der INVIGATE GmbH übergeben worden sind, konnte gut umgesetzt werden.
2. Der von unseren Partnern Quantum und Cytecs bereitgestellte Demonstrator wurde im Projektverlauf stetig optimiert und um weitere Fluoreszenzkanäle erweitert. Der Einsatz eines hochwertigen Objektivs verbesserte die Bildauflösung entscheidend, was die Bildanalyse und Erstellung von Overlays ermöglichte. Unsere Projektpartner konnten den Demonstrator erfolgreich mit einer UV-LED- und einer Rotlicht-LED-Lichtquelle ergänzen. Was uns weitere Optionen eröffnete, um Zellstrukturen mit DAPI und APC zu markieren. Zum Projektende war es uns möglich, Zellen mit 4 Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig zu markieren und dann einzeln zu messen.
3. Wir konnten das Design der Zellkammer überarbeiten und auf das RCMIA-System abstimmen. Die neue Kammerform sorgt für eine gute Überströmung der Zellen mit Pufferlösung, während die gleichzeitig auftretende Scherwirkung die Zellen nicht vom Untergrund reißt. Die Umstellung von Kunstoffen auf Glas als Trägermaterial, führte zu einer Reduktion von Autofluoreszenz und es traten keine Verformungen mehr auf, die zuvor für Probleme bei den Bildaufnahmen gesorgt hatten.
4. Wir konnten erfolgreich Methoden der Oberflächenbehandlung entwickeln, die abgestimmt auf die sehr unterschiedlichen Bedürfnisse von Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit, zu einer

ausreichend robusten Zellanheftung führen. Von der Probenvorbereitung bis zur Zellfixierung wurden alle Arbeitsschritte individuell auf das jeweilige Probenmaterial und die spätere Analyse der Zellen ausgerichtet.

5. Es ist gelungen, Zellen für eine spätere Analyse in der Kammer zu konservieren. Bei einer kurzzeitigen Lagerung fertiger Präparate bei 4°C empfiehlt sich die Zugabe eines Biozids. Sollen Präparate längere Zeit eingelagert werden, können DMSO-haltige Puffer verwendet werden, die eine Lagerung der Zellen bei -20°C und -80°C zulassen. In beiden Fällen konnten die Präparate anschließend dem RCMIA-System zugeführt und einer Analyse unterzogen werden.
6. Das Erstellen einer Software, welche die eigentliche Auswertung von Blut- oder Liquorproben erlaubt, machte einen wesentlichen Anteil des gesamten Projektes aus. Im Ergebnis ist ein multifunktionales Programm entstanden. Die Python-Anwendung ist in der Lage Zellen zu erkennen und morphologische sowie Fluoreszenzparameter abzuleiten. Die erhaltenen quantitativen Parameter könne über das Programm in Form von Excel-Tabellen oder einer grafischen Darstellung ausgegeben werden. Sie ermöglicht das Übereinanderlegen mehrerer Aufnahmen und die Bearbeitung der einzelnen Ebenen zur Erstellung qualitativ hochwertiger Bildstapel. Es wurde ein mathematisches Modell zur Unterscheidung von intrazellulären und Oberflächen-Signalen integriert, welches als Grundlage für einen Machine-Learning-Algorithmus dient. Diese Funktion soll es erlauben Epitope, wie beispielsweise ß-Amyloid-Signaturen anhand ihrer subzellulären Verteilung zu differenzieren. Weitere Funktionen bilden ein digitaler Zoom, die Möglichkeit zur Kompensation von Fluoreszenz-Kanälen und ein Tool zum Ausschluss unerwünschter Artefakte. Zusätzlich wurde ein neuer Arbeitsmodus integriert, wodurch große Datenmengen effizienter verarbeitet werden konnten.

Referenzen:

[1] Watamura N, Kakiya N, Fujioka R, Kamano N, Takahashi M, Nilsson P, Saito T, Iwata N, Fujisawa S, Saido TC. The dopaminergic system promotes neprilysin-mediated degradation of amyloid-β in the brain. Sci Signal. 2024 Aug 6;17(848): eadk1822. DOI: 10.1126/scisignal.adk1822. Epub 2024 Aug 6. PMID: 39106321.

[2] Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Farías GA, Fuentes P, Navarrete LP. Biomarkers for Alzheimer's Disease. Curr Alzheimer Res. 2019;16(6):518-528. PMID: 31099321

[3] Grimm M, Schmitt S, Teriete P, Biegner T, Stenzl A, Hennenlotter J, Muhs HJ, Munz A, Nadtotschi T, König K, Sänger J, Feyen O, Hofmann H, Reinert S, Coy JF. A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells. BMC Cancer. 2013 Dec 4;13:569

# II. Eingehende Darstellung

## 1. Detaillierte Darstellung der Projektergebnisse mit Gegenüberstellung zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung

Innerhalb des Verbundvorhabens NADIM war die ImmunoTools GmbH für diverse Aufgaben in den Arbeitspaketen 1, 2, 3 und 5 verantwortlich. Eine Hauptaufgabe war die Entwicklung einer Analysesoftware, welche in der Lage ist, eine halbautomatische Auswertung der Bilddaten aus der z.T. großflächigen mikroskopischen Abtastung fluoreszenzgefärbter Zellproben zu ermöglichen. Außerdem sollten Antikörper, die von den Partnern in Jena und Erlangen zur Verfügung gestellt wurden, für weitere Testungen mit Fluorochromen versehen werden. Für die Analyse von Zellen am RCMIA-System mussten Protokolle zur Zellpräparation erstellt und die passende Oberflächenbehandlung für die zelltragende Glasschicht entwickelt werden. Dabei sollten technische Anforderungen der Fluidik und des Mikroskops berücksichtigt und die Messung möglichst anwenderfreundlich gestaltet werden. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den Projektergebnissen der jeweiligen Arbeitspakete und vergleicht sie mit den ursprünglichen Projektzielen.

<u>AP1-IMT01: Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern</u>

Die Aufgabenstellung der ImmunoTools in AP1 bestand in der Fluorochrom-Kopplung von Antikörpern gegen diagnostisch relevante Targets, die beim Verbundpartner INVIGATE GmbH entstanden sind. Dabei wurde hauptsächlich mit vier verschiedenen Farbstoffen gearbeitet. Begonnen wurde mit Fluorescein, einem Farbstoff, der allgemein breite Anwendung findet. Beim Einsatz am vorliegenden Versuchsaufbau des RCMIA-Instruments stellte sich heraus, dass aufgrund der geringen Fotostabilität des Farbstoffs Fluorescein-markierte Antikörper für die bildgebende Erfassung der adressierten Epitope weniger geeignet sind. Derartige Konjugate konnten aber weiterhin für die Durchflusszytometrie eingesetzt werden, womit diese z. T. dem Verbundpartner in Erlangen zur Verfügung gestellt wurden. Der Farbstoff Atto488 besitzt das gleiche Fluoreszenzspektrum wie Fluorescein, ist dabei aber ausgesprochen fotostabil und wurde als mögliche Alternative für die Mikroskopie getestet. Die Kopplung von Antikörpern mit diesem Farbstoff war nach geringen Protokollanpassungen stabil durchführbar. Im Demonstrator zeigte Atto488 eine hervorragende Fotostabilität und ermöglichte sehr sensitive Aufnahmen. Gleichzeitig war es jedoch bei der Verwendung dieser Konjugate kaum möglich,

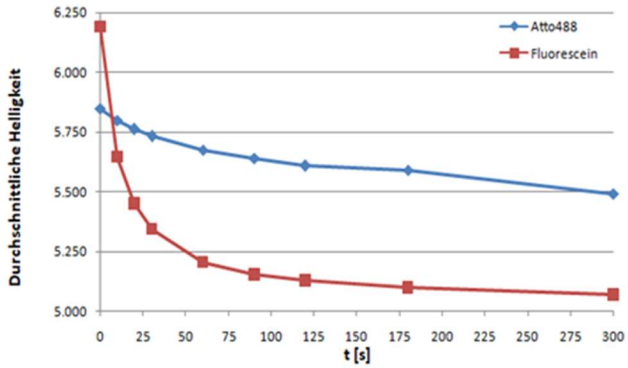



*Abb. 1) Bleichkinetika für Immunfärbe-Ereignisse mit Atto488- bzw. Fluorescein-markierten Antikörpern am RCMIA-Versuchsaufbau*

im Kontext der sequenziellen Immunfärbungen ein Photobleaching der Fluoreszenzsignale in akzeptablen Zeitintervallen durchzuführen. Der Einsatz Atto488-markierter Antikörpersonden hatte dennoch in denjenigen Fällen seine Berechtigung, in denen es um den Nachweis sehr gering ausgeprägter molekularer Marker ging.

Das optische Setting am RCMIA-Aufbau mit der blauen LED ermöglichte außerdem die Anregung des Farbstoffs Phycoerythrin (PE). In der experimentellen Evaluierung am vorliegenden instrumentellen Aufbau stellte sich heraus, dass PE-Konjugate deutlich fotostabiler sind, sich aber im Anschluss an die Bildakquise innerhalb weniger Sekunden vollständig Ausbleichen lassen. Die erstellten PE-Konjugate waren damit optimal für die beabsichtigten seriellen Immunfärbungen geeignet. Sequenzen von bis zu 12 Färbezyklen wurden schließlich mit unterschiedlichen AK-PE Konjugaten erfolgreich durchgeführt. Mit weitreichenden Vorkenntnissen bezüglich der deutlich aufwendigeren Erzeugung qualitativ hochwertiger PE-Konjugate, konnte die Markierung aller benötigten Antikörper erfolgreich umgesetzt werden.

Im Verlauf des Projektes wurde der Demonstrator um eine rote LED und später eine UV-Lichtquelle ergänzt. Damit ergaben sich weitere Optionen zum Einsatz anderer Farbstoffe. Für die Kopplung von UV-Fluoreszenzfarbstoffen bestand noch keine Expertise. Erste Versuche in diesem Gebiet fanden mit dem Farbstoff Aminomethylcoumarin-Acetat (AMCA) statt. Trotz intensiver Anpassung der Kopplungsparameter konnte keine zufriedenstellenden Färbeergebnisse mit AMCA-markierten Antikörpern erreicht werden. Der UV-Kanal wurde stattdessen hauptsächlich für Zellkernfärbungen mit dem Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) genutzt, was eine sinnvolle Ergänzung für die Erfassung von subzellulären Strukturen in mikroskopischen Untersuchungen darstellt. Die rote LED wurde erfolgreich für die Detektion von Allophycocyanin (APC)-markierten Antikörpern genutzt. Derartig konjugierte Antikörper lieferten hervorragende Signalstärken. Mit etwas längeren Bleichintervallen war gleichzeitig ein vollständiges Entfernen der Immunfärbesignale gegeben. Im Ergebnis ermöglicht die Ausstattung des Demonstrators durch die Kombination von 3 Lichtquellen und 4 Fluoreszenzfarbstoffen, die Markierung von bis zu vier Zellsignaturen in einem Färbezyklus.

| Antikörper (Anzahl Klone) | Farbstoff | Antikörper (Anzahl Klone) | Farbstoff |
|---|---|---|---|
| *Oberflächenmarker zur Zelldifferenzierung* | | *Tau-Marker* | |
| | | | |
| **Anti hCD163 (11)** | **Fluorescein** | **Anti phosphoTau181 Klon21** | **Atto488** |
| **Anti hCD14 (2)** | **Atto488** | **Anti phosphoTau181 Klon26** | **Atto488** |
| **Anti hCD14 (3)** | **PE** | **Anti phosphoTau181 (6)** | **Atto488** |
| **Anti hCD16 (2)** | **Atto488** | **Anti phosphoTau202/205 (2)** | **Atto488** |
| **Anti hCD16 Klon 3C9** | **PE** | **Anti phosphoTau181 Klon21** | **AMCA** |
| **Anti hCD14 Klon E11** | **AMCA** | **Anti phosphoTau181 Klon26** | **AMCA** |
| **Anti hCD16 Klon 3C9** | **AMCA** | **Anti human Tauprotein (5)** | **Fluorescein** |
| **Anti hCD16 Klon 3C9** | **APC** | | |
| | | | |
| *Amyloid-Marker* | | *Synaptische Marker* | |
| | | | |
| **Anti AβPE (Glu3) Klon Aβ-PE_b1** | **Fluorescein** | **Anti alpha-Synuclein Klon Nu2_a2** | **Fluorescein** |
| **Anti AβFragment35-40 Klon Aβ-01_b1** | **Fluorescein** | **Anti-Synaptophysin (LVD) (15)** | **Fluorescein** |
| **Anti Aß-Nterm.Fragment (8)** | **Fluorescein** | | **Fluorescein** |

*Tab. 1) Übersicht der Antikörperkopplungen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.*

Sämtliche konjugierte Antikörper gingen zunächst an unseren Verbundpartner in Jena zur funktionellen Charakterisierung, bevor die Antikörper im Rahmen des Projektes verwendet wurden. Die Oberflächenmarker wurden hauptsächlich für Modellversuche zur Identifizierung seltener Zellen und die Etablierung der Zellanreicherung eingesetzt. Für die Weiterentwicklung und Qualitätskontrolle des Demonstrators wurden einige vorgefärbte Dauerpräparate angefertigt und unseren Partnern in Münster zur Verfügung gestellt. Die Tau-Marker wurden sowohl in durchflusszytometrischen und bildgebenden Evaluierungsläufen des Versuchsaufbaus in Jena, als auch für Analysen von Patientenproben in der Durchflusszytometrie und am Demonstrator in Erlangen verwendet, wobei ein besonderes Augenmerkt auf den beiden phosphoTau188 Klonen 21 und 26 lag. Das Uniklinikum Erlangen setzte darüber hinaus die Amyloid- und synaptischen Marker bei der durchfluss-zytometrischen Analyse von Patientenmaterial ein.
Die mit diesem Teilprojekt verbundenen Ziele wurden damit weitestgehend erreicht und die meisten der gekoppelten Antikörper konnten erfolgreich verwendet werden.

AP2-IMT01 RCMIA Instrument – Konzeption, Realisierung, Charakterisierung, Optimierung
Demonstrator Step 1: mit neuartiger Analyse- und Färbekammer

In diesem Arbeitspaket wurden Zellkammer und Demonstrator miteinander harmonisiert. Es sollte aus der konkreten Anwendungssituation heraus noch bestehende Einschränkungen identifiziert und Lösungen entwickelt werden. Die initial getesteten Kammern von QA bestanden aus PMMA (Polymethylmethacrylat) mit einer Kammerhöhe von 50 µm. Die konstruktive Ausführung ließ ein einfaches Aufbringen von Zellpräparaten in die Kammern zu. Mit den Kammern ließen sich in Verbindung mit der vorliegenden mikrofluidischen Versorgungseinheit ohne Weiteres Reagenzien und Pufferlösungen beschicken und im Anschluss daran ein sofortiges optisches Abtasten durchführen. Als Nachteil der vorliegenden Kammerausführung stellte sich eine starke Verformungsanfälligkeit infolge des Kontakts mit wässrigen Pufferlösungen bei den vorgesehenen mehrstündigen Einsätzen (Sequenzielle Immunfärbung) heraus. Daraus resultierte eine beträchtliche Defokussierung der Objektebene und häufiger auftretende Undichtigkeiten an der Kontaktfläche zum Fluidikanschluss. Im Ergebnis umfangreicher Anpassungen bezüglich Materials und konstruktiver Ausführung wurden die Färbekammern schließlich komplett aus Glas gefertigt. Des Weiteren wurde durch die angepasste Kammergeometrie nach experimenteller Abstimmung mit dem optimierten Fluidikpuffer ein deutlich höherer Querschnitt der überströmenden Flüssigkeit hergestellt, wodurch die auf die Zellproben einwirkende mechanische Beanspruchung und die Anfälligkeit gegenüber Lufteinschlüssen innerhalb der Kammer entscheidend reduziert werden konnten.

*Abb. 2) Finale Ausführung der Färbekammer*

Eine weitere Aufgabe bestand in der Fixierung der Zellen auf dem Trägermaterial, um eine ausreichende Stabilität des Zellpräparats im Hinblick auf die beabsichtigten Färbesequenzen und den damit verbundenen zahlreichen Abfolgen von Luft- und Flüssigphasen zu gewährleisten.
Hierzu wurde das Aufbringen mehrerer zelladhäsionsvermittelnder Biomoleküle (Poly-L-Lysin, Concanavalin-A, anti-CD Antikörper etc.) experimentell erprobt. In der finalen Abstimmung wurden die

Zellen aus EDTA Vollblut auf Antikörper beschichteten Glasträgern aufgebracht und konnten in dieser Form verlässlich den Färbesequenzen in den Kammern unterzogen werden.
Im Gegensatz zu den sehr zellreichen Blutproben, musste für die Präparation von Liquor ein anderer Weg verfolgt werden. Hierbei bestand die Herausforderung im Aufbringen möglichst aller Zellen einer Liquorprobe (ca. 5 ml) auf einem möglichst kleinen Areal. In den Versuchsreihen haben sich silylierte Glasträger als geeignet herausgestellt, auf denen die Liquorzellen auf einem kleineren 3mm Spot für die Immunfärbungen in die Kammern eingebracht werden konnten vergl. Ausführungen zum AP3-IMT04.

AP2-IMT02: RCMIA Software - Konzeption und Realisierung Steuer- und Analysesoftware

Ein weiterer wesentlicher Baustein des Vorhabens waren die Softwaremodule zur Akquise und Auswertung der umfangreichen mikroskopischen Aufnahmen. Dabei übernahm unser Projektpartner Quantum Analysis die Entwicklung der Software zur Ansteuerung der Mikroskop-Funktionalitäten (motorisierter Mikroskoptisch, LEDs, Fluidik) sowie der Aufnahme und Zusammensetzung der Mikroskop Bilder. Unserem Team kam die Entwicklung geeigneter Softwarelösungen für die weitere Bearbeitung und Analyse der entstandenen Bilddaten (Einzelbilder oder Bildstapel).

Im Vorfeld erfolgten Recherchen an kommerziellen und frei verfügbaren Software-Modulen. Dabei konnte keine der verfügbaren Anwendungen alle benötigten Funktionen bieten oder war flexibel und erweiterbar genug. Auch das OpenSource Bildverarbeitungsprogramm ImageJ, das oft bei der Analyse wissenschaftlicher oder medizinischer Bilder Anwendung findet, erwies sich als nicht zufriedenstellend bei der Zellerkennung. Daher fiel die Entscheidung zur Erstellung spezifisch zugeschnittener Softwarekomponenten für die erforderlichen Aufgaben innerhalb des NADIM-Vorhabens.

Auf Grundlage der Python-Umgebung wurde zu Beginn eine Basisanwendung erstellt, die es ermöglichte, Bilder als RGB-Matrizen auszulesen und zu bearbeiten. Mit der Integration der Open-Source Bildbearbeitungsbibliothek „PIL“ (Python Imaging Library) konnte die Software erheblich beschleunigt und um eine grafische Benutzeroberfläche erweitert werden. Die in der Software angezeigten Bilder der Benutzeroberfläche nutzen niedrig aufgelöste Vorschaubilder. Bei Zoom-Vorgängen werden schrittweise höher aufgelöste Vorschaubilder verwendet, bis die originale Auflösung erreicht ist. Dadurch kann eine ressourcenschonende Anzeige bei hohem Detailgrad gewährleistet werden. So wurde ein Editor zur Bearbeitung und Präprozessierung der Mikroskop Aufnahmen erstellt und zunehmend um neue Funktionen ergänzt, um die im Laufe des Projektes aufgetretenen neuen Anforderungen und Herausforderungen zeitnah und bedarfsgerecht bewältigen zu können.

Der Editor bietet u.a. folgende Basisfunktionen: 1.) digitale Färbung von Bildern; 2.) grundlegende Bildbearbeitungsfunktionen: Verstärkung von Kontrast, Helligkeit, Bildschärfe, Farbsättigung; 3.) automatischer Helligkeitsausgleich; 4.) Filterung von Bildern anhand von Intensitätsschwellwerten und Generierung von Bildmasken; 5.) Unschärfefilter (Gauß, Median) 6.) Erstellung von Overlays aus Bildstapeln

Ein weiteres Modul bestand in der nachträglichen Kompensation der Helligkeitswerte. In der Anwendungsumgebung wurde bei der parallelen Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe ein geringer spektraler Crosstalk beobachtet, der sich schließlich mithilfe des gefundenen Kompensationsalgorythmus vollständig aufheben ließ (Abb. 3).

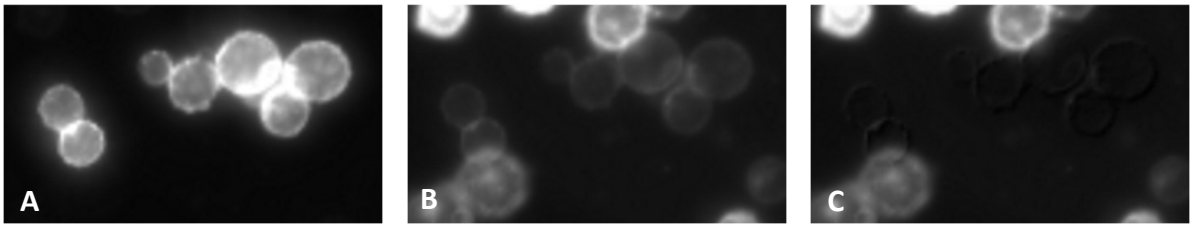



*Abb. 3): Nachträgliche Kompensation von Fluoreszenzbildern. A: FL1-Signal, B: FL2-Signal ohne Kompensation, B: FL2-Signal mit 19% Kompensation*

Für das exakte Überlagern mehrerer Einzelbilder zeigte sich die Notwendigkeit der X/Y-Korrektur von geringfügigen Verschiebungen des Aufnahmebereichs am RCMIA-Aufbau, die insbesondere durch die beabsichtigen mehrstündigen Sequenzen aus mikrofluidischen Färbungen und optischer Abtastung auftreten können. Es wurde in diesem Zusammenhang eine Funktion erstellt, die eine manuelle Korrektur einzelner Bilder und darüber hinaus eine automatische Anpassung des gesamten Bildstapels ermöglicht.
Die mit den geschaffenen Möglichkeiten erstellten korrigierten Bildstapel sollten dann direkt an eine integrierte Analyse-Software übergeben werden.
Mit Hilfe der Bildanalyse sollten aus den erhaltenen mikroskopischen Aufnahmen quantitative Parameter für jede einzelne Zelle gewonnen werden. Hierfür mussten zunächst geeignete Softwarekonzepte für die Zellerkennung erarbeitet werden. Dies ist durch eine sukzessive Erprobung verschiedener Aufnahmemodi und darauf ausgerichteter Erkennungsalgorithmen gelungen. Eine robuste Erfassung auch eng aneinander liegender Zellkonturen war anhand von defokussierten Hellfeldaufnahmen mithilfe eines individuell eingestellten Helligkeitsschwellwertes möglich. Der Schwellwert kann entweder manuell gewählt und verändert werden oder automatisch unter Verwendung der Otsu-Methode aus dem Histogramm des Bildes berechnet werden. Es entsteht somit ein Binärbild mit weißen Zell-Ereignissen und schwarzem Hintergrund, das als Maske für die Zuordnung der individuellen Zellareale dient (Abb. 4).

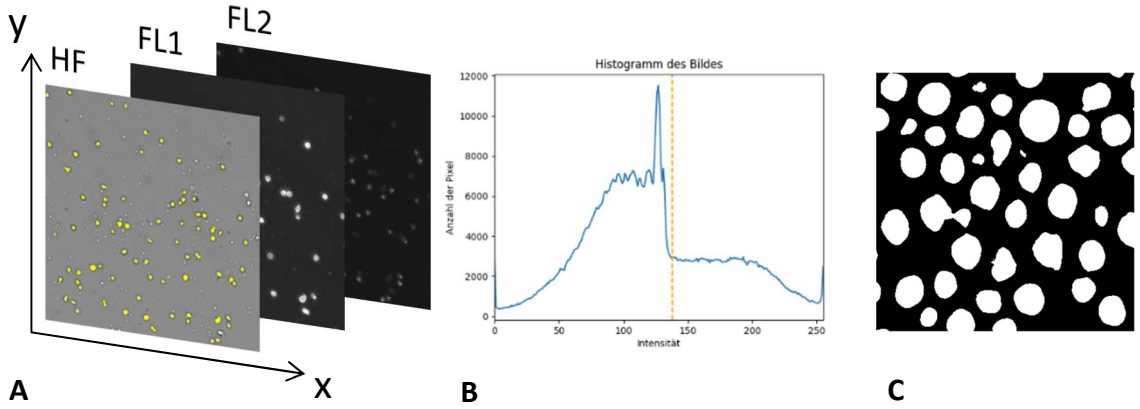



*Abb. 4): Ablauf der Zellerkennung. A: XY-ausgerichteter Bildstapel, B: Histogramm mit Pixelintensitäten zur automatischen Berechnung des Schwellwertes, C: Binäre Bildmaske für gewählten Schwellwert.*

Aus dem Binärbild werden die einzelnen Zellkonturen abgeleitet und diesen ein individueller Index zugewiesen. Mithilfe der Zellkonturen lassen sich eine Vielzahl von morphologischen Parametern (Größe, Kompaktheit, etc.) für jedes Event bestimmen und grafisch darstellen. Mit ebenfalls implementierten Nutzerinteraktionswerkzeugen lassen sich bereits mithilfe der morphologischen Parameter kleinere Partikel oder größere Zellaggregate sowie anderweitige Verunreinigungen des

Zellpräparates von der Analyse ausschließen. Standardmäßig wurden erfasste Ereignisse zwischen 5 und 15 µm in die weitere Analyse einbezogen.
In einem weiteren Schritt werden mit Hilfe der erarbeiteten Analysesoftware die aus dem Bildstapel zuordenbaren Fluoreszenzsignale der einzelnen Immunfärbungen innerhalb dieser Konturen für gleichzeitig bis zu sechs verschiedene Fluoreszenzkanäle des Stapels berechnet. Die erarbeitete Softwareoberfläche ermöglicht es, sowohl die morphologischen Parameter als auch die einzelnen Fluoreszenzparameter der Zellereignisse in XY-Streudiagrammen darzustellen. Die Plots sind interaktiv angelegt, sodass abgeleitet von der Nutzererfahrung aus der Durchflusszytometrie, freihändig oder mittels einer Polygonfunktion Zellereignisse ausgewählt werden können, die aufgrund bestimmter morphologischer Eigenschaften oder auf Grundlage der ermittelten Fluoreszenzsignale von Interesse für die Auswertung des Anwenders sind. Neben dem interaktiven Streudiagramm wurde noch ein weiteres, komplexeres Plot-Werkzeug zur Auswahl der interessierenden Zellereignisse erstellt, welches mehrere aufeinanderfolgende oder kombinierte Auswahlschritte ermöglicht. (siehe Ausführungen zum Arbeitspaket AP2-IMT03.) Die so ausgewählten Zellen können in allen Bildern des Stapels farbig hervorgehoben oder umrandet und für den Nutzer zur Plausibilitätskontrolle verwendet werden. Der Anwender kann die erfassten Daten aller Zell-Ereignisse als Excel-Tabelle sowie die ausgeschnittenen Einzelbilder der Events speichern oder den Datenstapel weiter an die Auswertesoftware übergeben.

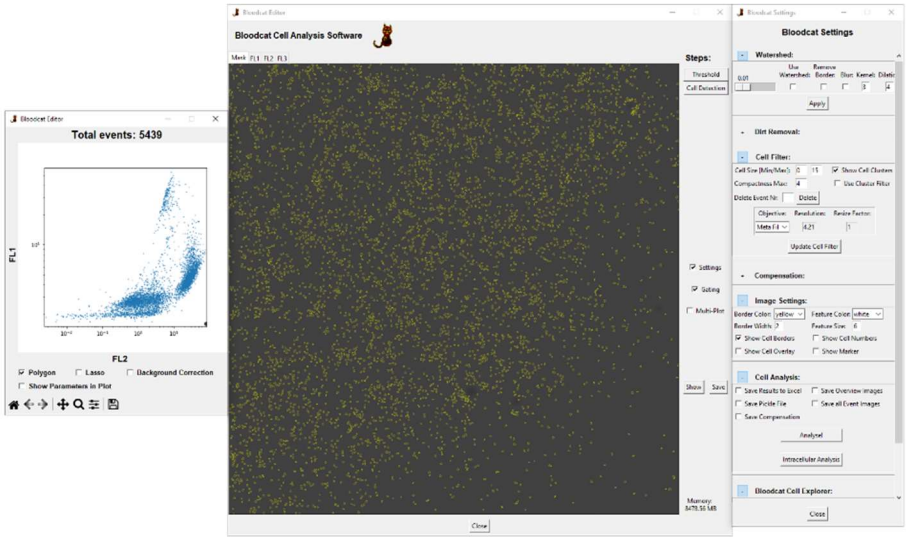



*Abb. 5): Beispielhafte Darstellung der Analyse-Software mit interaktivem Plot und Einstellungsfenster.*

Um die prinzipielle Funktionstüchtigkeit der geschaffenen Softwarelösungen zur Datenerfassung und Zellselektion aus den Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu bestätigen, wurde ein Kontrollexperiment mit einen definierten Gemisch CD14 bzw. CD16 exprimierender Ba/F3-Zellen durchgeführt. Entsprechend transfizierte Ba/F3-Zellen mit $CD14^+$, $CD16^+$ oder $CD14^+/CD16^+$ Expressionsmuster wurden mit zwei unterschiedlich markierten Antikörpern angefärbt, am RCMIA-Aufbau optisch eingelesen und mit der entwickelten Software analysiert. Dabei ließen sich vergleichbare Mengenanteile der Ba/F3-Subpopulationen aus der RCMIA-Messung feststellen wie in einer parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchung festgestellt worden sind (Abb. 6, Tab.3)

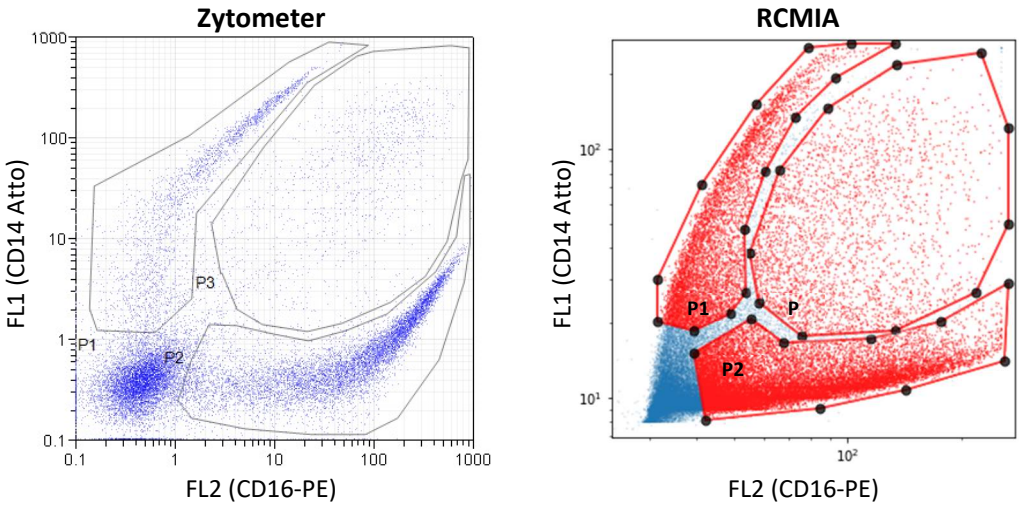



*Abb. 6): Vergleich Ba/F3-Modellzellen im Durchflusszytometer und mit dem RCMIA-Gerät (Mikroskopieaufnahme).*

| Gate | Zellpopulation | Zytometer | | RCMIA | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Events | Prozent | Events | Prozent |
| P1 | $CD14^+$, $CD16^-$ | 2.600 | 11,8% | 5.561 | 11,5% |
| P2 | $CD16^+$, $CD14^-$ | 8.126 | 40,5% | 16.869 | 34,8% |
| P3 | $CD14^+$, $CD16^+$ | 1.203 | 6,0% | 2.738 | 5,7% |
| Gesamt | | 20.000 | | 48.447 | |

*Tab. 2): Vergleich Ba/F3 Modellzellen im Durchflusszytometer und mit dem RCMIA-Gerät (Mikroskopieaufnahme).*

Für die beabsichtigte Anwendung sollte die Software insbesondere in der Lage sein, aus einer relativ großen Gesamtzahl seltene Zellen (erwarteter Mengenanteil im Blut 0,5 – 1%) anhand der Signale aus der Immunfärbung der zwei Oberflächenmarker CD14 und CD16 zu identifizieren. Zur Demonstration wurde eine Blutprobe nach Erythrozytenlyse und entsprechender Immunfärbung auf ein geeignetes Areal eines Glasträger aufgebracht und im RCMIA-Aufbau optisch eingelesen. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Software in der Lage ist, die damit verbundenen Datenmengen zu bearbeiten und die Identifizierung der seltenen Zellen zu ermöglichen. Wie in der Abb.  dargestellt, konnten über 130.000 Zellen analysiert und hiervon 2.125 als $CD14^+$/$CD16^+$ Zielzellen (ca. 1,6%) identifiziert werden, was bezüglich des Vorkommens der Zellen im Bereich unserer Erwartungen lag.

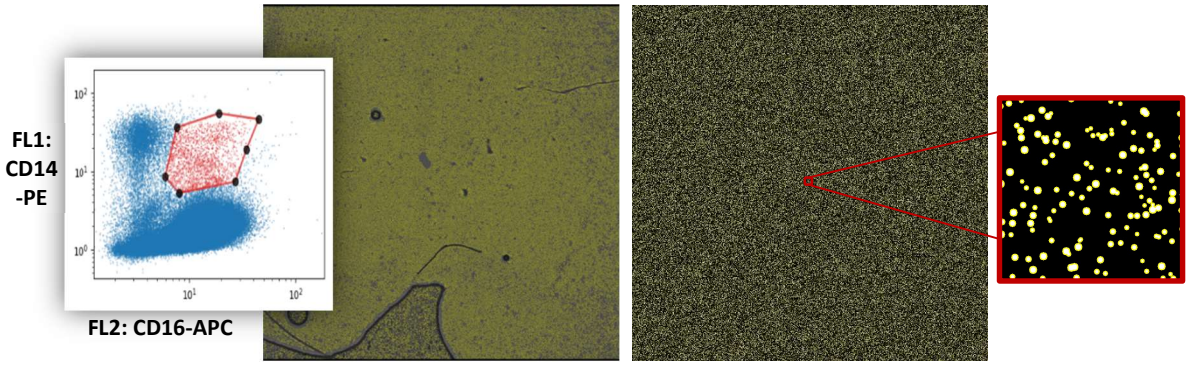



*Abb. 7): Analyse großer Zellmengen, dargestellt mit gelben Konturen. Links: 130.562 reale Zellen, davon ca. 2.125 doppelt-positive Zielzellen. Rechts: Modell-Maske mit 394.258 Events.*

Bei der Verwendung vollaufgelöster Bilddaten fallen in diesem anwendungsnahen Evaluierungsexperiment erhebliche Datenmengen an. Mit der später geschaffenen Möglichkeit der spezifischen Anreicherung der Zielzellen und der in Bildakquise implementierten Option zum

Herunterskalieren der digitalen Auflösung (Quantum Analysis) lassen sich das Datenaufkommen und die damit verbundenen Analysezeiten für derartige großflächige Aufnahmen wesentlich reduzieren.

AP2-IMT03: Konzeption und Realisierung einer Auswertesoftware

**RCMIA: Bildgebende Mikroskopie**

Für das Arbeitspaket AP2-IMT03 wurde eine Auswertesoftware mit grafischer Benutzeroberfläche entwickelt, die zu jedem Zellereignis detaillierte Informationen über die Intensität und Verteilung der Fluoreszenzsignale liefert, die erhaltenen Daten in geeigneter Form darstellt und auf Grundlage dessen einen Vergleich zwischen verschiedenen Patientenproben ermöglicht.

Da die Signale der Alzheimer-Fluoreszenzmarker primär intrazellulär auftreten, war es nötig, phagozytierte Marker im Phagolysosom klar zuzuordnen und von unspezifischen Oberflächensignalen abzugrenzen. Als Modell zur Erarbeitung geeigneter Softwarewerkzeuge dienten zunächst Präparate mit angefärbtem CD16 als Oberflächenmarker und Lamp1 als intrazellulärer Marker für Lysosomen und Phagolysosomen.

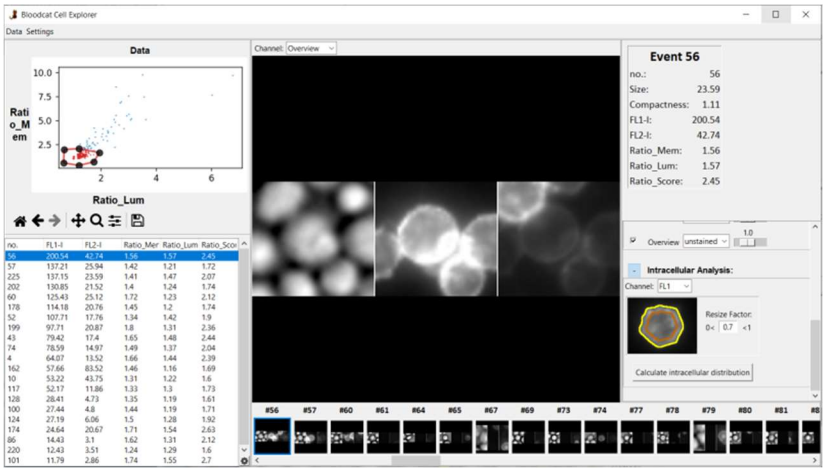



*Abb. 8): Arbeitsversion der grafischen Benutzeroberfläche der Auswertesoftware.*

Es wurden zunächst verschiedene Funktionen und Algorithmen zur Bestimmung von Flächen- und Intensitätsverhältnissen sowie zur Verteilung der Marker innerhalb der Zellen erprobt und in die Software integriert. Daran anknüpfend wurde ein mathematisches Modell zur Unterscheidung von intrazellulären und Oberflächen-Signalen entwickelt. Dabei werden die individuellen Fluoreszenzbilder der einzelnen Zellen in einen inneren und einen äußeren Bereich unterteilt und für die Bereiche Parameter wie zum Beispiel die Segregation der Fluoreszenzsignale (über Perzentilenanalyse) oder die Verhältnisse der über die Flächen gemittelten Fluoreszenzintensitäten

Die mikroskopischen Aufnahmen der Modellpräparate dienten als Grundlage für einen Machine-Learning-Algorithmus. Dabei wurden 776 manuell anhand der Fluoreszenzverteilung kategorisierte Zellen in das Training eingespeist. Im Ergebnis konnte ein Algorithmus für die Zuordnung der subzellulären Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale (membranal bzw. Phagolysosom-assoziiert) eine Übereinstimmung von 95% zur manuellen Klassifikation erreichen.

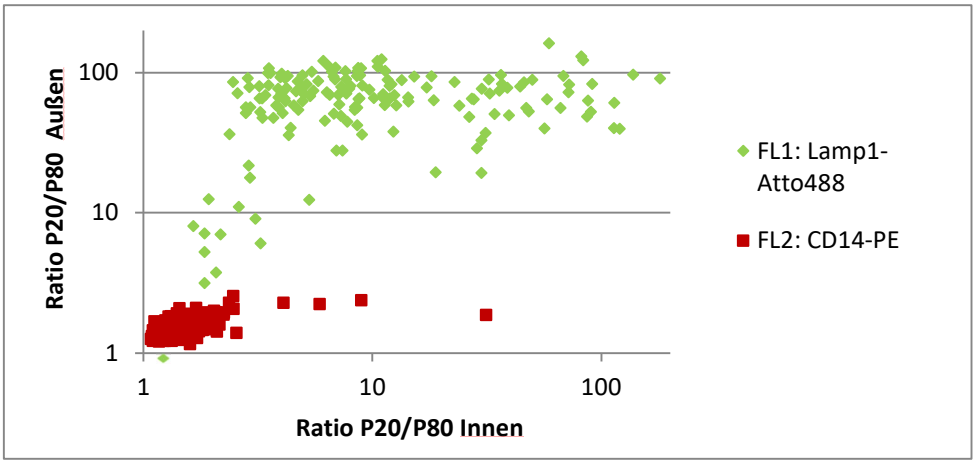



*Abb. 9): Algorithmus zur Unterscheidung von Fluoreszenzsignalen. Hier: Lamp1-Atto488 (intrazellulärer Lysosomenmarker) und CD14-PE (Oberflächenmarker).*

Durch Verzögerungen im Projektablauf konnten mit dem RCMIA-Demonstrator erst später bildgebende Daten erzeugt und ausgewertet werden. Zudem war nur eine kleinere Zahl an Patientenproben qualitativ verwertbar für die Auswertung, sodass bisher nur eine stichprobenartige Überprüfung und Auswertung vereinzelter Proben stattfand. Dabei war die Erfassung einzelner phagozytierter Signaturen sowie deren intrazelluläre Verteilung bereits möglich, jedoch sind die Arbeiten noch nicht weit genug vorangeschritten, um ein Scoring aus mehreren demenzassoziierten Markern und damit eine eindeutige Zuordnung der Krankheit vorzunehmen. Versuche dazu dauern weiter an.

**Durchflusszytometrie**

Neben der Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Software-Tool zur Auswertung und Darstellung der Zell-Signale von sowohl Mikroskopie- als auch Zytometriedaten entwickelt. Dieses ermöglicht die Visualisierung diverser Parameter in bis zu 25 Streudiagrammen, in denen vom Nutzer Zell-Ereignisse in bestimmten Regionen („Gates“) ausgewählt, kombiniert und verglichen werden können, um spezifische Zelltypen und Zustände zu untersuchen.
Das Modul konnte zur Analyse der am UKE gemessenen klinischen Proben erfolgreich genutzt werden, um die Partner bei der Auswertung der Alzheimermarker in Blut und Liquor zu unterstützen. Zudem findet es auch Anwendung in der Analyse und Auswertesoftware.

Aus den Messdaten der Durchflusszytometrie konnten mit Hilfe des erstellen Software-Moduls in Kooperation mit den Partnern von INVIGATE verschiedene mathematische Modelle zur quantitativen Erfassung von Fluoreszenzsignalen aus der intrazellulären Immunfärbung von Makrophagen konzipiert und sukzessive verbessert werden.

Das zuletzt angewendete sehr vielversprechende Modell führt eine Analyse der Abstandsverteilung der einzelnen Datenpunkte in dem Streumuster einer Immunfärbung der Makrophagen durch und leitet hiervon Parameter ab, die eine Unterscheidung spezifischer Fluoreszenzsignale der Immunfärbung von der allgemeinen Verteilung der Datenpunkte (Hintergrundsignale) ermöglicht. Mit Hilfe dieser Auswertung war es möglich, aus den Ergebnissen einer Immunfärbung gegen den Marker phospho-Tau181 in Blutproben einzelne Scorewerte abzuleiten, welche mit den phosphoTau181-Werten aus der routinemäßigen Laboranalytik in der untersuchen Patientenkohorte korrelierten (siehe Abb. 10).

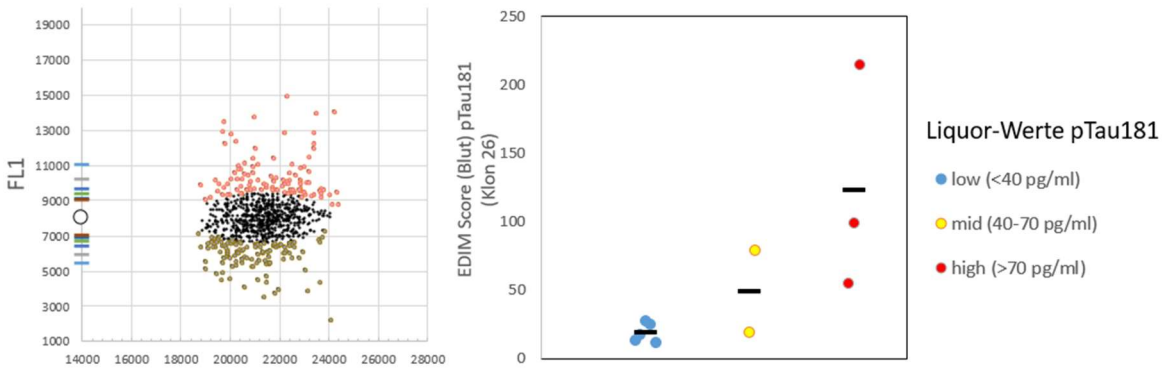


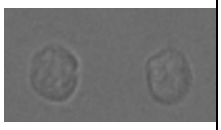
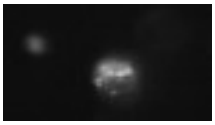
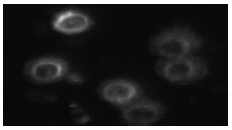

*Abb. 10): EDIM-Score. Links: Exemplarische Bestimmung eines Scores mit Perzentilenmodell. Rechts: Korrelation bestimmter EDIM-Scores mit Liquorwerten.*

Obwohl bereits eine Vielzahl an Tools und Algorithmen zur Analyse und Auswertung der Patientendaten erstellt wurden und kontinuierlich weiterentwickelt werden, ist die endgültige Bestimmung eines Patientenscores noch nicht abgeschlossen. Die Softwaretools stehen bereit und können auf weitere reale RCMIA-Proben angewendet werden, sobald eine ausreichende Menge auswertbarer Patientendaten verfügbar ist. Dazu werden weiterhin Messungen durchgeführt. Die im Rahmen des Projektes geschaffenen Softwarefunktionalitäten bieten bereits eine vielversprechende Grundlage für eine zukünftige Zuordnung der Alzheimer-Krankheit zu den Patientenproben.

<u>AP3-IMT01 Etablierung der Konservierung von Blutzellen in einer Zellkammer</u>

Kern der Arbeiten an diesem Arbeitspaket war die Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Präparation und Konservierung von Blutzellen innerhalb der RCMIA-kompatiblen Färbekammer. Dabei wurden grundlegende Eigenschaften, wie die Qualität der Zellanhaftung, morphologische Veränderungen der Zellen, die Anfärbbarkeit von Zellstrukturen und das Einsetzen von Autofluoreszenz nach einer Lagerungsperiode untersucht. Einige der getesteten Beschichtungen erwiesen sich aufgrund der beobachteten Autofluoreszenz als ungeeignet. Ebenso stellten sich viele der getesteten Puffer zur Zellfixierung als ungeeignet heraus, da sie sich entweder negativ auf die Integrität der Zellstrukturen auswirkten oder einige der verwendeten Antikörper das Färbeergebnis beeinträchtigten.
Unsere experimentelle Evaluierung mit der Mikrofluidik des RCMIA-Aufbaus hat ergeben, dass für die Präparation von Blutzellen eine Fixierung mit einer 4%igen Formaldehydlösung geeignet ist, um die Zellen haltbar zu machen und für eine ausreichend starke Vernetzung der Zellen mit dem Untergrund zu sorgen. Da ein kleinerer Teil der Antikörper nicht für Formaldehyd-fixierte Proben geeignet ist, mussten ggf. aus unseren eigenen Kollektionen Ersatzantikörper gefunden werden. Die präparierten Zellen ließen sich in den Zellkammern unter Zusatz eines Biozids (PBS + 0,02% $NaN_3$,) über mehrere Wochen bei 4°C lagern, um sie zu einem späteren Zeitpunkt einer Untersuchung zuzuführen. Für längere Konservierungszeiträume wurden mit Zellpräparaten in den Färbekammern Lagerungs-versuche bei -20°C und -80°C mit oder ohne kryoprotektive Zusätze durchgeführt. Dabei wiesen die Kammerkomponenten selbst bei -80°C keine feststellbaren Beeinträchtigungen bezüglich der Dichtigkeit, der optischen Eigenschaften oder der Materialbeschaffenheit (Risse, Verformungen etc.) auf. Die Haltbarkeit der Zellpräparate wurde nach einwöchiger bzw. dreimonatiger Lagerung durch eine sequenzielle Immunfärbung unter Anwendung der mikrofluidischen Prozessführung am RCMIA-Aufbau überprüft. Dabei hat sich herausgestellt, dass es durch den Zusatz von DMSO möglich ist, die

Zellpräparate bei -80°C in den Färbekammern zu asservieren und nach mehreren Monaten mehrere Immunfärbungen im vorliegenden Aufbau durchzuführen (Siehe Abb. 2, Tab. 3).

| *Lagerungs-temperatur* | *Kryo-präservativ* | *Opt. Eigenschaften Zellen* | *Primäre CD16-PE Färbung* | *Primäre CD14-PE Färbung* | *Bleichen und wiederholte CD14-PE-Färbung* |
|---|---|---|---|---|---|
| -80°C | 10% DMSO | Zellstrukturen opt. gut erhalten; entspr. frischen Präparaten  | Färbung leicht diffus, aber besser als ohne Kryoprotektiva  | Entspr. Signalmuster frischer Präparate; leichter Verlust an Signalstärke  | Bleichen + wiederholte Färbung uneingeschränkt möglich, Daten entsprechen den Ergebnissen frischer Präparate |

*Tab. 3) Exemplarische Ergebnisse der Lagerungsversuche in Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen.*

Die vorliegenden Zellstrukturen blieben gut erhalten und wiederholte Färbezyklen waren mit einem geringen Verlust der Signalstärke möglich. Inwieweit dies auch auf die Färbung und Analyse zellinterner Strukturen zutrifft, bleibt noch zu untersuchen.
Aufgrund der relativ umfangreichen Anpassungen der fluidischen Kammer konnte mit den Lagerungsversuchen erst vergleichsweise spät begonnen werden. Obwohl die Lagerfähigkeit der neuesten Kammervariante nur für 3 Monate dokumentiert werden konnte, scheint eine längerfristige Lagerung durch ermutigende Vorversuche durchaus möglich zu sein. Mit der erarbeiteten Lagerfähigkeit der mikrofluidischen Färbekammern ergibt sich somit ein entscheidender Vorteil für den künftigen Einsatz. Patientenzellen aus Blut können über den recht einfach durchführbaren Fixierungsprozess für spätere Kontroll- oder Nachuntersuchungen direkt in den Kammern konserviert und mehrere Monate gelagert werden.

<u>AP3-IMT02: Nachweis von phagozytierten molekularen Demenzmarkern</u>

Die experimentellen Arbeiten in diesem Abschnitt dienten der Erarbeitung eines Konzepts, mit dem sich oberflächen-assoziierte von subzellulären Signalen unterscheiden lassen. Hierzu wurden als praxisnahes Modell an Blutleukozyten Oberflächenfärbungen mit Antikörpern gegen CD14 und CD16 sowie eine intrazelluläre Färbung mit dem Lysosom-assoziierten Protein Lamp1 durchgeführt. Die gewonnenen mikroskopischen Aufnahmen wurden in einen Machine-Learning-Algorithmus der Auswertesoftware eingespeist, mit dessen Hilfe zu einer geeigneten Parametrierung der unterschiedlichen Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale gelangt werden sollte. Dies ist, wie in Abb. 9 zu den Ausführungen des AP3-IMT02 demonstriert, sehr gut gelungen.
Erste Färbeergebnisse an verifizierten phagozytierten Demenzmarkern anhand von Patientenproben standen aufgrund beschriebener Verzögerungen erst gegen Ende der Projektlaufzeit zur Verfügung. Die experimentellen Arbeiten dauern aktuell noch an. Eine größere Datenbasis ist erforderlich, um eine Bewertung vornehmen zu können, inwieweit das an den Modellfärbungen etablierte Software-Instrument in der Lage ist, auch unter den vorliegenden Anwendungsbedingungen eine zuverlässige automatisierbare Zuordnung von Fluoreszenzsignalen phagolysosomal lokalisierter Epitope zu ermöglichen.

AP3-IMT03: Verfahren zur adhäsiven Anreicherung von Phagozyten

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, mit Hilfe geeigneter Zellanreicherungsmethoden eine günstigere Ausgangssituation zur Erfassung einer ausreichenden Anzahl phagozytotisch aktiver Zellen in den mikroskopischen Untersuchungen herzustellen. Zu diesem Zweck wurde die adhäsive Anreicherung von $CD14^+$ Zellen an mit CD14-Antikörper vorbehandelten Glasträgern erprobt.
Anfangs wurde die entsprechende Antikörperschicht über eine aufwendige Kopplungschemie auf mehrstufig chemisch vorbehandelte Glasoberflächen aufgebracht. Das Verfahren wurde schrittweise optimiert, um eine hohe Beladungsdichte und eine gute Homogenität der Antikörperkopplung über das gesamte behandelte Areal zu erreichen. Im weiteren Projektverlauf stellte sich heraus, dass die Oberfläche der verwendeten Glasträger ausreichend reaktiv war, um die Antikörper ohne Einsatz einer Kopplungschemie in einer kurzen Inkubationszeit unmittelbar vor der Zellzugabe aufzubringen.
Im Zuge der experimentellen Etablierung wurden 8mm große Kavitäten auf mikroskopischen Glasträgern mit verschiedenen anti-CD14-Antikörpern aus dem firmeneigenen Bestand vorbehandelt und anschließend eine Anreicherung von $CD14^+$ Zellen (Monozyten und Makrophagen) aus Leukozytensuspensionen durch eine Sequenz aus Inkubations- und Waschschritten verfolgt. Im Zuge der Versuche konnte ein monoklonaler anti-CD14-Antikörper identifiziert werden, der eine besonders gute Anreicherung der $CD14^+$ Zellen vermittelt und gleichzeitig die anschließende Immunfärbung mit einem zweiten, markierten anti-CD14-Antikörper ermöglicht. Nach der auf diese Weise vorgenommenen Anreicherung wurde bei den auf den Trägern verbliebenen Zellen in der anschließenden mikroskopischen Untersuchung noch ein recht hoher Anteil an neutrophilen Granulozyten beobachtet. Mit der Zugabe eines anti-CD16-Antikörpers während der Adhäsionsphase zur Unterbindung Fc-Rezeptor vermittelter Bindungsereignisse an den Neutrophilen war es in der Weiterentwicklung des Verfahrens schließlich möglich, den Anteil an verunreinigenden neutrophilen Granulozyten von etwa 60-80% der Ausgangsprobe auf unter 10% zu reduzieren (siehe Abb. 11).

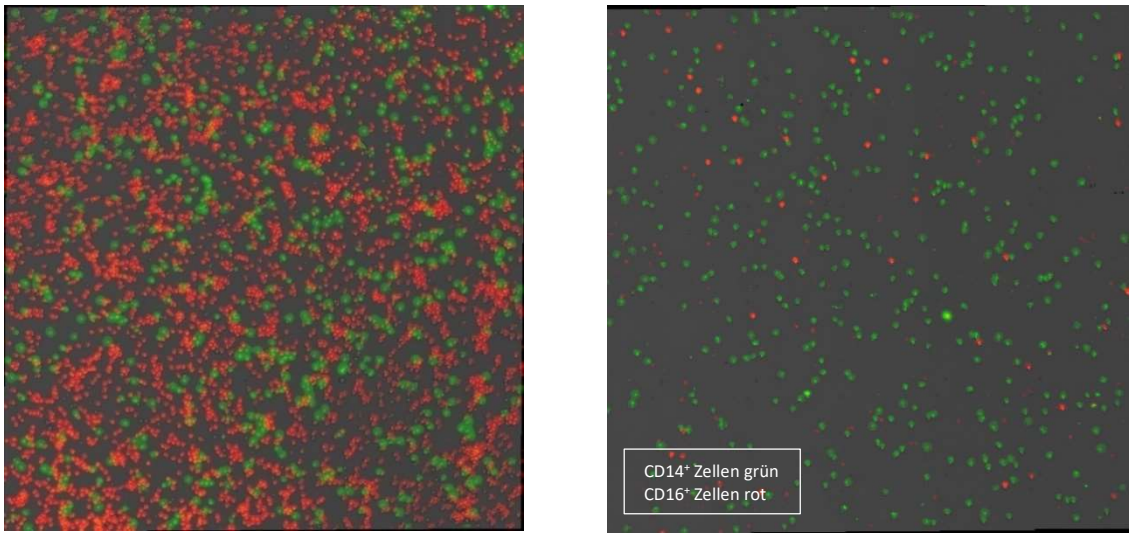



*Abb. 11) Lysierte Blutzellen auf einer CD14-AK vorbehandelten Glasoberfläche: die Konzentration von $CD14^+$Zellen konnte von 10% auf ca. 30% erhöht werden (links). Die Zugabe von CD16-AK während der Zellanlagerung verringert die Anlagerung von $CD16^+$Zellen deutlich. Eine Anreicherung von ca. 90% $CD14^+$Zellen konnte erzielt werden (rechts).*

Mit der finalen Abstimmung des Anreicherungsprotokolls lässt sich eine gleichmäßige und ausreichend stark ausgeprägte Adhäsion $CD14^+$ Monozyten und Makrophagen auf den Glasträgern erreichen, wodurch des mit der erarbeiteten Analysesoftware erheblich einfacher wird, eine ausreichende Zahl der interessierenden Makrophagen ($CD14^+$/$CD16^+$) einzulesen und zuzuordnen.

Um den Anwendungsaspekten der Präparation auf den dünnen Deckgläschen ausreichend Sorge zu tragen, wurde ein vorläufiges Design für eine Probenaufnahme entwickelt, welches die gleichzeitige Bearbeitung von bis zu 6 Proben in 2 Proben-Racks ermöglicht. In diesen Probenracks lässt sich ein Sedimentationsschritt per Zentrifugation in herkömmlichen Zentrifugen durchführen, um die Zellen gleichmäßig verteilt und reproduzierbar auf den beschichteten Deckgläschen anzuordnen. Dabei können die Proben-Racks mit einem Deckel versehen werden, um einen sicheren Umgang mit den klinischen Proben zu gewährleisten. Das im Projektzeitraum entwickelte Protokoll zur Präparation der Zellen ermöglicht es, auf einfache Weise innerhalb von 30 - 40 min eine gleichzeitige Immunfärbung und Anheftung der Zellen an bis zu 6 Proben parallel umzusetzen.

AP3-IMT04: Etablierung der Konservierung von Liquorzellen

Die Etablierung der Präparation und Konservierung von Liquorzellproben für die mikroskopischen Analysen mit dem RCMIA-Aufbau erfolgte in enger Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern am Uniklinikum Erlangen. Pandemiebedingt kam es in Erlangen zunächst zu einem deutlichen Rückgang an Patientenvorstellungen und der Bereitschaft, Liquorproben abzugeben, weshalb mit den Arbeiten an Liquorzellmaterial erst deutlich später begonnen werden konnte. Ersatzweise wurden erste Modellversuche an Blutleukozyten durchgeführt. Aufgabe war es, eine Methodik zu entwickeln, mit der die in nur geringer Zahl vorliegenden Zellen der Liquorflüssigkeit (durchschnittlich 500-2000 Zellen/ml), in geeigneter Form und mit hoher Wiederfindungsrate auf den Glasträgern aufgebracht werden können. Diese Situation wurde durch stark verdünnte Leukozyten-Suspensionen, mit Ausgangszellkonzentrationen von 2000 Zellen/ml nachgestellt. Über ein 3-stufiges Zentrifugationsverfahren wurden die Zellen konzentriert und in eine 3 mm Kavität auf die Glasträger aufgebracht. Bei der detaillierten experimentellen Abstimmung und Evaluierung stellte es sich als notwendig heraus, das Anheften der Zellen an die Zentrifugenröhrchen durch Zusatz von Serum-albumin zu verhindern und damit eine gute Wiederfindung an Zellen zu gewährleisten. Innerhalb der Modellexperimente lag die Wiederfindung nach automatischer Zählung der Zellen mit unserer Software nach optischer Abtastung am RCMIA-Aufbau typischerweise bei 80-100%.
Zur weiteren Vorbereitung der Präparation von Liquorzellen galt es zu berücksichtigen, dass diese Zellen nur für kurze Zeit in dem vorliegenden Milieu des Liquors intakt bleiben. In Publikationen ist auf eine pH-Veränderung kurz nach der Lumbalpunktion verwiesen worden, welche die Zellen stark beeinträchtigt und Degenerationsprozesse einleitet [1]. Es wurde daher gemeinsam mit dem Partner in Erlangen an einer Formulierung für ein Zusatzmedium gearbeitet, mit dem Liquorzellen für mehrere Stunden stabilisiert werden können. Das final definierte Supplement enthielt neben einer pH-Pufferkomponente, Serumalbumin sowie Nährmedien und konnte direkt nach der Abnahme der Liquorprobe zugesetzt werden um die Präparation auf den Glasträgern flexibel am nächsten Tag durchzuführen. Die gemeinsam durchgeführten Textexperimente haben zusätzlich ergeben, dass es die gefundene Lösung prinzipiell zulassen sollte, die Liquorproben künftig per Expressversand von klinischen Standorten an Untersuchungslabore zu versenden.
Eine weitere Herausforderung in der Präparation von Liquorzellen bestand in der im Vergleich zu Blutleukozyten nur sehr gering ausgeprägten Adhäsionstendenz. Um eine umfassende Analyse der seltenen Zellen des Liquors zu ermöglichen, war es notwendig alle Zelltypen gleichermaßen auf den Glasträgern anzureichern. Eine selektive Anbindung über Antikörper, wie es an der zuvor beschriebenen Situation mit Leukozyten des Blutes umgesetzt wurde, war aus diesem Grund für die Liquorproben nicht praktikabel. Innerhalb umfangreicher experimenteller Versuchsreihen wurden verschiedene Ansätze zur Oberflächenmodifikation des mikroskopischen Glasträgers und zur

Zellfixierung erprobt und bezüglich Zellausbeute und Stabilität der Aufbringung eingeschätzt. Mit dem final abgestimmten Verfahren, ließen sich die Zellen schließlich durch eine zweistufige Formaldehyd- und Methanol/Aceton-Fixierung an APTES-modifizierten Glasträgern immobilisieren, wodurch eine ausreichende strukturelle Integrität der Zellen und der adressierten Epitope gegeben war und was gleichzeitig die Stabilität der Oberflächenfixierung über mehrere Färbezyklen mit der mikrofluidischen Anordnung des RCMIA-Instruments erlaubte.
Die Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von Liquorzellen in den präparierten Zellkammern konnten aufgrund der späten Verfügbarkeit der Proben zum Projektende bisher nur für kurze Zeiträume bei 4°C erfolgen. Die Ergebnisse decken sich dabei mit den Versuchen an Blutzellen. Der Einfluss von Kryoprotektiva auf die veränderte Zellfixierung konnte noch nicht evaluiert werden.

AP5-IMT01: EDIM-basiertes diagnostisches Konzept zur Früherkennung Alzheimer-assoziierter Veränderungen in Vollblut

Die Identifizierung der uns interessierenden $CD14^+/CD16^+$ Zellen konnte wie geplant über die optische Erfassung am spezifisch abgestimmten RCMIA-Aufbau und die entwickelten Software-Module umgesetzt werden. Über die von den Partnern Cytecs und Quantum Analysis bereitgestellten optischen Kanäle zur Detektion von Fluorescein bzw. Atto488, Phycoerythrin, Allophycocyanin sowie DAPI bzw. BUV463 waren von den spektralen Bereichen so ausgelegt, dass eine parallele Erfassung von vier Fluoreszenzparametern möglich ist. Dies ermöglich ein zeitsparendes Auslesen von zwei Demenz-assoziierten Marken in den über die Oberflächenmarker CD14 und CD16 identifizierten Zellen.
Weiterer Spielraum bezüglich der Erfassung einer größeren Anzahl an interessierenden Markern wurde durch die Möglichkeit der sequenziellen Immunfärbung mit dem zuletzt gut funktionierenden mikrofluidischen System geschaffen.

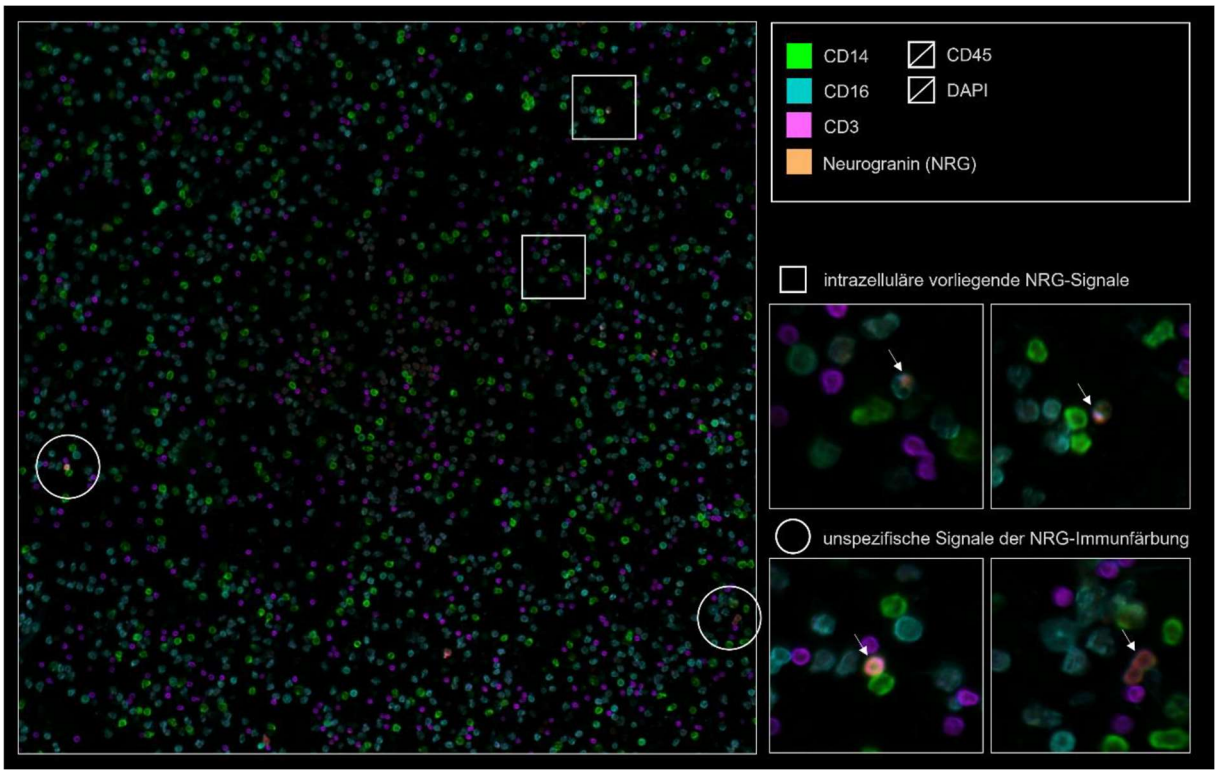



Abb. 12) 4-fach Bildstapel aus einer wiederholten 1x1 mm mikroskopischen Abtastung während einer sequenziellen Mehrfachfärbung der Leukozyten einer Blutprobe (AD-Patient) zur Erfassung CD14/CD16 positiver Zellen sowie intrazellulär vorliegendem Neurogranin-Material

Aufgrund der Verzögerungen, die infolge der umfangreichen Anpassungen zum finalen Design der Färbekammern entstanden sind, konnten bis zum Projektende nur in geringerer Anzahl Versuchsläufe zur Detektion von phagozytierten Alzheimermarkern an Blut- und Liquorproben durchgeführt werden. Die generelle Funktionstüchtigkeit der technischen Verfahrensprinzipien zur Detektion intrazellulär vorliegender Epitope konnte anhand der Immunfärbung von Neurogranin-Signaturen in $CD14^+/CD16^+$ Zellen bestätigt werden (Abb. 12). In den über das Laufzeitende hinaus noch andauernden Versuchen zur Detektion der Demenzmarker sollen die Ergebnisse anhand der Patientenblutproben weiter ausgebaut werden. Die bildgebende Erfassung der Epitope liefert eine wichtige Bestätigung für die vorläufigen Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse. Der direkte Vergleich der Ergebnisse zwischen dem Durchflusszytometrischen Ansatz und dem bildgebenden Ansatz über den RCMIA-Aufbau wird wichtige Auskünfte darüber liefern, welche Vorteile sich mit letzterem im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der Erfassung der Alzheimer-assoziierten Signaturen ergeben.

AP5-IMT02: Testung und Einbindung zusätzlich geschaffener Funktionalitäten in den diagnostischen Ablauf

Die aktuelle Ausbaustufe des Demonstrators wurde intensiv für Messungen an Zellen aus Blut- und Liquorproben getestet. Dabei wurden Methoden über Monate immer wieder angepasst und verbessert. Dieser Abschnitt konnte erst später als geplant bearbeitet werden, weil erst zum Projektende die Möglichkeit bestand mit Cerebrospinalflüssigkeit zu arbeiten. Es konnten Masterprotokolle etablieren werden, welche Analysen mit einer vergleichbar guten Qualität erlauben. Nach einer kurzen Einarbeitungszeit konnten die Zellen von drei unterschiedlichen Anwendern präpariert und in Kammern verbracht werden. Die Analyse der Zellen kann zuverlässig mit der erstellten Software erfolgen und sollten zukünftig weitere Optimierungsprozesse nötig sein, besteht durch unseren Software-Entwickler jederzeit die Möglichkeit für Nachbesserungen, die in der Software implementiert werden. Ein Grundgerüst für die Markierung von Signaturen auf der Zelloberfläche von Zielzellen und intrazellulären Strukturen konnte etabliert werden. An diesem Punkt können neue Antikörper flexibel in das Markerpanel aufgenommen werden, wenn sich Hinweise auf einen interessanten Antikörperkandidaten aus Patientendaten ergeben. Unsere Partner in Münster wurden regelmäßig über den Stand der Entwicklung informiert und Feedback zu technischen Details wurde erteilt.

Im Zuge des Projektes sind die Projektpartner in Münster zu einer neuen erheblich verbesserten konstruktiven Ausführung der optomechanischen Apparatur gelangt, die auf Grundlage der Rückmeldungen und Erfahrungen aller Verbundpartner entwickelt werden konnte. Die Übertragung der erarbeiteten Detektionsprinzipien auf die zum Projektende fertiggestellte neue Version ist in den kommenden Monaten im Zuge der Demonstrationsaktivitäten an künftige Anwender vorgesehen.

AP6-IMT01 Standardisierung der zugrundeliegenden Herstellungs- und Fertigungswege

Für die Reagenzien, die die ImmunoTools zur Verfügung gestellt hat, wurden geeignete Dokumentationen anlegt, welche die qualitätsbestimmenden Eigenschaften genau spezifizieren und künftige Nachpräparationen mit vergleichbaren Charakteristika möglich machen sollten. Die zur Produktion der benötigten Antikörper (anti-CD14 und anti-CD16) verwendeten Hybridomaklone liegen gesichert vor, die Protokolle zur Kopplung der verschiedenen Fluorochrome an alle betreffenden Antikörper sind angelegt und wurden regelmäßig durchgeführt. Die Antikörperproduktion aus Hybridomaklonen erlaubt eine zuverlässige Nachproduktion und kann kostensparend realisiert

werden. Die Reagenzienversorgung für die weiteren Verwertungsschritte ist auf dieser Grundlage sichergestellt.

AP6-IMT02 Standardisierung des diagnostischen Verfahrens

Für die Zellpräparation aus Liquor oder Blut wurden SOPs angefertigt und abgelegt. Dabei wurde Protokolle etabliert, die weitgehend auf aufwendige Oberflächenbehandlung verzichten und so einfach wie möglich gestaltet sind. Für den Probentransport von Cerebrospinalflüssigkeit wurden ein Transportmedium entwickelt, welches die Zellen vor Abbauprozessen schützt. Dennoch bleibt die Arbeit mit Liquor schwierig und es kann nicht für jede Probe garantiert werden, dass Kammern mit ausreichend Zielzellen hergestellt werden können. So kann es bei der Lumbalpunktion zu einer Verunreinigung mit Erythrozyten kommen oder die Probe enthält nicht ausreichend viele Zellen, um eine sinnvolle Analyse vorzunehmen. Wir sehen trotz allem viele Chancen für die Arbeit mit Zellen aus dem Liquor, weil das Probeausgangsmaterial limitiert ist und mit dem erarbeiteten Verfahren und den neu geschaffenen technischen Optionen die Möglichkeit besteht, viele Information aus dem wertvollen Probenmaterial zu gewinnen und ggf. die in den Kammern konservierten Zellpräparate bezüglich neu aufkommender Fragestellungen einer späteren Nachuntersuchung zu unterziehen. Die Aufarbeitung von Blutproben ist wesentlich besser standardisiert, gestaltet sich einfacher und ist weniger anfällig für Störfaktoren.

Die verwendeten Antikörperreagenzien können verlässlich und qualitativ hochwertig nachpräpariert werden, um sie in der EDIM-Analytik zur Detektion der Oberflächenmarker einzusetzen. Methoden zur Qualitätskontrolle sind etabliert und finden standardisiert Anwendung. Außerdem wurde eine maßgeschneiderte Analysesoftware erstellt, die als Ausgangsbasis für die Probenauswertung genutzt werden kann.

Relevante Informationen und Unterlagen für eine zukünftige CE-IVD Kennzeichnung werden gesammelt, um für den Zertifizierungsprozess vorbereitet zu sein.

Referenzen:

[1] Torzewski, Michael and Lackner, Karl J. "Cerebrospinal fluid cytology: a highly diagnostic method for the detection of diseases of the central nervous system" *LaboratoriumsMedizin*, vol. 40, no. s1, 2016, pp. 000010151520160044. https://doi.org/10.1515/labmed-2016-0044

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die bereitgestellten Mittel wurden sparsam und zweckgemäß für das Projekt eingesetzt. Die Verwendung erfolgte weitestgehend nach der ursprünglichen Planung. Der gesamten Selbstkosten des Vorhabens beliefen sich schließlich auf 547.885,07 EUR und lagen damit fast 32.000 EUR über dem ursprünglich vorgesehenen Budget. Die nachgewiesenen Mehrkosten für das Projekt wurden komplett vom Zuwendungsempfänger getragen.

Personal:

Für das Projekt wurden ausschließlich wissenschaftliche Mitarbeiter eingesetzt. Alle Mitarbeiter waren schon zu Beginn des Projektes verfügbar. In den Jahren 2020, 2021 und 2023 haben drei am Projekt

beteiligte Mitarbeiter das Unternehmen verlassen. Die verbliebenen 3 Mitarbeiter wurden mit der Bearbeitung der Teilprojekte betraut. Die Summe der projektbezogenen Personalkosten lag mit 533.913,53 EUR etwa 45.000 EUR über dem ursprünglich geplanten Kostenrahmen. Die Mehrkosten entstanden durch die sehr aufwendigen Programmierungsarbeiten an der Analysesoftware und die späte Verfügbarkeit von Liquor, weshalb letztendlich ein Verlängerungsantrag gestellt werden musste.

Verbrauchsmaterial:

Es wurden weniger Verbrauchsmaterialien eingekauft, als in der Kostenkalkulation vorgesehen. Insgesamt wurden für das Projekt 13.532,94 EUR an Materialkosten eingesetzt. Die Kosten für Verbrauchsmaterial lagen etwa 5.000 EUR unter dem ursprünglich geplanten Umfang.

Reisemittel:

Die Corona-Pandemie erforderte einige Anpassungen an die vorgesehenen Verbundtreffen. Persönliche Treffen beschränkten sich auf 2 Reisen, bei denen der Transfer von Methoden und Protokollen erfolgte oder Gerätetransfers durchgeführt wurden. Alle Verbundtreffen fanden ausschließlich im Rahmen von Videokonferenzen statt. Für das Projekt sind daher nur 438,60 € Reisekosten, 1.000 EUR weniger als ursprünglich geplant, angefallen.

sonstige unmittelbare Vorhabenskosten:

Das Budget von 8.000€ für sonstige Kosten, war für den Erwerb einer Analysesoftware angesetzt worden. Diese Leistung konnte letztendlich intern von einem Immunotools-Mitarbeiter erbracht werden. Aus diesem Grund ist bereits der Antrag auf eine Umwidmung der angesetzten Summe in Personalmittel beim Projektträger erfolgt. In diesem Bereich sind, wie bereits zuvor ausgeführt, erhebliche Bemühungen erbracht worden, um eine auf unsere Bedürfnisse abgestimmte Anwendung zu programmieren. Andere kommerziell erhältliche Programme, wären nicht flexibel genug gewesen und es hätten nicht so viele unterschiedliche Funktionen implementiert werden können.

Der Gesamtbetrag der sonstigen unmittelbaren Vorhabenkosten war auf 8.000,00 EUR festgelegt und wurde nicht abgerufen. Wir erhoffen, daher eine positive Entscheidung vom Projektträger, auf die nachträgliche Umwidmung dieser Summe in das Personalkostenbudget.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Mit dem Verbundvorhaben „NADIM“ wurde ein neuer Ansatz zum Nachweis von Alzheimer-assoziierten Signaturen in Blut und Liquorzellen zur Früherkennung der Demenzerkrankung verfolgt. Dabei lag der Fokus auf der Analyse einer spezifischen Monozytenpopulation, die auf diagnostisch verwertbare Signaturen untersucht werden sollte. Dieser Ansatz wurde bisher noch nicht für mit demenziellen Erkrankungen assoziierten Epitopen verfolgt. Der Übertritt der Blut-Hirnschranke von Monozyten ist möglich aber es war im Vorfeld unsicher, ob die Methode in diesem Kontext anwendbar ist.
Während der Projektphase waren wir besonders auf die Bereitstellung des modellhaften Aufbaus und später des Demonstrators durch unsere Partner aus Münster angewiesen. Durch eine enge Zusammenarbeit konnten technische Mängel behoben und Protokolle zur Zellpräparation und

Antikörpermarkierung etabliert werden. Die Fluidik konnte durch eine Überarbeitung der Kammerform und durch den Wechsel auf einen Glasgrundkörper mit den mikroskopoptischen Bauteilen harmonisiert werden.
Ein großer Teil der Entwicklungsarbeit betraf die Erstellung der Analyse und Auswertsoftware. Die Anwendung wurde über den gesamten Projektzeitraum immer wieder angepasst, neue Funktionen wurden hinzugefügt und das Programm wurde leistungsfähiger bei der Verarbeitung der spezifischen Daten.

Durch die Zusammenarbeit aller Verbundpartnern gelang die Entwicklung eines Verfahrens zur Erfassung seltener Zellen mit einer bildgebenden Methode. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass wir erfolgreich Blutleukozyten und Liquorzellen auf diese Art untersuchen konnten, obwohl sich beide Probenmaterialen erheblich voneinander unterscheiden.

Die wesentlichen Zielstellungen konnten weitestgehend erreicht werden. Wir mussten leider mehr Zeit als ursprünglich vorgesehen für die Arbeiten im Bereich der Liquozellpräparation aufwenden. Pandemiebedingt hatten wir erst später als geplant Zugang zu Liquorproben. Die gewährte Projektverlängerung machte es möglich, dieser Situation im Sinne der erfolgreichen Umsetzung der Projektziele zu begegnen.

## 4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Verbundvorhaben ermöglichte uns große Fortschritte auf sehr unterschiedlichen Gebieten. Die Entwicklung einer eigenen Software, die sehr flexibel erweitert werden kann und die schon zum jetzigen Zeitpunkt viele Funktionen besitzt, ist besonders hervorzuheben. Damit wurde eine Toolbox erstellt, welche zellmorphologische Merkmale erfassen und professionelle Analysen unter Einbeziehung von Fluoreszenzsignalen durchführen kann. Damit orientiert sich die erstellte Anwendung an Programmen wie ImageJ bietet aber in Bezug auf die vorliegende Anwendungssituation zur Gruppierung und Selektion von Zelltypen und zur Diskriminierung subzellulärer Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale umfangreiche Erweiterungen und Analysetools. Die gewonnen Messdaten lassen sich in verschiedenen Formen darstellen und exportieren, um sie z. B: weiterführenden Analysealgorithmen zuzuführen. Die KI-gestützte Auswertung konnte im Rahmen des Projektes zwar nur ansatzweise realisiert werden, aber wir sind zuversichtlich, dass wir dieses Werkzeug mit einer ausreichenden Datenlage noch implementieren können. Damit steigen die Erfolgsaussichten für die Entwicklung eines vereinfachten diagnostischen Tests, mit dem sich eine Alzheimer-Erkrankung frühzeitig erkennen lässt. Mit der Analysesoftware und den erarbeiteten Verfahren zur Anreicherung der zu untersuchenden Zellen und deren Präparation und Konservierung für umfangreichere Immunfärbungen sind sehr gute Voraussetzungen für eine wissenschaftlich/technische Anschlussfähigkeit geschaffen.

Aktuell laufen noch regelmäßig Untersuchungen an Patientenproben, um die bisher erreichte Datenlage weiter auszubauen, und konkrete Informationen darüber zugewinnen, welche Marker in ein künftiges diagnostisches Panel einbezogen werden sollten. Die vom Partner in Erlangen koordinierten Untersuchungen werden sich noch über einige Monate erstrecken und werden von unserer Seite durch die Bereitstellung der fluoreszenzmarkierten Antikörpersonden und der Anwendung und bedarfsgerechten Weiterentwicklung der Analysetools begleitet. Bei positivem Verlauf der Arbeiten,

halten wir es für realistisch, nach 12 bis 24 Monaten in die nächste Entwicklungsphase einzutreten, die sich der Etablierung eines standardisierten diagnostischen Verfahrens mit ausreichend charakterisierter Sensitivität und Spezifität innerhalb konkret festgelegter Testbedingungen widmen wird. Im Anschluss daran könnte innerhalb von fünf bis sieben Jahren gemeinsam mit dem Uniklinikum Erlangen und der INVIGATEs GmbH ein marktreifer diagnostischer Test entstehen, wenn die Ergebnisse der Etablierung wie erhofft ausfallen und damit auch weitere Partner bzw. Geldgeber einbezogen werden können, die es für den benötigten Finanzierungsrahmen braucht. Die Einführung eines Blut-basierten Frühtests für die Alzheimer-Erkrankung wäre mit einem deutlichen Wettbewerbsvorteil und Innovationsvorsprung verbunden. Der Test würde sich an einen breiten Personenkreis richten und könnte sich in der Routine als wertvolle Ergänzung zum bestehenden Angebot an Vorsorgeuntersuchungen einreihen.

Die EDIM-Analytik, die während des NADIM-Projekts beträchtlich weiterentwickelt werden konnte, bietet ein hervorragendes Grundgerüst für die Detektion unterschiedlichster Krankheitsbilder und kann innerhalb weiterer diagnostischer Aufgabenstellungen erprobt werden. Momentan verfolgt die ImmunoTools GmbH das Ziel weitere Einsatzfelder mit dieser Technologie zu erschließen. So konnten seit Anfang des Jahres erfolgreich Kooperationen mit renommierten Laboren in mehreren europäischen Ländern initiiert werden, die sich der Erprobung des EDIM-Konzeptes innerhalb verschiedener biomedizinischer Fragestellungen widmen. Wir erhoffen uns von dem damit verbundenen Ausbau unseres Netzwerks aus einflussreichen wissenschaftlichen Partnern und potenziellen Kunden eine erhebliche Reputationssteigerung, die unsere wissenschaftliche und wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit signifikant steigern wird.
Gemeinsam mit unserem Partner der INVIGATE GmbH ist es bereits gelungen einen Marker für gastrointestinale Entzündungen für die fortgeschrittene Entwicklung eines diagnostischen Tests, basierend auf der EDIM-Technologie, kommerziell zu verwerten und damit aller Voraussicht nach regelmäßige Umsätze zu ermöglichen. Wir sind zuversichtlich, dass wir daran anknüpfen und ähnliche Projekte erfolgreich umsetzen können.

Wir waren durch das Verbundvorhaben außerdem in der Lage tiefgreifende Kenntnisse im Bereich von bildgebenden Technologien zu erwerben. Die Möglichkeit, Probenmaterialien mit geringer Zelldichte zu konzentrieren und diese Zellen wiederholt über mikroskopoptische Verfahren zu analysieren, bietet Chancen für neue Anwendungsbereiche. So wäre die Entwicklung von spezialisierten Forschungsinstrumenten oder auch diagnostischen Tests an zellarmen Körperflüssigkeiten, wie Liquor, Urin, BAL oder Peritoneal Flüssigkeit denkbar.

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

Laut unserer Kenntnis sind bisher keine Studien erschienen, die den Erfolgschancen unseres Vorhabens entgegenstehen würden. Eine Publikation von Bossche und Kollegen [1] aus dem Jahr 2020, beschreibt den Nachweis phagozytierter Marker, die auf eine Neurodegeneration im CSF hindeuten. Dabei wird die gleiche Makrophagen Population untersucht, die auch bei der EDIM-Methodik im Mittelpunkt steht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der von uns gewählte Ansatz durchaus erfolgsversprechend ist, wenn wir die entsprechenden intrazellulären Strukturen anfärben können.

[1] van den Bossche WBL, Vincent AJPE, Teodosio C, Koets J, Taha A, Kleijn A, de Bruin S, Dik WA, Damasceno D, Almeida J, Dippel DWJ, Dirven CMF, Orfao A, Lamfers MLM, van Dongen JJM; TiMaScan Research Group. Monocytes carrying GFAP detect glioma, brain metastasis and ischaemic stroke, and predict glioblastoma survival. Brain Commun. 2020 Dec 26;3(1):fcaa215. doi: 10.1093/braincomms/fcaa215 . PMID: 33501422 ; PMCID: PMC7811761.

## 6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Projektergebnisse

Zum jetzigen Stand sind noch keine Veröffentlichungen zu den Projektergebnissen erfolgt. Aktuell werden weitere Untersuchungen zum Nachweis Alzheimer-spezifischer Epitope in Monozyten durchgeführt um die Datenbasis für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten zu schaffen. Eine weitere Veröffentlichung ist in Planung, bei der die Anreicherung von Zellen aus Liquor Flüssigkeit und deren Fluoreszenzmarker-gestützten Analyse über das RCMIA-System dargelegt wird.

Jena, den 04.09.2024

_____

Melissa Lehmann
Projektleitung ImmunoTools GmbH