

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung

Projektleiter*in: Frau Dr. Mridula Balakrishnan

Projekttitle: Sympathetic reinnervation during zebrafish heart regeneration

Förderkennzeichen: 81X3200312

Laufzeit des Projektes: 01.04.2022 – 30.09.2023

Kurzbericht zu:

Der Kurzbericht (max. 2 Seiten) soll in allgemein verständlicher Form das Vorhaben darstellen und folgende Angaben umfassen:

1. der ursprünglichen Aufgabenstellung

Die Rolle der sympathischen Nerven während der Herzregeneration ist nicht gut verstanden. In dieser Studie wollen wir die Rolle der Nerven während der Herzregeneration beim Zebrafisch verstehen, indem wir 1) die Reaktion des Sympathikus auf Herzverletzungen charakterisieren und 2) die Folgen der Ablation des Sympathikus auf die Proliferation der Kardiomyozyten und die Herzregeneration bestimmen.

2. dem wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Die Rolle der Sympathikusnerven bei der Regulierung der Herzfrequenz und der Erregungsleitgeschwindigkeit ist gut bekannt. Die Rolle der sympathischen Nerven während der Herzregeneration ist jedoch noch unbekannt. Anhand des hochregenerativen Zebrafischherzens haben wir die Reaktion des Sympathikus während der Herzregeneration untersucht. Die Reaktion der Sympathikusnerven im Zebrafischherz wurde noch nie untersucht. Außerdem werden in den meisten Regenerationsstudien Kryoschnitte zur Untersuchung der Herzregeneration verwendet. Hier verwenden wir die Lichtblattbildgebung, die bisher noch nicht ausgiebig genutzt wurde, um die Nervenreaktion des Zebrafischherzens zu untersuchen. Unsere Studien nutzen modernste Mikroskopie, um neue wissenschaftliche Fragen zu beantworten.

3. dem Ablauf des Vorhabens

Die in Ziel 1 beschriebenen Aufgaben verliefen planmäßig, und wir konnten die Experimente innerhalb des vorgegebenen Zeitrahmens durchführen.

Bei den Experimenten im Rahmen von Ziel 2 stießen wir auf Schwierigkeiten. Während wir die Dosis und das Behandlungsprotokoll für die Nervenablation optimieren konnten, hatten wir Schwierigkeiten bei der Optimierung der für die Quantifizierung der Kardiomyozytenproliferation erforderlichen Antikörper. Der üblicherweise verwendete Antikörper war nicht lieferbar, was die Experimente verlangsamte. Außerdem hatten wir

Schwierigkeiten mit der technischen Hilfe bei der Kryosektion und der Haltung der Zebrafische. Schließlich hatten wir bei der Einzelzell-RNA-Sequenzierung an den Herzen, denen der Sympathikusnerv entfernt wurde, Schwierigkeiten mit der Probenvorbereitung. Dies führte zu weiteren Experimenten zur Optimierung und Fehlersuche an unseren Einzelzellproben. All diese Faktoren wirkten sich auf unsere Experimente in Ziel 2 aus, was zu einer kostenfreien Verlängerung führte. Am Ende des Verlängerungszeitraums waren wir in der Lage, alle in Ziel 2 vorgesehenen Experimente abzuschließen.

4. den wesentlichen Ergebnissen des Vorhabens

Die wichtigsten Ergebnisse des Projekts sind:

- 1) Nach der Kryoverletzung des Zebrafischventrikels beobachteten wir eine dramatische Reorganisation der sympathischen Nerven sowohl in den entfernten Regionen des Ventrikels.
- 2) Wir beobachteten auch das Vorhandensein von sympathischen neuronalen Zellkörpern innerhalb des verletzten Gewebes nach der Kryo-Verletzung.
- 3) Die sympathischen Soma bleiben im verletzten Gewebe bis 7 Tage nach der Kryoverletzung erhalten.
- 4) Die Ablation des Sympathikusnervs mit 6-OHDA beeinträchtigt die Proliferation der Kardiomyozyten und die Regeneration des Herzens.
- 5) Die Ablation des Sympathikusnervs induziert eine Stressreaktion im Ventrikel des Zebrafisches.

5. der Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Bei diesem Projekt habe ich mit Prof. Didier Stainier zusammengearbeitet, der eine wichtige Rolle bei der Verwaltung des Projekts, der Beschaffung zusätzlicher Mittel und wertvollen wissenschaftlichen Anregungen spielte.

15.01.2024, Bad Nauheim

Ort, Datum

Unterschrift Projektleiter*in

Dr. Mridula Balakrishnan

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger: Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung

Projektleiter*in: Frau Dr. Mridula Balakrishnan

Projekttitle: Sympathetic reinnervation during zebrafish heart regeneration

Förderkennzeichen: 81X3200312

Laufzeit des Projektes: 01.04.2022 – 30.09.2023

Eingehende Darstellung zu:

(Im Teil II sind die im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten ausführlich darzustellen, insbesondere im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung. Die Verwendung der Zuwendung sowie die erzielten Ergebnisse im Einzelnen müssen nachvollziehbar beschrieben werden)

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

Ziel 1: Bestimmung der Zeitachse der sympathischen Reinnervation während der Herzregeneration bei Zebrafischen

Wie im Antrag beschrieben, wurden die th:th-P2A-Gal4;UAS:GFP Zebrafischherzen kryoverletzt, zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, geschnitten und dann auf verschiedene neuronale Marker hin immungefärbt. Wir stellten fest, dass bis 96 hpci ein neuronales Signal in den verletzten Regionen des Zebrafischherzens vorhanden war. Wir beobachteten sympathische neuronale Signale speziell im verletzten Gewebe.

Zusätzlich wurden die Herzen von th:th-P2A-Gal4;UAS:GFP-Zebrafischen kryoverletzt, extrahiert und dann mit Hilfe der Lightsheet-Mikroskopie abgebildet. Bis 96 hpci beobachteten wir einen dramatischen Umbau der Architektur des sympathischen Nervs sowohl in den entfernten als auch in den Randzonen des verletzten Herzens. Außerdem konnten wir das Vorhandensein von neuronalen Zellkörpern und Ganglien sowohl im verletzten Gewebe als auch in den entfernten Regionen des Herzens beobachten. Insgesamt haben unsere Ergebnisse eine neuartige Reaktion der Nerven auf eine Verletzung aufgezeigt.

Ziel 2: Untersuchung der Rolle(n) der sympathischen Neuronen bei der Regeneration von Kardiomyozyten und des Herzens

Unter Verwendung von 6-OHDA und der th:th-P2A-Gal4;UAS:GFP-Zebrafisch-Linie haben wir festgestellt, dass 20mM 6-OHDA, verabreicht durch i.p. Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen, erforderlich sind, um die sympathischen Nerven im Ventrikel des Zebrafisches abzutöten.

Unter Verwendung von 20mM 6-OHDA und der th:th-P2A-Gal4;UAS:GFP Zebrafischlinie konnten wir feststellen, dass die Ablation der sympathischen Nerven bis 7 dpci die Kardiomyozytenproliferation beeinträchtigt. Darüber hinaus beeinträchtigt die 6-OHDA-vermittelte Ablation des Sympathikusnervs die Herzregeneration. Anschließend führten wir eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung an den Herzen mit ablatiertem Sympathikusnerv und an den Kontrollherzen durch und stellten fest, dass in den ablatierten Herzen vermehrt Stressrepositionsgene vorkommen.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Insgesamt wurden 63.000 € ausgegeben. Die tatsächliche Mittelverwendung wich von der geplanten Mittelverwendung ab. Der Grund dafür ist, dass im Lauf des Projektes klar wurde, dass zusätzlich zu der Arbeit der studentischen Hilfskraft mehr Expertise für bestimmte Aktivitäten wie Zebrafischhaltung, Kryozerlegung und Erzeugung von Zebrafischlinien benötigt war. Nach Umwidmung eines Budgetteils bestehend aus Personal-, Reisekosten und Verbrauchsmaterialien, welcher durch kurzfristig verfügbare andere Mittel finanziert wurde, wurde eine Technische Assistenz im Vollzeit für 6 Monate eingestellt.

Die Mittel wurden wie folgt eingesetzt:

- 24.453,39 € Personalkosten für eine technische Assistenz, welche die folgenden Tätigkeiten übernahm Zebrafischhaltung, Kryozerlegung und Erzeugung von Zebrafischlinien.
- 7.712,00 € Personalkosten für eine Studentische Hilfskraft im Durchschnitt wöchentlich 12 Stunden. Dieses Personal hatte die folgende Tätigkeiten für die Zebrafischhaltung, das Klonen, die PCR-Genotypisierung, die Kryosektion und die Bildgebung zuständig.
- 7.143,62€ für die Teilnahme an die folgenden Konferenzen:

2022:

- 12.05.-14.05.2022 Weinstein Meeting in Marseille (Frankreich)
- 26.09.-30.09.2022 EMBO Workshop „The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair” in Barcelona (Spanien)

2023:

- 27.05.-06.06.2023 Konferenz “Neurotrophic mechanisms in health and disease” in Newport (USA)
 - 09.07.-16.07.2023 12th European zebrafisch meeting in Krakow (Polen)
 - 03.09.-06.09.2023 international Society for regenerative biology meeting in Wien (Österreich)
- 23.690,99 € für Verbrauchsmaterialien

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Im Lauf des Projektes traten zwei Problemen auf. Der erst war, dass die Gewinnung einer studentischen Hilfe für wöchentliche 20 Stunden sich als nicht möglich erweist. Der Student konnte nur mit Unterbrechungen bis 12 Stunden wöchentlich arbeiten. Das zweite Problem war Schwierigkeiten mit dem RNA-Sequenzierungsprotokoll und der Qualitätskontrolle unserer Proben. Wir benötigten 6 Monate, um ein RNA-Sequenzierungsprotokoll zu erstellen, das für unser Experiment verwendet werden kann. Entsprechend wurde das Ziel 2 erheblich verzögert. Trotz allem waren die durchgeführten Forschungsarbeiten sowie die dafür aufgewandten Ressourcen notwendig und angemessen. Die im Projektantrag beschriebenen Ziele wurden erreicht.

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

Die im Rahmen dieser Förderung gewonnenen Daten werden in einem Manuskript veröffentlicht, das derzeit in Vorbereitung ist. Wir planen, dieses Manuskript bis Ende 2024 zu veröffentlichen. Darüber hinaus habe ich mich im Juni 2023 für ein Postdoc-Startup-Stipendium des Cardiopulmonary Institute (CPI) beworben und dabei die Daten verwendet, die im Rahmen des DZHK-Stipendiums gewonnen wurden. Das CPI-Stipendium wurde für einen Zeitraum von 2 Jahren gewährt und beläuft sich auf insgesamt 140.000 EUROS. Der Nutzen der DZHK-Förderung besteht darin, dass ich meine akademische Karriere vorantreiben konnte, indem ich gezeigt habe, dass ich in der Lage bin, eigenständig Fördermittel zu akquirieren und zu verwalten. Darüber hinaus hat diese Arbeit zum Aufbau neuer Kooperationen mit anderen Gruppen innerhalb des DZHK geführt, wodurch mein wissenschaftliches Netzwerk gestärkt wurde. Wir haben eine Zusammenarbeit mit Prof. Jan Huskien an der Universität Göttingen begonnen, um unsere Lichtblattmikroskopie zu erweitern. Diese Zusammenarbeit wird zu einer Verbesserung unserer Lichtblattmikroskopie-Bilder führen. Zu unseren langfristigen Zielen gehört es, die Entdeckungen im Zebrafisch auf den Menschen zu übertragen.

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

Es sind von dritter Seite keine Ergebnisse bekannt geworden, die wesentlichen Einfluss auf die Verwertung der Ergebnisse nehmen

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Die Ergebnisse des Projektes wurden in 2022 und 2023 mehrfach auf internationale Konferenzen vorgestellt.

2022:

- 12.05.-14.05.2022 Weinstein Meeting in Marseille (Frankreich)

Posterpräsentation zum Thema: „Role of sympathetic reinnervation during zebrafish cardiac regeneration“

- 26.09.-30.09.2022 EMBO Workshop „The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair“ in Barcelona (Spanien)

Posterpresentation zum Thema: „Role of sympathetic reinnervation during zebrafish cardiac regeneration“

2023:

- 27.05.-06.06.2023 Konferenz “Neurotrophic mechanisms in health and disease” in Newport (USA)

Posterpresentation zum Thema: „Role of sympathetic reinnervation during zebrafish cardiac regeneration“

- 09.07.-16.07.2023 12th European zebrafisch meeting in Krakow (Polen)

Posterpresentation zum Thema: „Role of sympathetic reinnervation during zebrafish cardiac regeneration“

- 03.09.-06.09.2023 international Society for regenerative biology meeting in Wien (Österreich)

(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)

15.01.2024, Bad Nauheim

Ort, Datum

Unterschrift Projektleiter*in
Dr. Mridula Balakrishnan