

Abschlussbericht

| | |
|-------------------------|--|
| Zuwendungsempfänger: | Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg / Medizinische Fakultät Heidelberg |
| Projektleiter: | PD Dr.rer.nat. Beate Niesler |
| Projekttitel: | Role of CD40L signaling in hyperlipidemia induced endothelial dysfunction and lipid metabolism |
| Förderkennzeichen: | 81X2500116 |
| Laufzeit des Projektes: | 01.08.2014 – 31.03.2015 |

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Im beantragten Säule B Projekt sollte die Rolle des CD40L für die Entstehung der Gefäßdysfunktion und des oxidativen Stress in einem Mausmodell der durch fettreiche Ernährung induzierten Hyperlipidämie untersucht werden. Speziell sollten Expressionsanalysen von Genen durchgeführt werden, die an der Pathogenese dieser kardiovaskulären hyperlipidämischen Komplikationen beteiligt sind (z.B. Entzündungsmediatoren, Quellen für reaktive Sauerstoffspezies, Schlüsselenzyme der Thrombose und Hämostase). Hierzu wurden in Mainz Mäuse nach fettreicher Ernährung aufgearbeitet und aus deren Aortengewebe (hier Gefrierschnitte) RNA für RT-PCR Untersuchungen in Mainz sowie nCounter (nanoString) Analysen bei PD. Dr. Niesler in Heidelberg isoliert (Isolierung durch Dr. Hausding in Mainz nach Optimierung in Zusammenarbeit mit dem Team in Heidelberg). Mit den nCounter Analysen können ganze Gensätze in einer Messung vergleichbar quantifiziert werden. Um die klinische Relevanz der Studie zu steigern, wurden von einem weiteren Projektpartner (PD Dr. Knosalla, Berlin) humane Gefäßgewebe-Proben aus einer Biobank zur Verfügung gestellt (20x BMI>30, 20x BMI<20). Aus diesen humanen Gefäßgewebe-Proben wurde in Mainz von Dr. Hausding die RNA für nCounter Analysen in Heidelberg ebenso nach Optimierung in Zusammenarbeit mit dem Team in Heidelberg isoliert. Ziel des vorliegenden Projekts war die Identifizierung von Genen (z.B. Entzündungsmediatoren, Quellen für reaktive Sauerstoffspezies, Schlüsselenzyme der Thrombose und Hämostase), die in hyperlipidämischen Mäusen und Patienten gleichermaßen reguliert werden und mit der CD40L vermittelten Signaltransduktion assoziiert sind. Die Rolle des CD40L in den Patientenproben wurde anhand eines CD40L ELISA untersucht (Dr. Hausding, Mainz), in den Mäusen anhand der positiven Effekte einer CD40L Defizienz (CD40L^{-/-} Mäuse).

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In der Säule B der Kooperativen Initiativen des DZHK wurden auch in 2014 die Zusammenarbeit zwischen den einzelnen Standorten sowie der Austausch von Expertisen und Technologien durch eine Experimentelle Pipeline gefördert (siehe hierzu auch die Handreichung Säule B vom 29.01.2014 sowie den Gesamtantrag des DZHK vom 01.03.2011). Mit der Experimentellen Pipeline wurden im Berichtszeitraum ausgezeichnete

wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners den DZHK-Partnern an anderen Standorten in Kooperationen zur Verfügung gestellt. Das vorliegende Kooperationsprojekt wurde im Rahmen der Säule B der Kooperativen Initiativen des DZHK zwischen den Standorten Mainz, Berlin und Heidelberg bewilligt.

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns war in Mainz eine tierexperimentelle Studie in Mäusen nach fettreicher Ernährung (Wildtyp versus CD40L^{-/-} Mäuse) abgeschlossen (Prof. Daiber, Dr. Hausding). Es lagen bereits Daten zur Gefäßdysfunktion, kardiovaskulärem oxidativen Stress, Aktivierung der inflammatorischen und atherothrombotischen Signalwege vor (Prof. Daiber, Dr. Hausding). Die RNA-Isolierungsmethode konnte im Rahmen der Projektlaufzeit in Zusammenarbeit mit dem Team in Heidelberg optimiert werden und die nCounter Analyse-Plattform war in Heidelberg etabliert (PD Dr. Niesler). Die Biobank mit humanen Gefäßgewebe-Proben war in Berlin etabliert (PD Dr. Knosalla). Alle für das Projekt notwendigen Messverfahren waren etabliert.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt und der Ablauf des Vorhabens wurde von Prof. Daiber / Dr. Hausding (Mainz) mit den Projektpartnern PD Dr. Niesler (Heidelberg) und PD Dr. Knosalla (Berlin) geplant und konnte gemäß Arbeitsplan begonnen werden. Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Projektleitern und Projektbesprechungen waren durch mehrere Telefonate und zahlreichen Schriftwechseln per Email zwischen den DZHK-Partnerstandorten gegeben. Die humanen Proben wurden fristgerecht vom Projektpartner in Berlin zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der RNA aus den humanen Gewebeproben und Bestimmung der CD40L Spiegel in humanen Plasmaproben konnten in Mainz zügig durchgeführt werden – es war jeweils großzügig ausreichendes Material vorhanden. Die Isolierung der RNA aus den Paraffin-eingebetteten Gefrierschnitten der Mauseorta gestaltete sich schwierig, da sowohl die Menge als auch die Qualität (Reinheit) der RNA den Anforderungen einer nCounter-Analyse nicht genügten. Aufgrund dieser Hürde und der weihnachtlichen Urlaubszeit hat sich der Zeitablauf um ca. 2 Monate verzögert, zu diesem Zweck wurde eine kostenneutrale Verlängerung bis 31.03.2015 beantragt und bewilligt. Leider genügten diverse in Mainz von Dr. Hausding generierte Proben aus dem ersten Versand nicht den Anforderungen und mussten nochmals neu generiert werden. Nachdem die neu generierten RNA Proben in Heidelberg nochmals zwecks Quantität und Qualität mittels Agilent Bioanalyzer untersucht wurden, konnte mit der eigentlichen nCounter Analyse begonnen werden. Mittels nCounter Analyse wurden etwa 10 potentielle Gene (aus dem Funktionsfeld Entzündungsmediatoren, Quellen für reaktive Sauerstoffspezies, Schlüsselenzyme der Thrombose und Hämostase) in den humanen Proben aus der Bio-Bank in Berlin identifiziert, die in Mäusen und Patienten bei Übergewicht gleichermaßen reguliert werden. 4 davon konnten mittels RT-PCR Messung bestätigt werden (Nox1, Nox4, ICAM, VCAM). Leider waren die Möglichkeiten einer genaueren bzw. weitergehenden Analyse aufgrund des limitierten menschlichen Gewebes eingeschränkt. Die nCounter Analyse blieb hinter den Erwartungen zurück, vermutlich aufgrund nicht optimal designter Primer für die einzelnen Gene. Insgesamt kann das Kooperationsprojekt als erfolgreich abgeschlossen angesehen werden. Es wird in Kürze ein Manuskript zur Studie erstellt.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung

des Vorhabens benutzt wurden, Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Angeknüpft wurde bei unseren Studien an die in Mainz erhobenen Ergebnisse aus dem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem Centrum für Thrombose und Hämostase geförderten Projekt „Wechselwirkung zwischen dendritischen Zellen und Plättchen – aktivierende Signalwege und ihre Bedeutung für die Endothelzell-Aktivierung, Atherosklerose und Thrombose“ (BMBF 01EO1003; CTH-IRB-A3; 10/2010-10/2012). Die Ergebnisse aus diesem Projekt wurden vor kurzem veröffentlicht (Steven und Hausding et al. Basic Research in Cardiology 2015 ¹). Desweiteren wurde auf die Fachliteratur von Prof. Esther Lutgens zurückgegriffen (siehe Literaturliste am Ende ²⁻⁸).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Im Projekt wurde intensiv zwischen den Projektpartnern Prof. Dr. Wild/Prof. Dr. Daiber (Mainz), PD Dr. Niesler (Heidelberg) und PD Dr. Knosalla (Berlin) kooperiert. Weiterhin floss die Expertise von PD Dr. Christian Becker in das Projekt ein.

II. Eingehende Darstellung zu

1. der Verwendung der Zuwendung und den erzielten wissenschaftlich-techn. Ergebnissen im Einzelnen, mit Gegenüberstellung zu den ursprünglichen Zielen:

nCounter

Erhöhte CD40L Spiegel konnten im Plasma von übergewichtigen Patienten (BMI>30) mittels ELISA nachgewiesen werden. RNA konnte aus dem überwiegenden Anteil der humanen Proben in ausreichender Menge und Qualität für die nCounter Analysen isoliert werden. Die RNA Isolierung aus den Gefrierschnitten aus Paraffin-eingebetteten Mausearten lieferte keine ausreichende Quantität und Qualität für die nCounter Analysen. Einige wenige Mausproben können erneut generiert werden.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

In Heidelberg wurde von 09/2014 bis 12/2014 eine technische Assistentin, Frau Heike Kuzan, mit 20 Stunden pro Monat finanziert (ca. 1.200 €). Frau Kuzan wickelte alle mit dem kollaborativen Projekt in Zusammenhang stehenden Arbeitsvorgänge ab: Bestellung der nCounter Elements-Tagsets für die durchzuführende nCounter-Analysen sowie der Bioanalyzer Chips für die Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Proben und des nCounter Masterkits, die zur Durchführung des Projektes notwendigen abgerechneten Sachmittel und der Aufarbeitung und Archivierung der RNA-Proben im Rahmen der Qualitätskontrolle; Des Weiteren die enge Rücksprache mit PD Dr. Beate Niesler und Dr. Hausding im Rahmen des Optimierungsprozesses der RNA-Analysen, sowie der aktuellen Messung der Proben. Alle bestellten Verbrauchsmittel wurden entsprechend der Vorgaben verwendet (Sachmittel ca. 4.500 €).

In Mainz wurden die Personalmittel wurden zur Teilfinanzierung der Stelle von Dr. Hausding verwendet, der für 4 Monate zu 30% im Projekt tätig war. Die in Mainz zur Verfügung stehenden Mittel wurden vollumfänglich verausgabt. Die Mainzer Projektmittel für

Verbrauchsmaterial wurden überwiegend für ELISA Kits, RNA Isolierungs-Kits sowie Primer für die abschließenden RT-PCR Untersuchungen verausgabt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die hier durchgeführten Analysen tragen maßgeblich zur Aufwertung des bestehenden Datensatzes „CD40L und Hyperlipidämie in Mäusen“ bei. Vor allem die Einbeziehung vergleichbarer Parameter in humanen Proben trägt neben der Einbeziehung der nCounter Analysen (die die Analyse zahlreicher Gene bei besserer Vergleichbarkeit in einem Probensatz ermöglichen) maßgeblich zu dieser Aufwertung bei. Neben dem Wissensgewinn für die Behandlung hyperlipidämischer Patienten erhoffen wir uns eine hochkarätige Publikation der Daten in einem der Top 10% kardiovaskulären Journale mit den DZHK Projektpartnern Prof. Daiber, PD Dr. Niesler und PD Dr. Knosalla als Co-Autoren unter Nennung der DZHK Förderung. Die eingesetzten Geldmittel zum Erreichen dieser Ziele sind angemessen und sogar als gering einzuschätzen, wenn man sie mit den Fördersummen für andere Projekte (DFG, BMBF, EU) vergleicht.

4. dem voraussichtlichen Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans mit Zeithorizont:

Im Rahmen dieses Säule B Projekts konnte eine Rolle des CD40L für die Entstehung der vaskulären Dysfunktion, des kardiovaskulären oxidativen Stress und der Aktivierung von Entzündungsmediatoren, atherothrombotischen Wegen und Quellen für oxidativen Stress im Mausmodell nachgewiesen werden (Wildtyp versus CD40L^{-/-} Mäuse unter fettreicher Ernährung). Interessant ist hier vor allem die weit geringere Gewichtszunahme der CD40L^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen unter fettreicher Ernährung. Die Korrelation zur humanen Situation (BMI>30 versus BMI<20 Patienten) konnte leider noch nicht vollständig hergestellt werden – bislang nur CD40L ELISA Befunde aus Plasma, nCounter Expressionsanalysen wurden verzögert. Leider kann das Targeting der CD40L Signaltransduktion nicht in eine Erfindung bzw. ein Patent umgesetzt werden, da dies über eine bestehende, sehr breit beschriebene Patentschrift verhindert wird. Die gemeinsamen Projektergebnisse werden zeitnah in Manuskriptform gefasst und bis spätestens Ende 2015 zur Publikation eingereicht.

5. dem während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

Einige für das Projekt relevante Befunde hinsichtlich der Bedeutung des CD40L für die Entstehung der Atherosklerose, generell von Entzündungsmechanismen und Komplikationen der Hyperlipidämie sowie des Übergewichts wurden in den vergangenen Monaten unter anderem von der Gruppe von Frau Prof. Esther Lutgens beleuchtet (siehe Literaturliste im Anhang), allerdings nie mit Fokus auf die Gefäßfunktion und den oxidativen Stress, wodurch das vorliegende Projekt nach wie vor ausreichend neue Erkenntnisse liefert.

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Wenn zur Wahrung berechtigter Interessen Ihrer Partnerinstitution oder Dritter oder aus anderen sachlichen Gesichtspunkten bestimmte Einzelheiten aus dem Bericht vertraulich zu behandeln sind (z.B. zur Wahrung der Priorität bei Schutzrechtsanmeldungen), so haben Sie ausdrücklich darauf hinzuweisen.

Sebastian Steven 1,2*, Michael Hausding1*, Mobin Dib1, Fatemeh Kashani1, Steffen Daub1, Swenja Kröller-Schön1, Matthias Oelze1, Siyer Roohani1, Hartmut Kleinert3, Eberhard Schulz1, Christian Becker4, Karl J. Lackner5, Christoph Knosalla6, Beate Niesler7, Thomas Münzel1, and Andreas Daiber1¶. CD40L deficiency in hyperlipidemia reduces vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. In Vorbereitung – auf diesem Hintergrund muss der Bericht vertraulich behandelt werden.

Eventuelle Schutzrechte werden nach Abschluss der Studien nochmals von unserem IP Office geprüft – auch auf diesem Hintergrund muss der Bericht vertraulich behandelt werden.

Verwendete Literatur

1. Steven S, Hausding M, Kroller-Schon S, Mader M, Mikhed Y, Stamm P, Zinssius E, Pfeffer A, Welschof P, Agdauletova S, Sudowe S, Li H, Oelze M, Schulz E, Klein T, Munzel T, Daiber A. Gliptin and glp-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Res Cardiol.* 2015;110:465
2. Donners MM, Beckers L, Lievens D, Munnix I, Heemskerk J, Janssen BJ, Wijnands E, Cleutjens J, Zerneck A, Weber C, Ahonen CL, Benbow U, Newby AC, Noelle RJ, Daemen MJ, Lutgens E. The cd40-traf6 axis is the key regulator of the cd40/cd40l system in neointima formation and arterial remodeling. *Blood.* 2008;111:4596-4604
3. Lievens D, Zerneck A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, Wijnands E, Goossens P, van Kruchten R, Thevissen L, Boon L, Flavell RA, Noelle RJ, Gerdes N, Biessen EA, Daemen MJ, Heemskerk JW, Weber C, Lutgens E. Platelet cd40l mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood.* 2010;116:4317-4327
4. Lutgens E. Cd40-cd40l: A janus-faced interaction. *Thromb Haemost.* 2014;112:223
5. Poggi M, Engel D, Christ A, Beckers L, Wijnands E, Boon L, Driessen A, Cleutjens J, Weber C, Gerdes N, Lutgens E. Cd40l deficiency ameliorates adipose tissue inflammation and metabolic manifestations of obesity in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2251-2260
6. Seijkens T, Kusters P, Engel D, Lutgens E. Cd40-cd40l: Linking pancreatic, adipose tissue and vascular inflammation in type 2 diabetes and its complications. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease.* 2012
7. Seijkens T, Kusters P, Engel D, Lutgens E. Cd40-cd40l: Linking pancreatic, adipose tissue and vascular inflammation in type 2 diabetes and its complications. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease.* 2013;10:115-122
8. Winkels H, Weber C, Lutgens E, Gerdes N. Atherosclerosis: Cell biology and lipoproteins focus on inkt cells and cd40/cd40l in atherosclerosis and metabolic disorders. *Current opinion in lipidology.* 2014;25:408-409

Berichtsblatt

| | |
|---|--|
| 1. ISBN oder ISSN - | 2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht |
| 3. Titel Role of CD40L signaling in hyperlipidemia induced endothelial dysfunction and lipid metabolism | |
| 4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] (a) Philipp Wild und Andreas Daiber (b) Beate Niesler (c) Christoph Knosalla | 5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.3.2015 6. Veröffentlichungsdatum - 7. Form der Publikation - |
| 8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) (a) Johannes Gutenberg University Mainz, Department of Medicine 2, University Medical Center Mainz, Langenbeckstr. 1, 55131 Mainz (b) Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Humangenetik, Abteilung Molekulare Humangenetik, Im Neuenheimer Feld 366, 69120 Heidelberg (c) Deutsches Herzzentrum Berlin, Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin | 9. Ber. Nr. Durchführende Institution - 10. Förderkennzeichen FKZ 81X2500116 11. Seitenzahl 5 |
| 12. Fördernde Institution (Name, Adresse) 1. Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Hannoversche Straße 28-30 10115 Berlin 2. Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg Königstraße 46 70173 Stuttgart | 13. Literaturangaben 8 14. Tabellen keine 15. Abbildungen keine |
| 16. Zusätzliche Angaben - | |
| 17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) - | |
| 18. Kurzfassung Im beantragten Säule B Projekt sollte die Rolle des CD40L für die Entstehung der Gefäßdysfunktion und des oxidativen Stress in einem Mausmodell der durch fettreiche Ernährung induzierten Hyperlipidämie untersucht werden. Speziell sollten Expressionsanalysen von Genen durchgeführt werden, die an der Pathogenese dieser kardiovaskulären hyperlipidämischen Komplikationen beteiligt sind (z.B. Entzündungsmediatoren, Quellen für reaktive Sauerstoffspezies, Schlüsselenzyme der Thrombose und Hämostase). Hierzu wurden in Mainz Mäuse nach fettreicher Ernährung aufgearbeitet und aus deren Aortengewebe (hier Gefrierschnitte) RNA für RT-PCR Untersuchungen in Mainz sowie nCounter (nanoString) Analysen bei PD. Dr. Niesler in Heidelberg isoliert (Isolierung durch Dr. Hausding in Mainz). Mit den nCounter Analysen können bis zu 800 Zielgene simultan in einer Messung vergleichbar quantifiziert werden. Um die klinische Relevanz der Studie zu steigern wurden von einem weiteren Projektpartner (PD Dr. Knosalla, Berlin) humane Gefäßgewebe-Proben aus einer Biobank zur Verfügung gestellt (20x BMI>30, 20x BMI<20). Aus diesen humanen Gefäßgewebe-Proben wurde in Mainz von Dr. Hausding die RNA für nCounter Analysen in Heidelberg isoliert. Ziel des vorliegenden Projekts war die Identifizierung von Genen (z.B. Entzündungsmediatoren, Quellen für reaktive Sauerstoffspezies, Schlüsselenzyme der Thrombose und Hämostase), die in hyperlipidämischen Mäusen und Patienten gleichermaßen reguliert werden und mit der CD40L vermittelten Signaltransduktion assoziiert sind. Die Rolle des CD40L in den Patientenproben wurde anhand eines CD40L ELISA untersucht (Dr. Hausding, Mainz), in den Mäusen anhand der positiven Effekte einer CD40L Defizienz (CD40L ^{-/-} Mäuse). Mittels nCounter Analyse wurden etwa 10 potentielle Gene (aus dem Funktionsfeld Entzündungsmediatoren, Quellen für reaktive Sauerstoffspezies, Schlüsselenzyme der Thrombose und Hämostase) in den humanen Proben aus der Bio-Bank in Berlin identifiziert, die in Mäusen und Patienten bei Übergewicht gleichermaßen reguliert werden. 4 Davon konnten mittels RT-PCR Messung bestätigt werden (Nox1, Nox4, ICAM, VCAM). Leider waren die Möglichkeiten einer genaueren bzw. weitergehenden Analyse aufgrund des limitierten menschlichen Gewebes eingeschränkt. Die nCounter Analyse blieb hinter den Erwartungen zurück, vermutlich aufgrund nicht optimal designter Primer für die einzelnen Gene. Insgesamt kann das Kooperationsprojekt als erfolgreich abgeschlossen angesehen werden. Es wird in Kürze ein Manuskript zur Studie erstellt. | |
| 19. Schlagwörter CD40L, Hyperlipidämie, endotheliale Dysfunktion, fettreiche Ernährung, oxidativer Stress | |
| 20. Verlag - | 21. Preis - |