

Abschlussbericht zu Nr. 4.4 NABF 2017

Zuwendungsempfänger: Universitätsklinikum Freiburg – Klinik für Frauenheilkunde, Hugstetter Straße 55, 79106 Freiburg

Förderkennzeichen: 03VP08290

Vorhabenbezeichnung: Nicht-invasive Micro-RNA basierte Brustkrebs-Diagnostik (MAMMACHECK)

Laufzeit des Vorhabens: 1.10.2020 – 30.09.2023

Berichtszeitraum: 1.10.2020 – 30.09.2023

1. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ergebnisse

Die Arbeiten des Projektes teilen sich innerhalb der Universität Freiburg auf drei Arbeitsgruppen auf:

- (i) Das Forschungslabor molekulare Onkologie an der Frauenklinik Seiten 1-6
- (ii) Das Zentrum Klinische Studien Seite 6 mit Anhang Studie
- (iii) Das Institut für Mikrosystemtechnik am Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung Seiten 6 -17

Die explorativen Arbeiten der Arbeitsgruppe molekulare Onkologie durch die Arbeitsgruppe „Methods of Systems Biomedicine Group am „Institute of Medical Biometry and Statistics“ (IMBI) der Universität Freiburg beratend unterstützt.

Die Projektleitung wurde von Prof. Dr. med. Thalia Erbes durchgeführt.

Zu den Arbeiten am **Forschungslabor molekulare Onkologie** an der Frauenklinik:

Zu Beginn des Projektes entwickelte sich der Zuwachs bei den Probandinnenzahlen relativ langsam. Daher wurde im Frühjahr 2021 eine zusätzliche Eintrittspforte mit den St. Vincentius Kliniken in Karlsruhe geschaffen. Das erforderliche Ethik-Votum wurde dazu entsprechend erweitert. Dies verbesserte vor allem die bis dahin unterrepräsentierte Anzahl an beteiligten Brustkrebs-Patientinnen, im Vergleich zu gesunden Probandinnen. Ab dem 26.04.2021 wurden in Karlsruhe zusätzliche Proben für das Projekt gesammelt. Mithilfe des zweiten Zentrums konnte die Rate an Studienteilnehmerinnen innerhalb der erkrankten Patientinnen auf 5-6 pro Woche erhöht werden. Die Zahl der für die Validierung notwendiger Probandinnen entsprechend dem Meilensteinkriterium Q5 wurde damit erreicht bzw. übertroffen. (siehe Abbildungen 1 und 2 unten). Die Arbeiten zur Zwischenanalyse sind entsprechend dem Arbeitsplan beim Zentrum Klinische Studien (ZKS) angelaufen.

Bis zum 31.12.2022 wurden insgesamt 1985 Urinproben gesammelt. Davon sind 1565 von gesunden Vergleichsprobandinnen und 420 von Brustkrebs-Patientinnen (BC). Der zeitliche Verlauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

Probenakquise	Beide Zentren
Gesunde Probandinnen	1565
BC-Patientinnen	420
Beide Gruppen	1985

Tabelle 1: Probenakquise Stand 31.12.2022

Bestimmung urinbasierter Biomarker. Zur quantitativen Bestimmung der zu validierenden Biomarker wurde aus Projektmitteln ein neues Lightcycler 480 Real-Time-PCR-System von Roche

beschafft. Dieses ist speziell für die Analyse der Urinproben innerhalb des Mammacheck-Projekts vorgesehen. Sämtliche Proben wurden auf diesem Lightcycler analysiert.

Eine erste Auswertung Anfang Q1 – 2022 zeigte lediglich eine sehr schwache Trennung zwischen BC und Gesunden.

Daraufhin erfolgten umfangreiche Maßnahmen zur Verbesserung der Sensitivität. Die nachfolgenden Auswertungen und Abbildungen 1 – 7 wurden von der Arbeitsgruppe an der UFK in Zusammenarbeit mit dem IMBI erstellt. So wurden der neu beschaffte qPCR Lightcycler im direkten Vergleich zur bisherig genutzten Apparatur ausführlich getestet. Es wurden außerdem Vergleiche zwischen Filtersäulen mit unterschiedlicher chemischer Bestückung (vgl. Abb. 2, SiO₂ vs. SiC) durchgeführt und das Optimum für sämtliche Analysen festgelegt. Des Weiteren wurde die chemische Komposition der im RNA-Isolierungsprozess verwendeten Puffer- und Elutionslösungen optimiert und schließlich standardisiert angewendet.

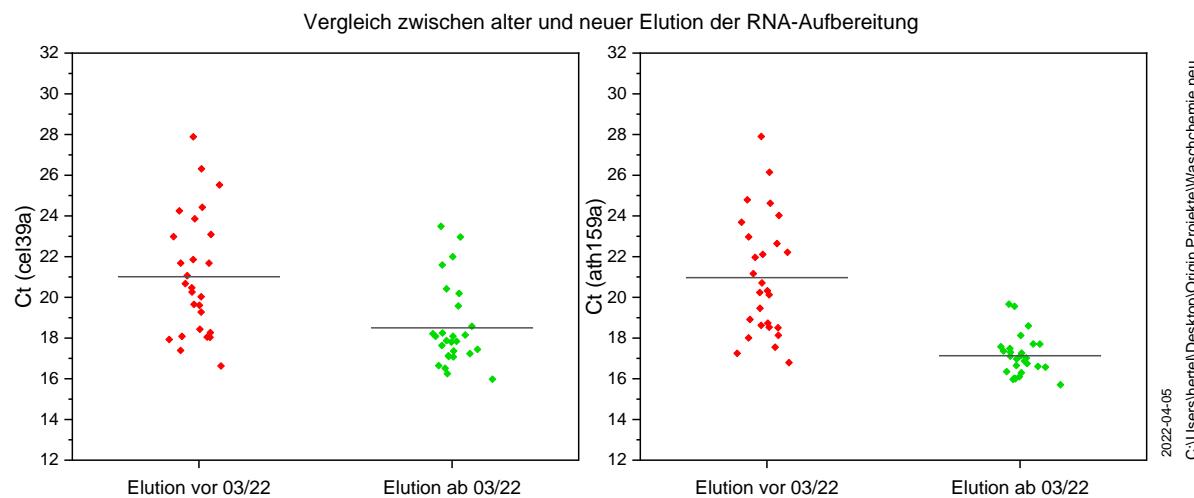


Abbildung 2 Ct Vergleich zwischen alter und neuer RNA-Aufbereitung

In der Folge konnte eine verbesserte Trennung zwischen BC und Gesunden erzielt werden. Im Mai 2022 zeigt eine weitere Zwischenauswertung von 123 Probendaten, dass sich bei zunehmender Probenzahl die Signifikanz der Trennung verschlechtert (Abb. 2). Das bisherige Biomarker Panel bedurfte offenbar einer weiteren Optimierung bzw. Erweiterung.

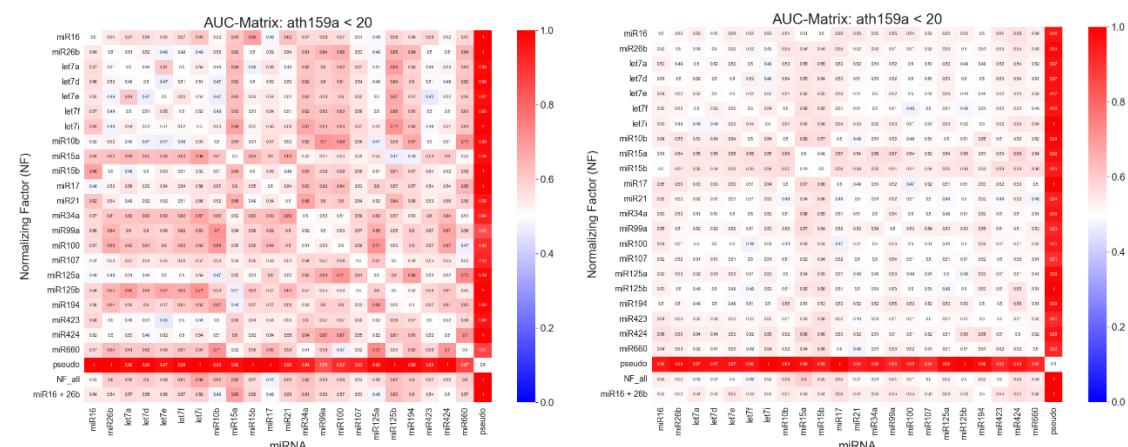


Abbildung 3 Links: Probenzahl 44, rechts: Probenzahl 123. Mit zunehmender Probenanzahl ergänzt sich die AUC Matrix

Zu diesem Zweck wurde Ende Q2 2022 beschlossen, Untersuchungen mittels Next-Generation Sequencing (NGS) bei den Firmen Starseq und GenXPro durchführen zu lassen. Nach Erweiterung des Ethikvotums wurden jeweils 2x 24 Proben (BC und Gesund) von beiden Firmen analysiert.

Erste Ergebnisse Ende Q4 – 2022 zeigten eine deutliche Verbesserung der Situation. Als Folge wurde das Panel mit neuen Biomarkern auf 17 Kandidaten erweitert. Diese wurden in Q1/2023 an 181 Proben, davon 84 BC und 97 Gesunde, in einem Vorvalidierungsverfahren mittels RT qPCR getestet.

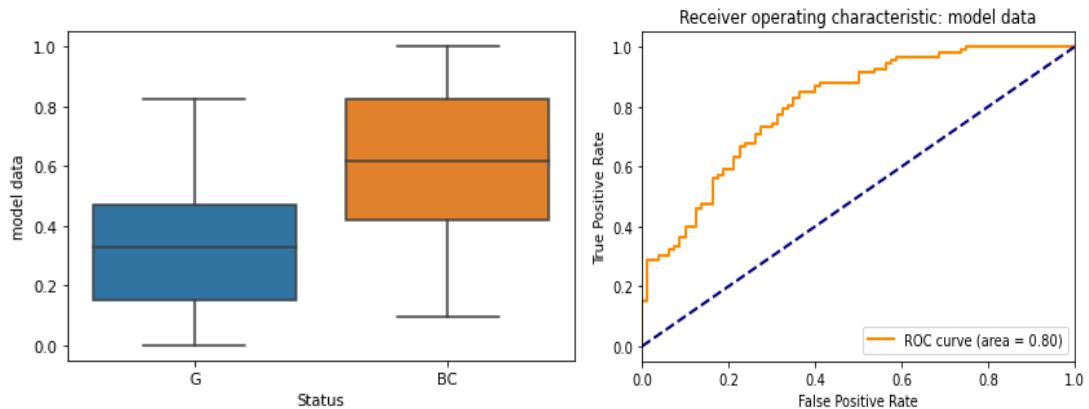


Abbildung 4: Logistisches Regressionsmodell der RT qPCR Vorvalidierung aller 17 miRNAs

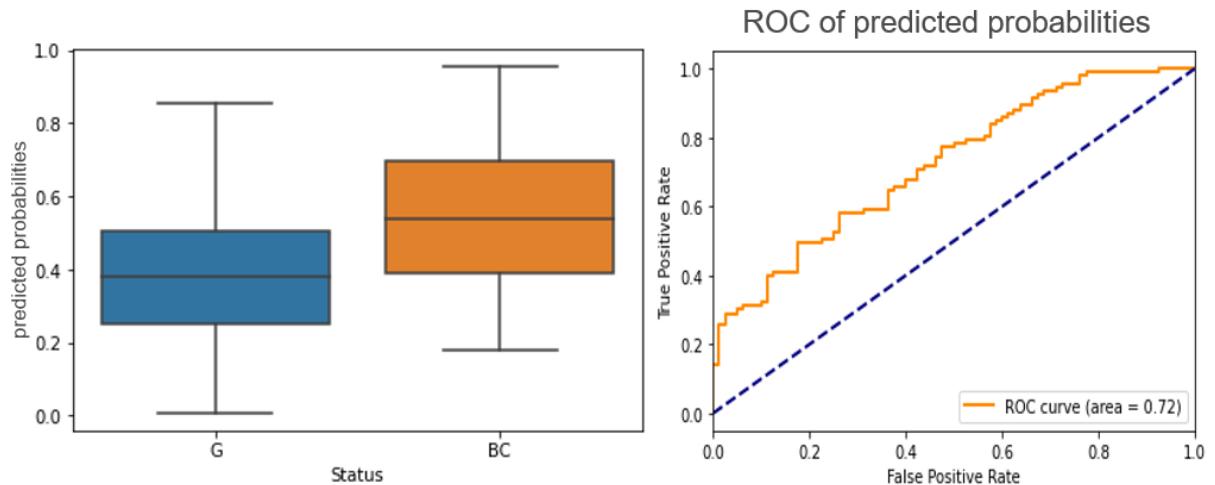


Abbildung 5: Logistisches Regressionsmodell der RT qPCR Vorvalidierung der Top 4 Biomarkerkandidaten

Während die Fläche unter der receiver-operation-characteristic (ROC)-Kurve des Modells aller 17 microRNAs 0.8 betrug, konnte diese für die besten vier mit 0.72 ermittelt werden.

Daraufhin entschieden wir uns dennoch für die Untersuchung aller 17 miRNAs an allen insgesamt 1687 validen Urinproben (384 BC versus 1363 Gesunde). Diese Arbeiten konnten Ende des Q2/2023 abgeschlossen werden.

Zur Vorbereitung für die statistische Analyse wurden die 1687 Proben zufällig in Trainings- und Testdaten aufgeteilt, wobei der Anteil der Trainingsdaten zwei Drittel betrug. Es folgte ein systematisches Testen verschiedener logistischer Regressionsmodelle. Dabei wurde die Gruppe

(Brustkrebs oder gesund) als abhängige Variable definiert, mit unterschiedlichen Kombinationen aus gemessenen mikro-RNAs und klinischen Variablen (Brustdichte, Alter und Menopausenstatus) als Prädiktoren. Die Auswahl der Kombinationen an Prädiktoren umfasste: (1) alle univariblen Modelle, (2) Forward- bzw. Backward step-wise Selection sowie (3) manuell selektierte Kombinationen, die explizit getestet werden sollten. Nachfolgend wurden alle Modellkombinationen innerhalb der Trainingsdaten und im Anschluss durch Kreuzvalidierung auf dem Testdatensatz getestet. Die Ergebnisse der Modelle in der Kreuzvalidierung stellten für die Auswahl der besten Modelle die Bewertungsgrundlage dar. Zur Bewertung wurden jeweils der AUC der ROC-Kurve, die Sensitivität und Spezifität berechnet. Um eine robuste Auswahl des besten Modells zu gewährleisten, folgte für jedes der Modelle ein 100-faches Wiederholen dieses Verfahrens mittels Bootstrapping sowie die Bestimmung der Bandbreite von Sensitivität, Spezifität und AUC.

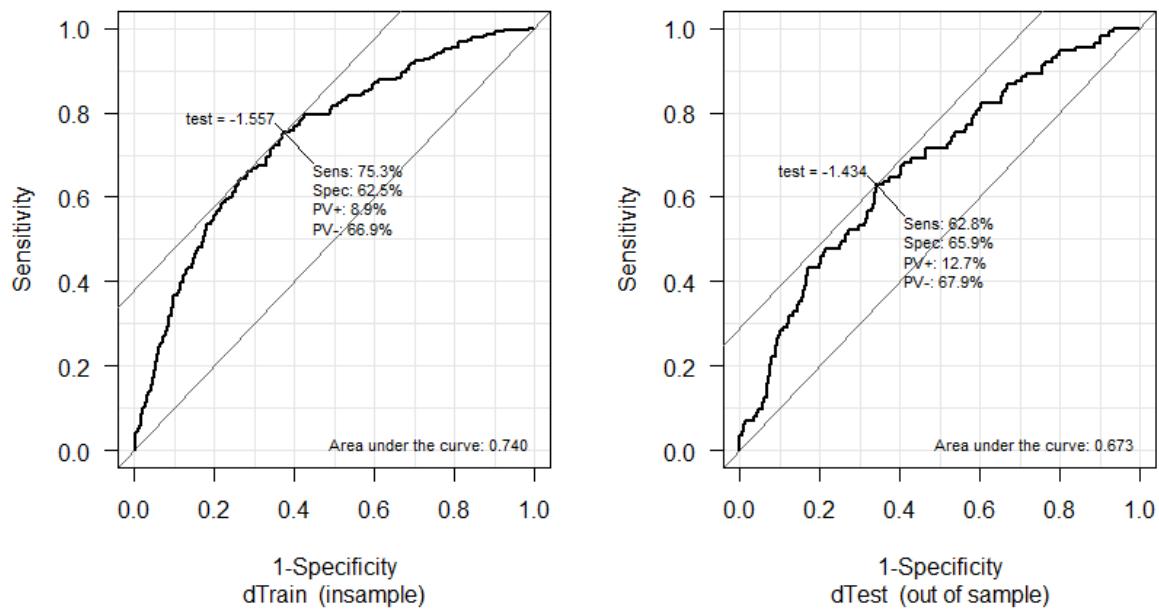


Abbildung 6: Modell1: Drei mikro-RNAs und Alter

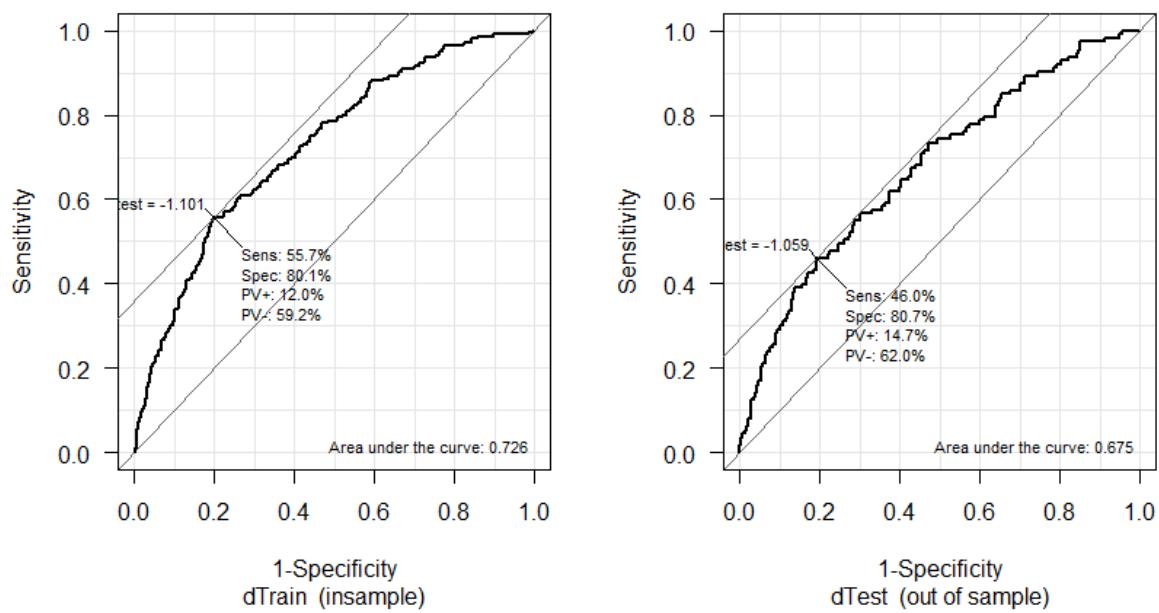


Abbildung 7: Modell2: Vier mikro-RNAs und Alter

Die Spezifität variiert zwischen 80,7 und 62,5%, die Sensitivität zwischen 75,3 und 46,0%.

Es zeigt sich zudem eine Altersabhängigkeit der Biomarker. Eine separate Analyse der Untergruppen „<50 Jahre“, „50 - 60 Jahre“ und „> 60 Jahre“ ergab die beste Diskriminierungsfähigkeit der Biomarker für die Altersgruppe der unter 50 Jährigen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da gerade bei jüngeren Frauen aufgrund ihrer höheren Brustdichte die diagnostischen Verfahren der Sonographie oder Mammographie oft nicht aussagekräftig sind. Eine Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie würde zwar zuverlässige Ergebnisse liefern, wird jedoch von den gesetzlichen Krankenkassen nicht finanziert.

Verwertungsstrategie

Im Hinblick auf die weitere Verwertungsstrategie für diese RNA-Extraktionsmethodik und die brustkrebspezifischen urinären mikro-RNA-Biomarker wurde eine Erfindungsmeldung erstellt. Mittlerweile ist die Patentanmeldung in Vorbereitung. Die Einreichung wird im Laufe Q2 2024 erfolgen. Als nächster Schritt ist geplant, mit den drei Firmen in Kontakt zu treten, die im Zuge der Antragstellung im Jahre 2019 in einem LOI (Letter of Interest) ihr Interesse an diesem Produkt bekundeten. Es handelt sich um die Firmen „Hiss Diagnostics GmbH“, „Qiagen“ und „Sysmex Inostics GmbH“. Sofern diese an dem von uns entwickelten Diagnoseverfahren interessiert sind oder/und das Potential an dessen Weiterentwicklung erkennen, bestehen in absehbarer Zukunft gute Chancen auf eine breite Anwendung dieses Testverfahrens.

Zusammenfassend haben wir im Projekt **Nr. 4.4 NABF 2017** das Ergebnis, dass Brustkrebs potentiell anhand von sechs mikro-RNA-Biomarkern aus nicht-invasiv gewonnenem Urin im Rahmen einer der Routinevorsorgeuntersuchung beim Niedergelassenen Gynäkologen nicht-invasiv vordetektiert werden kann.

Das **Zentrum Klinische Studien des Universitätsklinikums Freiburg (ZKS)** war im Projekt mit Aufgaben zum Management der Regularien (DSGVO, Ethik-Kommission), Biometrie und Datenmanagement, sowie Klinisches Monitoring beteiligt. Das Ergebnis der Arbeiten ist ein statistischer Report, der diesem Abschlussbericht beigelegt ist.

Zu den Arbeiten am **Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK)** in Verbindung mit einem **Unterauftrag an Hahn-Schickard**:

Im Rahmen des Mammacheck-Projekts übernahm der Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung am IMTEK das Arbeitspaket 5: Automatisierung des Mammacheck-Tests in Form eines Funktionsdemonstrators.

Die Projektarbeiten können in drei Phasen eingeteilt werden, die im Folgenden beschrieben werden: Phase 1: Konzeptentwicklung, Phase 2: Bau des Funktionsdemonstrators und Phase 3: Einbettung in die Analytik

Phase 1: Konzeptentwicklung

Der Mammacheck-Test besteht hauptsächlich aus zwei Prozessteilen: der Probenaufbereitung, sprich der Extraktion exosomaler miRNA aus Urinproben, sowie einer zweistufigen RT (Reverse Transkriptase)-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zur Bestimmung der miRNA-Expressionslevel. Demnach wurde zum Start der Projektarbeiten zunächst evaluiert, welche Prozessteile des Mammacheck-Tests automatisiert werden müssen, um das übergeordnete Projektziel – die automatisierte Einbettung des Mammacheck-Tests in die Analytik - zu erreichen. Hierfür wurden Marktrecherchen betrieben, als auch das Großlabor Clotten in Freiburg besucht. Die Evaluation ergab, dass für die Etablierung des Mammacheck-Tests in Großlaboren insbesondere ein Gerät zur Probenaufbereitung (der Extraktion von miRNA aus Urinproben) fehlt. Die Extraktion erfolgt auf Basis verschiedener Filtrationsschritte, für dessen Automatisierung es noch kein geeignetes kommerzielles Gerät auf dem Markt gibt. Für den zweiten Prozessteil (zweistufige RT-PCR) hingegen sind Großlabore in Form von PCR- und Pipettierrobotern standardmäßig ausgestattet.

Folglich wurde im weiteren Verlauf der Projektarbeiten ein Automatisierungskonzept zur Extraktion exosomaler miRNA aus Urinproben entwickelt in Form eines Funktionsdemonstrators. Der zu automatisierende, manuelle Prozess besteht aus sieben Filtrationsschritten, wobei die Flüssigkeit manuell mit Hilfe einer Spritze über einen Filter transferiert wird oder Extraktionsröhren zentrifugiert werden (siehe Abbildung 1).

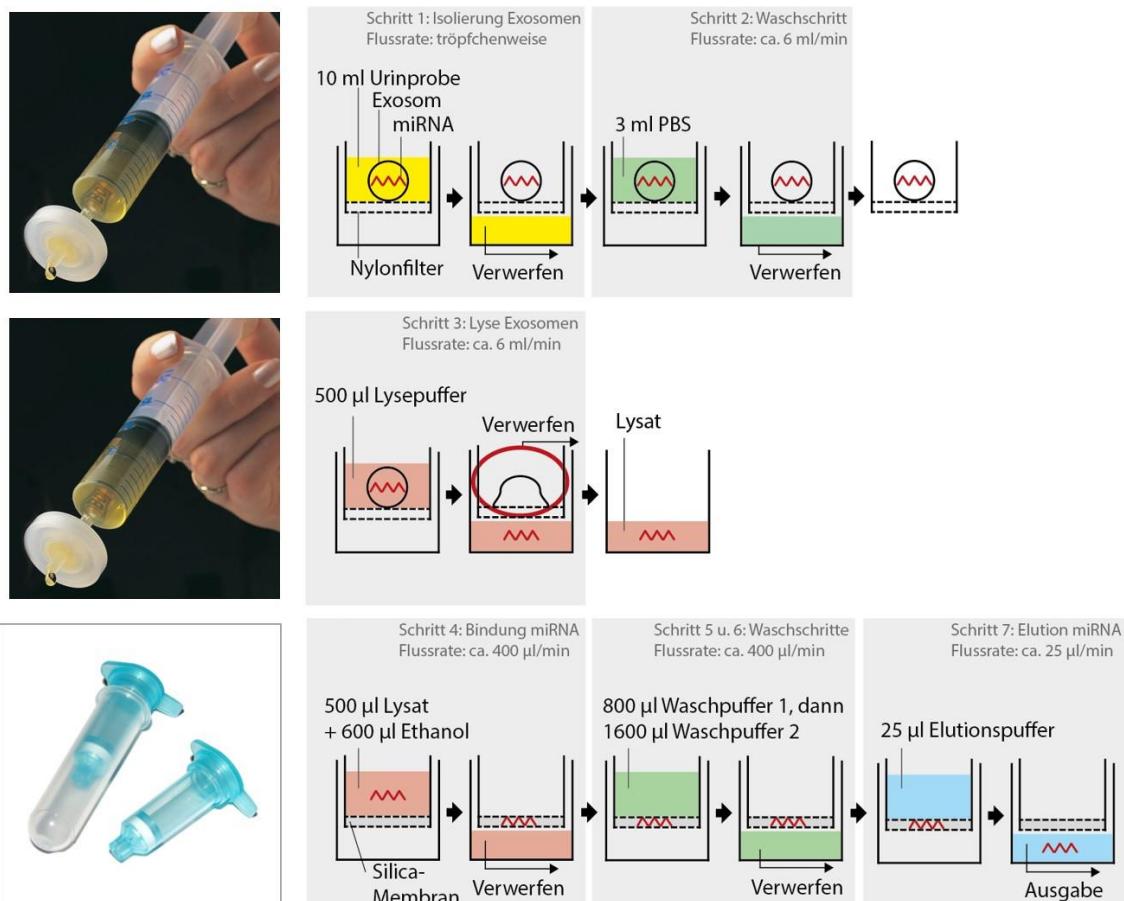


Abbildung 1: Darstellung der manuellen Probenaufbereitung zur Extraktion von exosomaler miRNA aus Urinproben. Der Prozess besteht in Summe aus 7 Filtrationsschritten, die in der Abbildung näher definiert sind.

Das Automatisierungskonzept entsprach einer Adaption der Filtrationsschritte, allerdings ausschließlich über luftdruckgetriebenen Flüssigkeitstransfer. Dieses Prinzip ist beispielsweise bekannt bei sogenannten „Positive pressure processors“. Im vorliegenden Fall bietet der luftdruckgetriebene gegenüber dem zentrifugalen Flüssigkeitstransfer hinsichtlich der Laborautomatisierung einige Vorteile: Geringerer Platzverbrauch, einfacheres Wastemanagement (Durchfluss, der verworfen werden muss) sowie einfache Handhabung großer Probenvolumina. Ein Nachteil hingegen ist die schwierigere vollständige Entleerung der Filtermaterialien.

Ein „Proof of principle“ des entwickelten Filtrationskonzepts wurde über Vortests mit einem Teststand erbracht, mit dem zwei Urinproben parallel prozessiert werden konnten (siehe Skizze in Abbildung 2). Alle benötigten Flüssigkeiten wurden manuell einpipettiert, jedoch automatisiert über Luftdruck durch die jeweiligen Filter transferiert. Neben dem „Proof of principle“ wurde mit den Vortests auch die optimale Flussrate (eingestellt durch den Filtrationsdruck) für den ersten Filtrationsschritt evaluiert, die bis dato noch nicht quantifiziert wurde (vgl. Abbildung 1). Hierfür wurde der Luftdruck für den ersten Filtrationsschritt zwischen 50 mbar und 250 mbar variiert, mit resultierenden Flussraten zwischen 1 mL/min und 10 mL/min. Die Lufterücke für alle weiteren Filtrationsschritte wurden derart eingestellt, dass sie den Flussraten des manuellen Tests entsprachen (vgl. Abbildung 1). Die genannten Parameter der Vortests können Tabelle 2 entnommen werden.

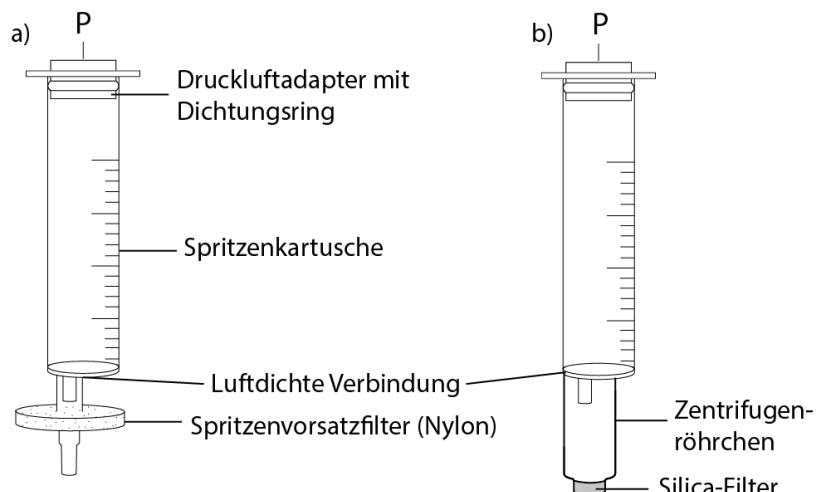


Abbildung 2: Funktionsprinzip des Teststands: Luftdruckgetriebener Flüssigkeitstransfer a) durch einen Nylonfilter bzw. b) durch einen Silica-Filter. Zur manuellen Eingabe der benötigten Flüssigkeiten wurde der Druckluftadapter abgenommen.

Tabelle 2: Auflistung des angelegten Luftdrucks für alle Filtrationsschritte während der Vortests. Der optimale Luftdruck für den ersten Filtrationsschritt wurde im angegebenen Bereich evaluiert.

Filtrationsschritt Nr.	Filter	Medium	Filtrationsdruck
1	Nylon, Porengröße 0,22 µm	Urin	50 mbar – 250 mbar
2		PBS	500 mbar
3		Lysepuffer	500 mbar
4	Silica-Membran	Lysat + Ethanol	800 mbar
5		Waschpuffer 1 u. 2	800 mbar
6		Elutionspuffer	50 mbar

Pro getestetem Druckbereich wurden zwei Urinproben prozessiert. Zusätzlich wurden zwei Proben manuell prozessiert. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu bewahren, wurden alle Proben aus einem Probenpool entnommen. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Abbildung 3 zeigt die Mittelwerte der RT-PCR-Ergebnisse (Ct-Werte) der unterschiedlich prozessierten Proben. Zunächst wird deutlich, dass die Ergebnisse der automatisiert prozessierten Proben im Bereich der manuell prozessierten Proben liegen. Dies bewies bereits die Funktionalität des Automatisierungskonzepts.

Des Weiteren ist erkennbar, dass mit dem geringsten Filtrationsdruck von 50 mbar die niedrigsten Ct-Werte erzielt werden. Dies korrespondiert mit der höchsten miRNA-Ausbeute. Ebenfalls die Standardabweichungen sind für einen Filtrationsdruck von 50 mbar am geringsten. Anhand dieser Ergebnisse wurde der optimale Luftdruck für den ersten Filtrationsschritt auf 50 mbar festgelegt.

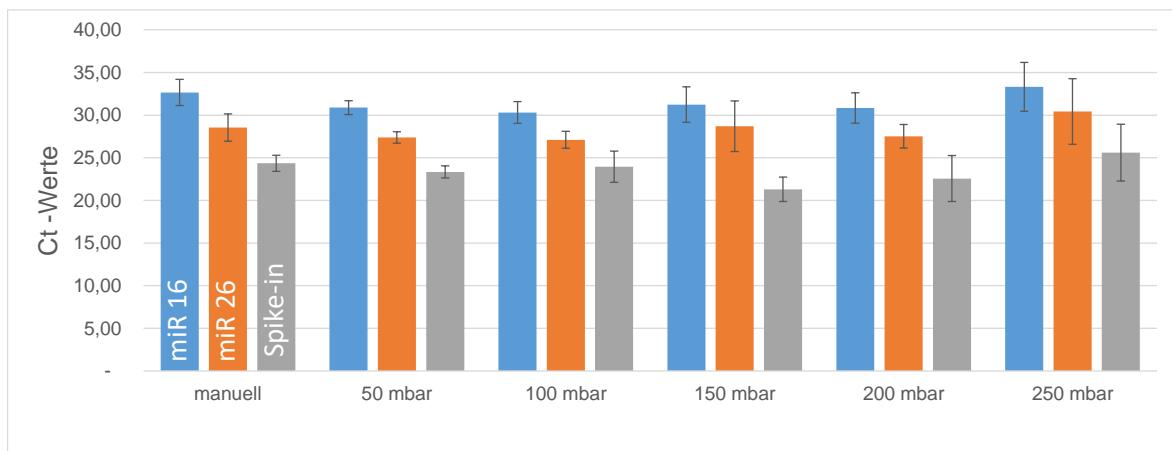


Abbildung 3: PCR-Ergebnisse zur Bestimmung von miRNA-Expressionslevel in Urinproben. Vergleicht werden manuell und automatisiert prozessierte Urinproben. Innerhalb der automatisiert prozessierten Proben werden unterschiedliche Filtrationsdrücke evaluiert.

Anhand der Vortests konnten die wichtigsten Parameter sowie Anforderungen an einen Funktionsdemonstrator basierend auf dem Automatisierungskonzept definiert werden. Hieraus wurde ein Lastenheft erstellt, das kurz zusammengefasst folgende Key-Features des Funktionsdemonstrators vorsah:

- Probenaufbereitung über luftdruckgetriebene Filtration durch Filterplatten im 24-well-plate Format
- Eingabe aller benötigten Puffer über ein Dispensiermodul

Der Bau des Funktionsdemonstrators wurde im Rahmen einer Verhandlungsvergabe als Unterauftrag ausgeschrieben.

Phase 2: Bau und Evaluation des Funktionsdemonstrators

Beschreibung des automatisierten Workflows

Mit dem Bau des Funktionsdemonstrators wurde das Institut Hahn-Schickard beauftragt, das nach der Ausschreibungsphase den Zuschlag hierfür erhielt. In Abbildung 4 ist der fertiggestellte Funktionsdemonstrator mit Kennzeichnung aller integrierten Elemente dargestellt. Abbildung 5 zeigt zusammengefasst den automatisierten Workflow basierend auf luftdruckgetriebener Filtration durch Filterplatten im 24-well-plate Format samt Parameter.



Abbildung 4: Bild des fertiggestellten Funktionsdemonstrator mit Beschriftung aller relevanten Elemente.

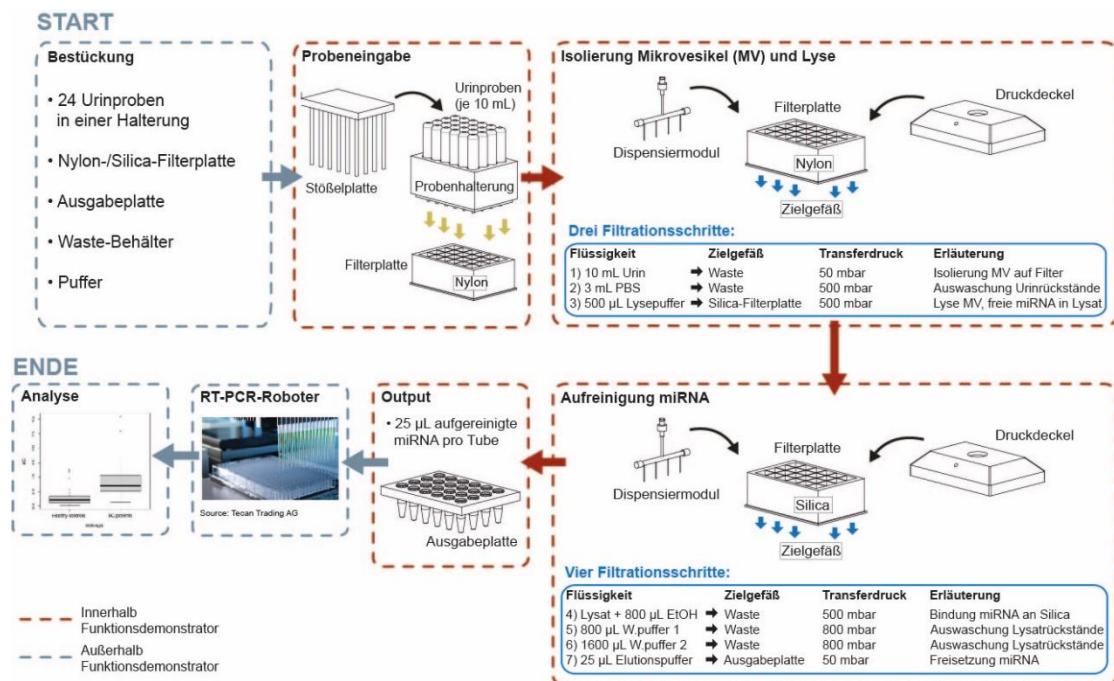


Abbildung 5: Darstellung des automatisierten Workflows. Nicht in der Abbildung erwähnt: vor Filtrationsschritt 4 wird die Mischung aus Lysat und Ethanol für 2 min bei 1000 rpm auf der Schüttelplatte gemischt.

In den nachfolgenden Abschnitten sind die in Abbildung 5 skizzierten Prozessschritte kurz erläutert.

Parallelisierte Probeneingabe in den Funktionsdemonstrator (patentiert)

Nach Bestückung des Funktionsdemonstrators durch den Benutzer folgt der Workflow-Teil Probeneingabe. Hierfür wurde die folgende Methode samt beinhaltenden Vorrichtungen entwickelt und zum Patent angemeldet: Zunächst positioniert der Roboterarm die Halterung mit den 24 Probengefäßen sowie das Zielgefäß (Nylon-Filterplatte) übereinander auf den vorgesehenen Platz auf bzw. unter dem „Filtrationstisch“ (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 5). Die Urinproben wurden zuvor mittels einem Kolben in die Probengefäße eingesogen. Eine speziell entwickelte Stößelplatte bestehend aus 24 Stößeln angeordnet im 24-Wellplate-Format, wird auf die Kolben der Probenrörchen positioniert und anschließend aktuiert, sodass die Kolben heruntergedrückt werden und dadurch der Probentransfer aus den Probenrörchen in die Nylon-Filterplatte erzielt wird. Anschließend stellt der Roboterarm alle nicht benötigten Elemente zurück und ordnet die Platten für den nächsten Workflow-Teil neu an.

Isolierung und Lyse der Mikrovesikel, Aufreinigung und Ausgabe der miRNA

Für den Workflow-Teil Isolierung und Lyse der Mikrovesikel werden drei Filtrationsschritte durchgeführt. Über das Dispensiermodul werden alle benötigten Puffer eingegeben. Für die Filtration, sprich für den Flüssigkeitstransfer durch die Filterplatte, wird ein Druckdeckel auf die Filterplatte gepresst und Luftdruck angelegt. Aus Abbildung 5 können die Details der drei Filtrationsschritte entnommen werden.

Im darauffolgenden Workflow-Teil Aufreinigung der miRNA werden ebenfalls drei Filtrationsschritte durchgeführt, technisch analog zum vorangegangenen Workflow-Teil. Zusätzlich kommt auch die in Abbildung 4 genannte Schüttelplatte zum Einsatz, um die zwei Flüssigkeiten des vierten Filtrationsschritts (Lysat und Ethanol, siehe Abbildung 5), zu mischen.

Für die Ausgabe der miRNA wird diese im letzten Filtrationsschritt in die Ausgabeplatte (siehe Abbildung 5) eluiert, sprich freigesetzt.

Performance der Schlüsselkomponenten Druckdeckel und Dispensiermodul

Neben der zuverlässigen Probeneingabe, sowie fehlerfreien Pfadplanung und Greifprozessen, stellen die Komponenten „Dispensiermodul“ als auch „Druckdeckel“ die Schlüsselkomponenten des Geräts dar.

Dispensiermodul

Über das Dispensiermodul werden alle benötigten Flüssigkeiten und Puffer eingegeben. Die Qualität und Vergleichbarkeit der mit dem Funktionsdemonstrator generierten Ergebnisse hängen mitunter stark von der Genauigkeit des Dispensiermoduls ab.

Wie in Abbildung 5 herauszulesen ist, müssen im gesamten Workflow sechs unterschiedliche Puffer dispesiert werden. Pro Puffer sollte ein Dispensierkopf verwendet werden, um Kontaminationen, sowie aufwendige Spülsschritte zu vermeiden. Da pro Kavität der Filterplatten Volumen zwischen 25 µL bis 3 mL dispesiert werden müssen, wurde sich für das Dispensieren basierend auf dem Druck-Zeit-Prinzip entschieden. Dieses ist im Allgemeinen bis zum unteren Mikroliterbereich präzise und bzgl. des maximalen Dispenservolumens nicht limitiert. Bei dem genannten Prinzip steht ein Reservoir mit der zu dispensiernenden Flüssigkeit unter Druck, welche mit einem Schlauch über ein zwischengeschaltetes Ventil mit dem Dispensierkopf verbunden ist. Die Öffnungszeit des Ventils

bestimmt somit das dispensierte Volumen. Um parallel und somit zeitsparend dispensieren zu können, wurde bei der Recherche gezielt nach Mehrkanal-Dispensierköpfen gesucht.



Abbildung 6: Darstellung
des verwendeten
Dispensierkopfs.

Nach Marktrecherche und Evaluation in Frage kommender Dispensierköpfe wurde sich für eine Kombination aus einem Dispensierelement der Firma Socorex (Produkt-Nr. 1.170.054) mit einem vorangeschalteten Magnetventil der Firma Lee (Produkt-Nr. LHDB2462145D) entschieden (siehe Abbildung 6). Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der Dispensierkopfevaluation, bei der mit DI-Wasser die Transferfunktion (dispensierte Volumen für steigende Ventilöffnungszeit) über drei Messwiederholungen pro Einzeldüse generiert wurde. Der In-tip-CV von < 0,59% als auch der Tip-to-tip-CV von < 0,87% überzeugt im Vergleich mit marktüblichen Dispensierköpfen.

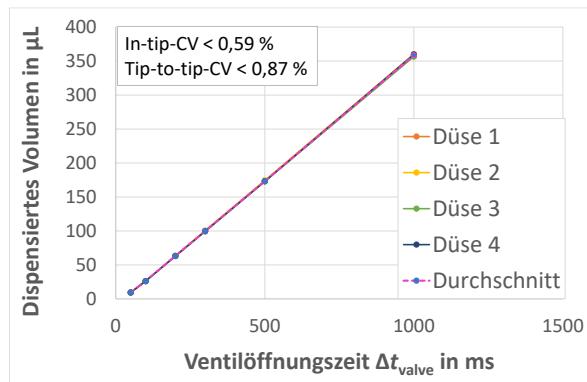


Abbildung 7: Ergebnisse der Präzisionsmessungen für das Dispensierelement (Socorex) plus Magnetventil (Lee).

Nach Einbau der genannten Dispensierelemente als 6 x 4 Dispenser in den Funktionsdemonstrator (siehe Abbildung 4), wurden die Dispensierelemente durch Generierung einer Transferfunktion auf ihren jeweiligen Puffer kalibriert. In ABBILDUNG 8 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Messungen wurden zu unterschiedlichen Tageszeiten und somit Labortemperaturen wiederholt.

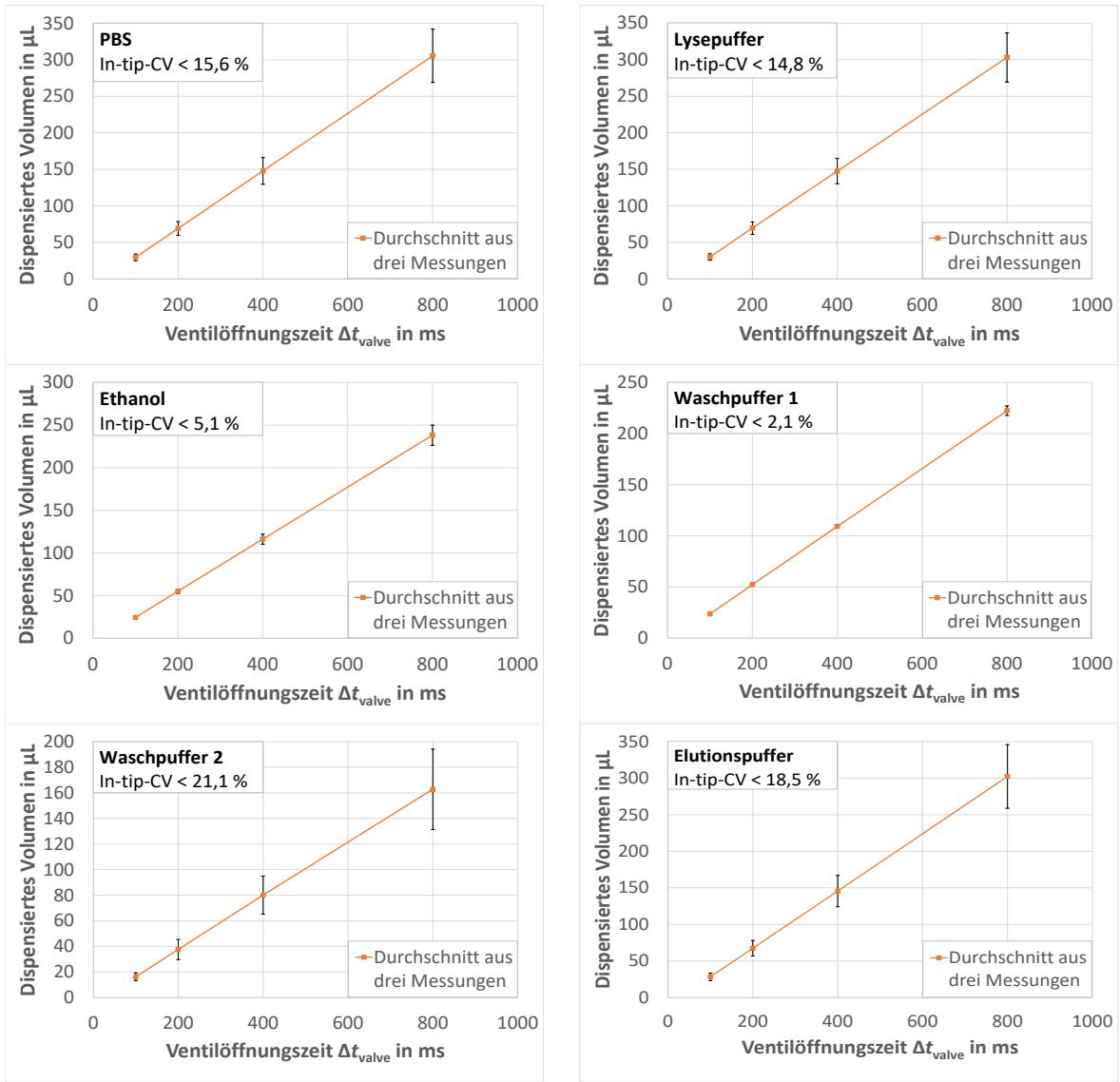


ABBILDUNG 8: ERGEBNISSE DER DISPENSIERKOPF-KALIBRIERUNG AUF DIE JEWELIGEN ZU DISPENSIERENDEN PUFFER.

Es ist erkennbar, dass die Abweichungen und die In-tip-CVs größer ausfallen, als bei der Dispensierkopf-Evaluierung mit DI-Wasser (vgl. Abbildung 7). Dies liegt zum einen an den nicht stabilen Temperaturen in dem Labor, in der die Messungen durchgeführt wurden (Schwankungen von 26°C – 31°C im Zeitraum der Messungen), als auch an den verwendeten Puffern. PBS, der Lysepuffer und der Waschpuffer 1 sind leicht bis stark salzhaltig. Hierdurch entstehende Salzablagerungen im fluidischen Pfad als auch in den Ventilen beeinflussen die Dispensierung pro Messung unterschiedlich. Darüber hinaus sind der Waschpuffer 2 (70% Ethanol) als auch das Reinstethanol aufgrund der niedrigen Viskosität schwer zu dispensieren. Die Flüssigkeiten tropften teilweise auch ohne Ventilaktuation aus dem jeweiligen Dispensierelementen heraus, was das Messergebnis verfälscht.

Da das Dispensiermodul aufgrund des vorangegangenen Zeitplans nicht mehr geändert werden konnte, wurden die Abschlussexperimente mit dem vorhandenen Dispensiermodul durchgeführt.

Grundsätzlich könnten die beschriebenen Probleme jedoch adressiert werden, indem man beispielsweise auf ein Dispensierverfahren mittels Spritzenpumpe ausweicht. Dieses Prinzip hat

ebenfalls den Vorteil, dass die Dispensiergenauigkeit bis in den unteren Mikroliterbereich sehr genau ist, und je nach verwendeter Spritze auch für höhere Dispenservolumen verwendet werden kann.

Der Vorteil von Dispensierungen mittels Spritzenpumpe gegenüber dem Druck-Zeit-Prinzip ist zum einen, dass Ventile die Dispensiergenauigkeit nicht unmittelbar beeinflussen. Zum zweiten gibt es keine Abhängigkeit zu den fluidischen Eigenschaften der Flüssigkeiten, wodurch keine Kalibrierungen auf verschiedene Puffer notwendig sind. Zum dritten kann bei inaktiven Dispenserköpfen ein Luftpolder eingesogen, und somit ein unkontrolliertes Heraustropfen niedrigviskoser Puffer verhindert werden. Nachteilig ist jedoch der deutlich höhere Preis bei Einsatz von Spritzenpumpen. Bei Einsatz einer Spritzenpumpe pro Puffer würden verglichen mit dem etablierten Druck-Zeit-Prinzip Mehrkosten von rund 3200 € pro Puffer auftreten. Bei Einsatz von nur einer Spritzenpumpe für alle Puffer belaufen sich die Mehrkosten auf rund 1400 € pro Puffer, jedoch wären Spülsschritte hierbei unabdingbar.

Neben Änderung des Dispensierprinzips, könnten auch sogenannte „Auswurfdispensierungen“ vor den eigentlichen Dispensierungen ausgeführt werden. Dies führt zu einer vollständigen Benetzung aller fluidischen Pfade, was wiederum die Dispensiergenauigkeit erheblich verbessern kann.

Druckdeckel

Für die luftdruckgetriebene Filtration wurde ein Druckdeckel mit Dichtungsmaterial benötigt, der vom Roboterarm luftdicht auf die Filterplatten angedrückt werden kann. Abbildung 9 zeigt die Kraft, die aufgrund des Gegendrucks während des Flüssigkeitstransfers auf den Roboterarm ausgeübt wird. Bei einer Druckbeaufschlagung von 50 - 800 mbar entspricht die Gegenkraft 38 - 610 N, was einer Gewichtskraft von ca. 3,8 - 61 kg entspricht.

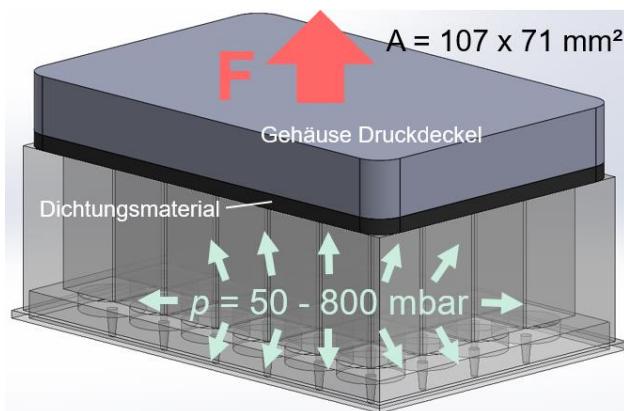


Abbildung 9: Darstellung der auf den Roboterarm wirkenden Gegenkraft bei Druckbeaufschlagung. In schwarz ist das Filtermaterial dargestellt.

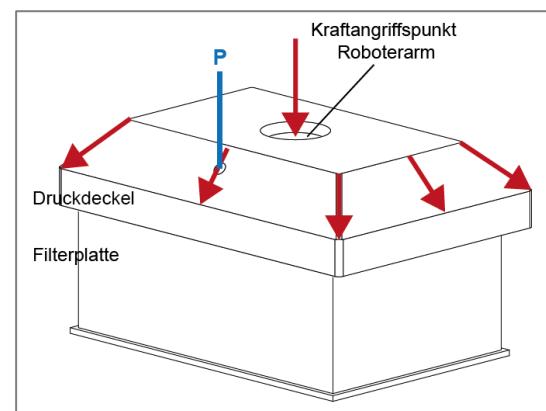


Abbildung 10: Darstellung der durch die Dachform des Druckdeckels hervorgerufenen Kräfteverteilung.

Hinzu kommt, dass für das Dichtungsmaterial eine gewisse Anpresskraft benötigt wird, um eine zufriedenstellende Abdichtung zu erreichen. Diese Anpresskraft addiert sich auf die bereits beschriebene Gegenkraft hinzu, weshalb die Anpresskraft so gering wie möglich sein muss, um den Roboterarm nicht zu überlasten. Daher wurde eine Analyse verschiedenster Dichtungsmaterialien durchgeführt und sich schließlich für ein geschlossenzelligen Chloropren-Kautschuk entschieden.

Bei dem Design des Druckdeckels wurde auf eine sinnvolle Verteilung bzw. Leitung der wirkenden Kräfte geachtet. Eine Dachform (siehe Abbildung 10) soll die Anpresskraft des Roboterarms auf die Außenkanten der Filterplatten leiten, die es primär abzudichten gilt.

Da diese Maßnahmen noch nicht ausreichten, um den Druckdeckel bei bis zu 800 mbar luftdicht auf die Filterplatte zu drücken, wurden Elektromagneten installiert, die den Druckdeckel an den langen Seitenkanten mit einer zusätzlichen Haltekraft von 600 N auf der Filterplatte fixierten. Dies verbesserte den Flüssigkeitstransfer erheblich. Dennoch gab es minimale Leckage des Luftdrucks an den Stirnseiten des Druckdeckels. Dort ist der Abstand zu den Elektromagneten maximal und der Druckdeckel kann sich hier verformen und abheben.

Aufgrund des vorangegangenen Zeitplans musste die Restleckage des Luftdrucks in Kauf genommen werden, was wiederum in längeren Transferzeiten resultierte (siehe nächster Abschnitt).

Grundsätzlich können die genannten Probleme jedoch adressiert werden, indem man den Druckdeckel aus einem starren Material fertigt, sodass keine Verformung und dadurch Leckage stattfinden kann. Des Weiteren könnten die beschriebenen Probleme umgangen werden, indem man eine feste Linearachse zum Andrücken des Druckdeckels verwendet würde, wie es beispielsweise bei den kommerziell erhältlichen „Positive pressure processors“ gelöst wird.

Phase 3: Einbettung in die Analytik

Gemäß Projektplanung wurde der gebaute Funktionsdemonstrator im Rahmen der von der Uniklinik durchgeführten Kohortenstudie eingesetzt, um die manuelle mit der automatisierten Probenaufbereitung zu vergleichen. Hierfür wurde die Probenaufbereitung für 96 Proben der Studie doppelt durchgeführt: manuell in der Uniklinik sowie mit Hilfe des Funktionsdemonstrators am Imtek. Anschließend wurde mit dem Output der Probenaufbereitung, der extrahierten miRNA, wie folgt fortgefahren: 1.) Bestimmung der miRNA-Konzentration mit dem Qubit von Invitrogen (Output manuell: i.d. Uniklinik, Output automatisiert: am Imtek), 2.) Durchführung der RT (Output manuell: i.d. Uniklinik, Output automatisiert: am Imtek) und 3.) Durchführung der PCR zur Bestimmung der jeweiligen Expressionslevels (beides i.d. Uniklinik).

Die Proben wurden mit dem Funktionsdemonstrator wie in Abbildung 5 dargestellt automatisiert prozessiert. Aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Problematik des Druckdeckels, verlängerten sich die Transferzeiten der Filtrationsschritte im Vergleich zum manuellen Prozess (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich der Transferzeiten bei manueller und automatisierter Probenaufbereitung

Transferzeit	Soll/ Manuell	Ist/ Automatisiert
Urin	10 min	20 min
PBS	30 sec	10 min
Lysepuffer	5 sec	5 min
Lysat + Ethanol	4 min	15 min
Waschpuffer 1	2 min	10 min
Waschpuffer 2	4 min	15 min
Elutionspuffer	1 min	1 min
Summe	~ 22 min	1h 16 min

ABBILDUNG 11 zeigt die miRNA-Ausbeute der 96 automatisiert prozessierten Proben, die mit Hilfe des Geräts Qiagen Qbit gemäß Bedienungsanleitung bestimmt wurde. Für alle Proben ohne Wert lag die Konzentration unterhalb der Detektionsschwelle des Qubits von 0,25 ng/µL.

Für die RT wurde eine miRNA-Menge von 10 ng bei einem RT-Gesamtvolumen von 25 µL festgelegt. Abzüglich der benötigten Volumina der RT-Reagenzien, verblieb ein Volumen von 16,75 µL für die extrahierte miRNA. Dies bedeutete im Umkehrschluss, dass eine Konzentration der extrahierten miRNA < 0,6 ng/µL nicht für die Durchführung einer RT ausreichte. Dieser Schwellenwert ist in ABBILDUNG 11 durch die rote gestrichelte Linie gekennzeichnet. In Summe konnten demnach aus 26 Proben ausreichend miRNA automatisiert extrahiert werden. In einem Fall war das Elutionsvolumen jedoch geringer, als für die RT benötigt, daher konnte mit dieser extrahierten miRNA trotz ausreichendem Konzentrationswert nicht fortgefahren werden (orange markiert in ABBILDUNG 11).

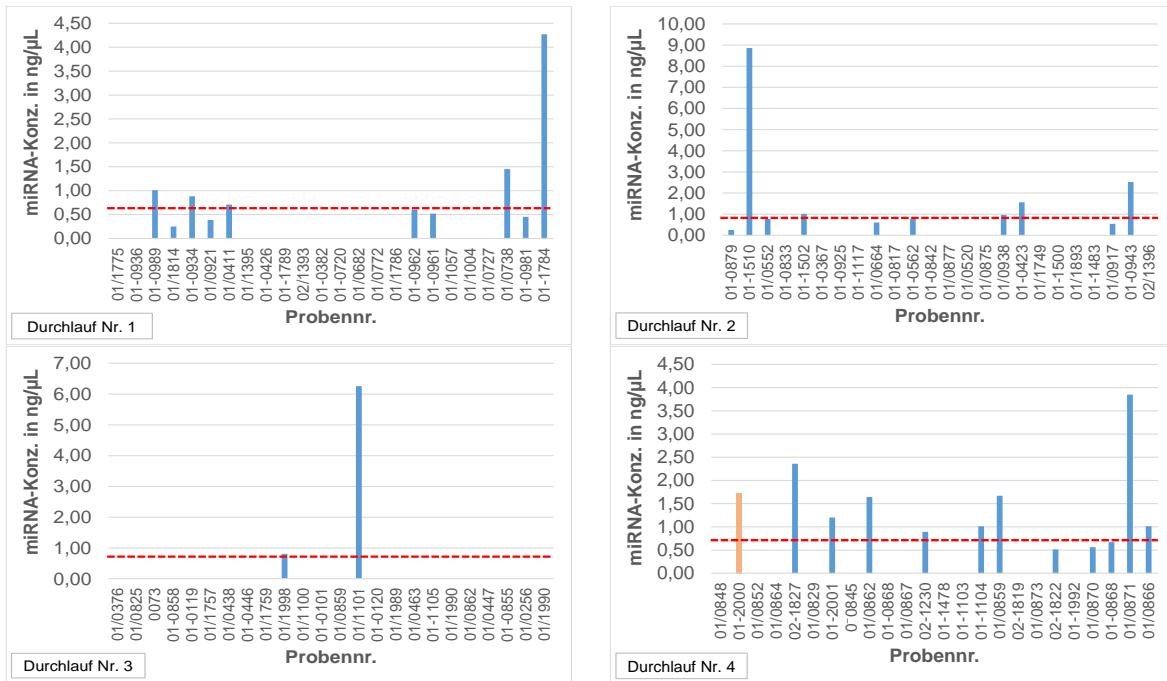


ABBILDUNG 11: miRNA-AUSBEUTE IN NG/µL AUS DEN 96 PROBEN, DIE MIT DEM FUNKTIONSDEMONSTRATOR PROZESSIERT WURDEN. DIE ROTE LINIE KENNZEICHNET DEN MINDESTWERT DER miRNA-KONZENTRATION VON 0,6 NG/µL, DER FÜR DIE ANSCHLIEßENDE DURCHFÜHRUNG DER RT BENÖTIKT WURDE. IN ORANGE GEKENNZEICHNET: PROBEN, FÜR DIE DAS AUSGEGBENE ELUTIONSVOLUMEN GERINGER AUSFIEL, ALS FÜR DIE RT BENÖTIKT. Für alle Proben ohne Wert lag die Konzentration unterhalb der Detektionsschwelle des Qubits von 0,25 ng/µL.

Ausblick

Zusammengefasst konnte die manuelle Probenaufbereitung des Mammacheck-Tests erfolgreich automatisiert werden und verspricht trotz einer aktuellen Verlangsamung des Prozesses pro Probe einen Gesamtdurchsatz von 100 Proben pro Tag aufgrund von Parallelisierung.

Allerdings konnten von nur knapp 30% der Proben ausreichend miRNA automatisiert extrahiert werden. Die zwei Hauptgründe hierfür lassen sich klar definieren und wurden im Bericht eingehend dargestellt: 1.) Ungenauigkeit des Dispensiermoduls als auch 2.) Verlangsamte Filtration aufgrund von Entweichen des Luftdrucks. An Punkt 2.) schließt sich an, dass die Filter durch den abgeschwächten Luftdruck ungenügend entleert bzw. getrocknet werden und sich Flüssigkeitsreste in nachfolgende Filtrationsschritte verschleppen. Grundsätzlich lässt sich jedoch sagen, dass die beschriebenen Probleme mit den Erfahrungen und Wissenszuwachs während des Projekts zukünftig gelöst werden könnten.

Die Thematik Probenaufbereitung ist ein Schlüsselthema in der Laborautomatisierung. Jeder Analysemethode basierend auf Patientenproben ist die Probenaufbereitung vorangestellt. Diese macht im gesamten diagnostischen Prozess 25% des Zeitaufwandes aus, die eigentliche Analysemethode hingegen 10% [1]. Während für diverse Analysemethoden etablierte Automatisierungslösungen auf dem Markt existieren, so fehlen diese für die ihr vorangeschaltete Probenaufbereitung [2]. Vorteile einer Automatisierung der Probenaufbereitung sind neben der höheren Produktivität der Labore, sowie der Steigerung der Qualität und Sicherheit, vor allem auch die reduzierte Zeit zwischen Probenabgabe bis zum Laborergebnis [3]. Der Bedarf an Geräten für die automatisierte Probenaufbereitung ist demnach groß. Im Rahmen des Mammacheck-Projekts konnte mit dem Funktionsdemonstrator eine mögliche Automatisierungslösung erprobt werden und Erfahrungen sowie Verbesserungspotenzial für Zukunftsentwicklungen gesammelt werden.

Das Konzept des Funktionsdemonstrators mit einem Sechsachsroboter als Hauptaktuator entspricht einem sehr flexiblen Lösungsansatz, da die Roboterpfade und Greifprozesse beliebig programmiert werden können. So kann der Funktionsdemonstrator zukünftig an beliebig weitere Probenaufbereitungsprozesse basierend auf luftdruckgetriebener Filtration angepasst werden.

Literatur

- [1] MVZ Labor Krone GbR, „Präanalytik Allgemein,“ [Online]. Available: <https://www.laborkrone.de/fuer-aerzte/praeanalytik/#1449651831061-561fed09-3f248496-1747>. [Zugriff am 16. 05. 2022].
- [2] De Capitani, D., Marocchi, A., Tollio, T., „Automation of the Pre-Analytical Phase: A Performance Evaluation of Alternative Scenarios,“ 2002.
- [3] Zaninotto, M., Plebani, M., „The “hospital central laboratory”: automation, integration and clinical usefulness,“ Bd. 48, 2010.