

Muster Schlussbericht zu Nr. 3.2

Zuwendungsempfänger:	Johannes- Gutenberg Universität Mainz, IPBW, Prof. Dr. Mark Helm,
Förderkennzeichen:	01EA1903
Vorhabenbezeichnung:	HEROS
Laufzeit des Vorhabens:	01.06.2019 – 31.05.2023 (incl. 12 Monate ausgabenneutraler Verlängerung)

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung,

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass mehrere nicht übertragbare Krankheiten, darunter auch Fettleibigkeit und die damit verbundenen Stoffwechselstörungen, über mehrere Generationen hinweg durch nicht genetische Mechanismen von den Eltern auf die Nachkommen vererbt werden.

In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass elterliche Umwelteinflüsse epigenetische Veränderungen in der Keimbahn hervorrufen könnten, die auf die Nachkommenschaft übertragen werden. Ätiologische Faktoren und Risikofaktoren, die zum Auftreten nicht übertragbarer Krankheiten beitragen, haben daher das Potenzial, die Entwicklung der Pathologie(n) bei den Nachkommen zu fördern.

In diesem Projekt ging es um die Übertragung von mit Fettleibigkeit assoziierten Phänotypen von fettleibigen Männern¹. Speziell ging es um die Identifizierung der für die Übertragung relevanten molekularen Spezies, insbesondere von RNA Spezies sowie deren posttranskriptionalen Modifikationen, welche die pertinente Information weitergeben könnten. Letzterer Aspekt wurde vom Arbeitskreis Helm an der JGU Mainz per LC-MS und Hochdurchsatzsequenzierung bearbeitet.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Dazu wurde RNA aus Spermien von Donoren in drei verschiedenen Situationen untersucht. Diese bestanden aus fettleibigen („obese“) Patienten vor und nach einem pertinenten operativen Eingriff, sowie einer Kontrollgruppe. Die RNA wurde per LC-MS und Hochdurchsatzsequenzierung auf verschiedene RNA Spezies und ggf. deren Quantität untersucht, sowie auf Vorhandensein und Quantität gewisser RNA Modifikationen. Von besonderem Interesse waren zunächst charakteristische

Unterschiede zwischen Fettleibigen und Kontrollgruppe, und dann zwischen Fettleibigen vor und nach operativem Eingriff, um ggf. einen reversiblen Einfluss der Fettleibigkeit auf die Eigenschaften der Spermien RNA zu charakterisieren. Der Beitrag der Arbeitsgruppe Helm bestand in der Charakterisierung der RNA Modifikationen¹.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

RNA wurde von Kooperationspartnern in Nizza und Girona¹ aus Donor-Sperma isoliert und nach Mainz geschickt. Hier wurde eine Qualitätskontrolle sowie eine Gehaltsbestimmung an RNA Modifikationen per LC-MS für die französische Kohorte (Meilenstein M1) sowie die spanische Kohorte (Meilenstein M4) durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen, wurden Hochdurchsatzsequenzierungsprotokolle ausgewählt, die spezifisch die Position solcher Modifikationen bestimmen können, die in den LC-MS Analysen auffällig waren. Die Bestimmung dieser Positionen wurde dann auf der Illumina Plattform in den Proben aus Frankreich (Meilenstein M2) sowie Spanien (M5) durchgeführt. Eine anschließende Datenverarbeitung war dazu vorgesehen, Unterschiede zwischen den verschiedenen Kohorten zu identifizieren und statistisch zu validieren (M3, M6).

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde

Grundsätzlich ist die Rolle der Spermien-RNA bei der epigenetischen Vererbung kein neues Phänomen und wurde größtenteils in experimentellen Modellen untersucht. Die Validierung beim Menschen, welche allgemein als schwierig und kompliziert gilt, war hier das zentrale Projektziel.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Es handelt sich um ein internationales Projekt, in welchem die beiden anderen Gruppen in Frankreich und Spanien Material, i.e. Nukleinsäuren aus Spermien von Donoren, isolierten und uns zur Analyse schickten. Im Laufe des Projektes wurde etabliert, dass die Sperma- roben aus Spanien aus dem Labor von José Manuel Fernández-Real (Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, Hospital of Girona, Girona, ES) zunächst nach Nizza geschickt wurden, wo im Labor von Valérie Grandjean (C3M, Inserm U1065, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, 151 route Saint Antoine de Ginestière, Nice, FR).¹

¹ Der Abschlussbericht des Gesamtkosortiums an JPI ist als Anhang beigelegt.

II. Eingehende Darstellung

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

Experimentelle Epitranskriptom-Signatur von Spermien fettleibiger Männer

Die Rekrutierung der Patienten für die französische Kohorte musste durch die Corona-Pandemie unterbrochen werden. Das gleiche gilt für die Rekrutierung der spanischen Kohorte. Dadurch konnten in den Partnerlaboren 1 und 2 zunächst noch keine RNA der Kohorten isoliert werden, deren Epitranskriptom von uns hätte analysiert und verglichen werden soll. Die Wartezeit wurde gemeinsam mit dem Partnerlabor 1 zur Methodenoptimierung der RNA-Isolierung aus Spermien genutzt. Die Isolierung von RNA aus Spermien ist anspruchsvoller als aus manch anderen Geweben, da sie nur wenig RNA enthalten und isolierte RNA oft eine hohe DNA-Kontamination aufweist. Die ersten RNA-Proben aus Spermien, die wir aus dem Partnerlabor bekamen und per LC-MS untersuchen konnten, enthielten teilweise hohe Salz- und Phenolkontaminationen (siehe Abbildung 1A). Außerdem wurden große Mengen DNA detektiert.

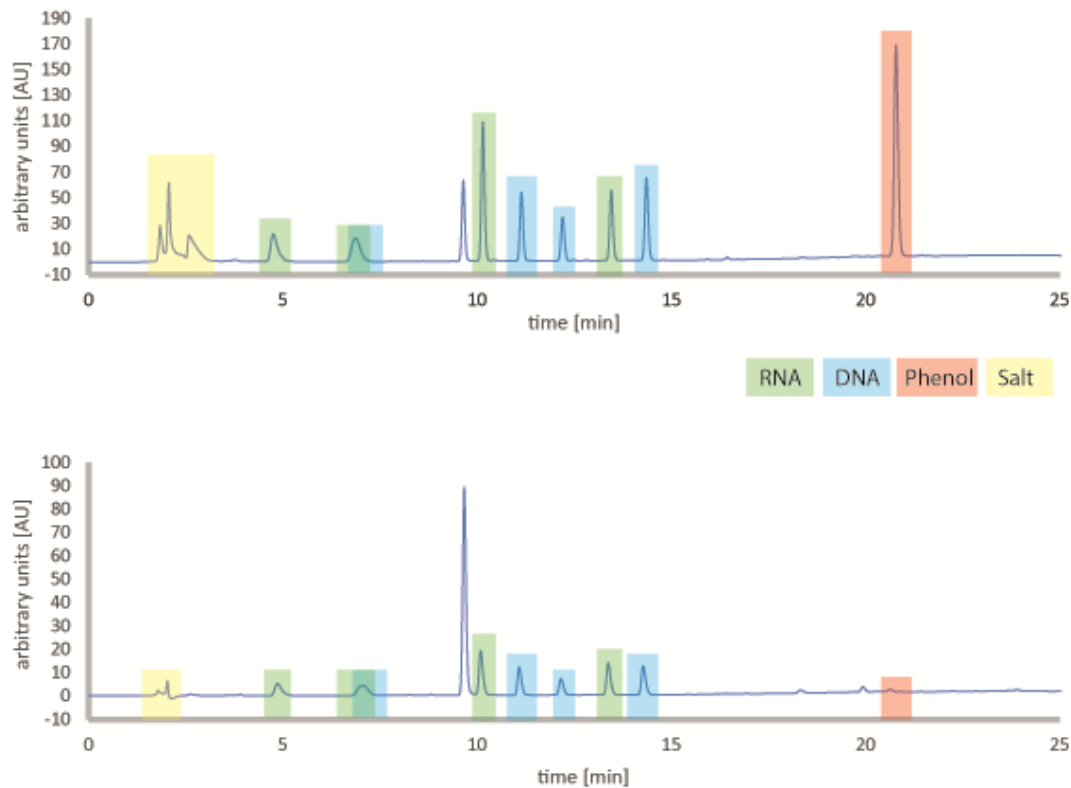


Abbildung 1: Vergleich UV-Diagramme von RNA Nucleosiden vor (oben) und nach Methodenoptimierung (unten).

Durch Modifizieren der Isolationsmethode (z.B. durch Einfügen eines zusätzlichen Chloroform-Extraktionsschrittes) auf Seiten des Partnerlabors konnte die RNA-Qualität bezüglich der Salz- und Phenolkontaminationen deutlich verbessert werden (siehe Abbildung 1B). Ein zusätzlicher DNase-Verdau durch die Partnerlabore nach der RNA-Isolation konnte bis jetzt noch keine relevante Reduzierung des DNA-Gehalts bewirken. Außerdem wurde die Salzkontamination durch Verwenden von DNase wieder deutlich erhöht. Da die DNA während der LC-MS Analyse von RNA Modifikationen keinen Einfluss auf die Messergebnisse hat, solange sie nicht deutlich im Überschuss vorhanden ist, war ihre Entfernung für eine Analyse zunächst nicht zwingend notwendig. Für die weitere Verwendung des Materials durch die Kooperationspartner (nach Analyse) war dies jedoch wichtig. Dies scheinbar triviale Problem ist deswegen von besonderer Wichtigkeit, da es im Projekt um die Übertragung von Erbinformation geht, die NICHT in der DNA niedergelegt ist. Aus diesem Grund wurde im Berichtszeitraum eine weitere Überarbeitung des Protokolls notwendig und durchgeführt.

Letztendlich wurde der Workflow dahingehend modifiziert, dass eine erste Isolierung von Nukleinsäuren (RNA mit signifikanten Mengen DNA) für alle Kohorten vom Partnerlabor in Nizza durchgeführt wurde. Die Proben wurden sodann nach Mainz versandt und hier durch erneute Behandlung mit DNase und Nukleinsäurefällung von DNA befreit. Salz- und Phenolkontaminationen mussten entfernt werden, da sie sowohl den RNA-Verdau stören, als auch einen Einfluss auf die Ionisierungseffizienz der modifizierten Nukleoside haben können. Eine Analyse per LC-MS diente dann zur Quantifizierung von RNA Modifikationen bei gleichzeitiger Überprüfung des DNA Gehalts. Nach dieser Optimierung standen ab 6/22 endlich erste Proben von den Kooperationspartnern aus Spanien und Frankreich aus deren Patientenkohorten zur Verfügung.

Die LC-MS Analyse dieser Proben diente als Basis zur Identifizierung von RNA Modifikationstypen mit potentieller Schlüsselfunktion. Insgesamt waren die Daten wenig aussagekräftig bzgl. Unterschieden zwischen den Kohorten. Jedoch konnten als Modifikationen in fast allen Proben m5C und Nm (ribosmethylierte Nucleotide) bestimmt werden. Da für diese Modifikationen auch performante Methoden zur Positionsbestimmung zur Verfügung standen, wurde die Analytik im Folgenden auf diese fokussiert. Dementsprechend wurden die Proben in 2022 den speziellen, Modifikationsspezifischen RNA Sequenzierungsprotokollen namens BisulfiteSEQ und RiboMethSEQ zugeführt. Anschließend wurden die umfangreichen Datensätze bioinformatisch aufbereitet. Einige Vorläufige wissenschaftliche Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt. Vergleichbare Arbeiten zu BisulfiteSEQ dauern noch an. Auch mussten einige Proben wegen zu geringer Datenausbeute erneut sequenziert werden. Ferner wurde eine zusätzliche Kohorte mit Material von Männern nach pertinentem operativem Eingriff sequenziert, wobei nicht alle Daten noch während der Projektlaufzeit erhalten bzw. aus Projektmitteln aufgearbeitet werden können.

Vorläufige Analyse und Zusammenführung der RiboMethSeq-Datensätze

Zwei Datensätze wurden nach dem RiboMethSeq-Protokoll sequenziert. Der erste Datensatz bestand aus 8 fettleibigen und 8 nicht fettleibigen -Proben in technischen Replikaten. Da die Replikate nahezu identische Methylierungsraten und eine geringe Varianz aufwiesen, wurden sie anhand des arithmetischen Mittels gemittelt. Der zweite Datensatz wurde ohne technische Replikate erstellt und bestand aus 31 adipösen und 10 nicht adipösen -Proben. Um beide Datensätze auf ihre Ähnlichkeit hin

zu untersuchen, wurde ein Overlay-Diagramm mit den Methylierungsergebnissen für alle 117 Nm-Stellen erstellt. Das Diagramm ist im Anhang abgebildet.

Eine Überlagerung der Methylierungsraten zeigte eine hohe Ähnlichkeit der beiden Datensätze bei Fettleibigen und Nicht-Fettleibigen. -Um dies weiter zu bestätigen, wurden statistische -Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt, bei denen die Verteilungen der Methylierungsraten für Fettleibige bzw. Nicht-Fettleibige verglichen wurden-. -Diese Tests wurden für alle 117 Nm-Stellen- durchgeführt. Nur vier Stellen (hs_rRNA_18S_0668, hs_rRNA_18S_1326, hs_rRNA_28S_1340 und hs_rRNA_28S_3718) wiesen sowohl für die -Gruppe der Fettleibigen als auch für die der Nicht-Fettleibigen eine Signifikanz auf -(Schwellenwert 5 %), während die übrigen 113 Nm-Stellen ähnliche Verteilungen aufwiesen. Insgesamt zeigte -diese vorläufige Analyse eine hohe Ähnlichkeit zwischen beiden Datensätzen.

Auf der Grundlage der vorläufigen Analyse wurden beide Datensätze gepoolt. Zwei biologische Duplikate wurden aus dem zweiten Datensatz ausgeschlossen, um die statistische Analyse nicht zu beeinträchtigen (O19.2, NO13.2). O30 wurde wegen des geringen Erfassungsgrads ausgeschlossen, während NO3 wegen der geringen Qualität entfernt wurde. Der endgültige Datensatz bestand aus 37 adipösen Proben und 17 nicht adipösen -Proben und wurde auf Unterschiede untersucht.

Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf Basis der Methylierungsraten

Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse unter Verwendung der Methylierungsraten aller 117 Nm-Stellen durchgeführt, wobei für jede Probe die methylierten Stellen referenziert wurden. Bei der Analyse wurden die beiden ersten Hauptkomponenten (PC1, PC2) berücksichtigt. Die daraus abgeleitete Darstellung ist in Abbildung 2 zu sehen. PC1 und PC2 zeigen erklärte Varianzen von 27,7 % bzw. 12,2 %.

Korrelierte Proben bilden Cluster auf der Grundlage der Hauptkomponenten. Hier sind keine Cluster zu erkennen, sondern viele Proben sammeln sich in kurzen Intervallen für PC1 und PC2. Etwa zwei Drittel -aller Stichproben sammeln sich im Intervall (-10, 0) in PC1 (Intervall 1, Abbildung 2), während sich der Rest zu vergleichsweise hohen positiven Werten ausbreitet. Auch in PC2 (Intervall 2, Abbildung 2) sammeln sich viele Proben im Intervall (0, 5). Dieses Muster ist für beide Gruppen erkennbar. Fettleibige und Nicht-Fettleibige weisen in dieser Analyse keine qualitativen Unterschiede auf. Insgesamt scheinen die Stichproben recht dispers zu sein, obwohl PC1 und PC2 nur 40 % der Stichprobenvariation umfassen.

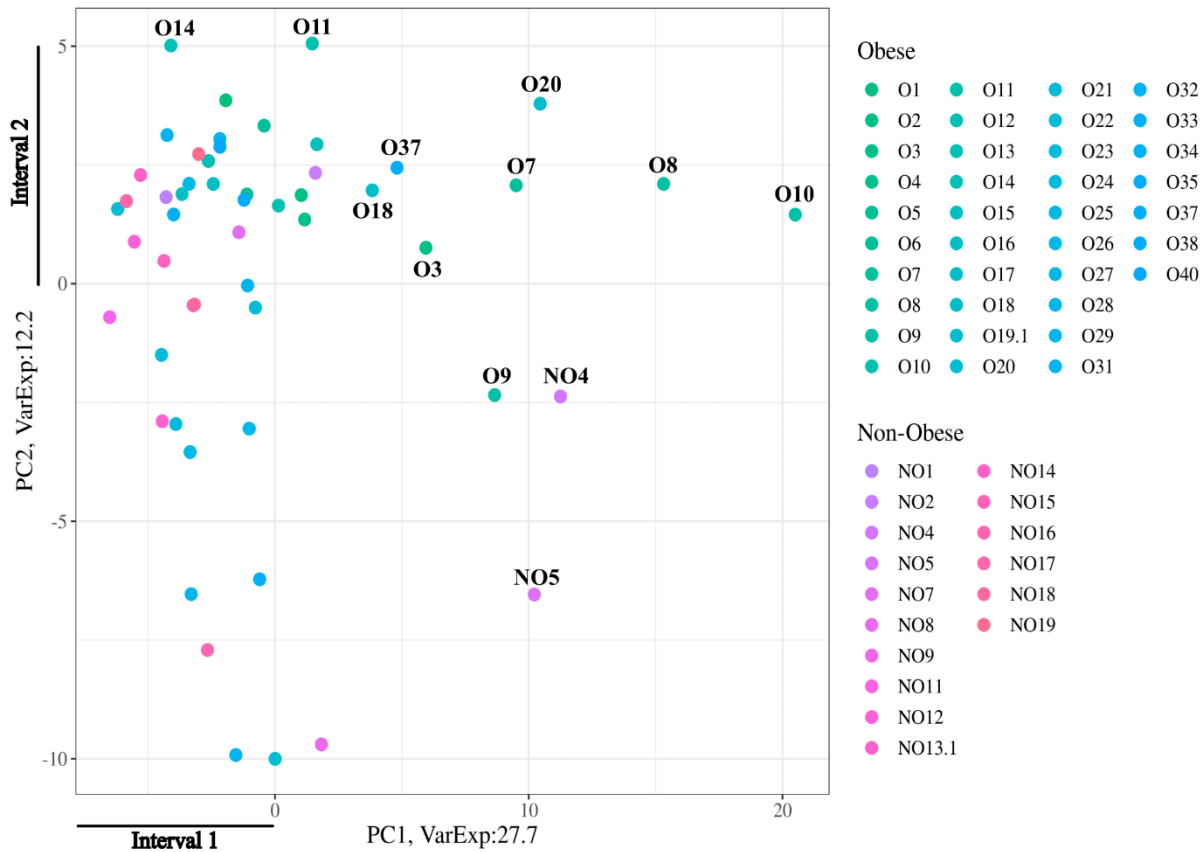


Abbildung 2 PCA-Plot aller Proben. Für die Hauptkomponentenanalyse wurden die Methylierungsraten für jede referenzierte methylierte Stelle verwendet. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Zur Unterscheidung wurden Fettleibige und Nicht-Fettleibige mit unabhängigen Farbskalen eingefärbt. Zwei Intervalle sind mit Balken gekennzeichnet, in denen viele Proben für PC1 bzw. PC2 zusammenkommen.

Dotplot und Heatmap der Methylierungsraten

Die Verteilungen der Methylierungsraten bei Adipösen und Nicht-Adipösen -wurden mit einem Dotplot und einer Heatmap dargestellt. Für das Punktdiagramm wurden die Methylierungsraten jeder Probe für jede der 117 Nm-Stellen aufgetragen. Jeder Punkt steht für eine Probe. Zum besseren Vergleich wurden Fettleibige und Nicht-Fettleibige -getrennt in einem Facettenplot -dargestellt. Die Methylierungsraten zwischen Fettleibigen und Nicht-Fettleibigen -unterscheiden sich leicht. Das Punktdiagramm ist in **Abbildung 3** -dargestellt.

Einige Nm-Stellen weisen leichte Unterschiede in ihren Methylierungsraten bei Übergewichtigen und Nicht-Übergewichtigen auf. -Zum Beispiel scheinen die Verteilungen für `hs_rRNA_18S_0174`, `hs_rRNA_18S_0797`, `hs_rRNA_28S_2422` und `hs_rRNA_28S_4620` unterschiedlich zu sein. Da jedoch 16 nicht adipöse -Proben mit 37 adipösen Proben verglichen wurden, können die beobachteten

Verteilungen zufällig abweichen. Insgesamt zeigen etwa 20 % der Nm-Stellen Unterschiede zwischen Fettleibigen und Nicht-Fettleibigen-.

Um weiter zu untersuchen, ob die Methylierungsraten zwischen Fettleibigen und Nicht-Fettleibigen signifikant voneinander abweichen-, wurde eine Heatmap für 117 referenzierte methylierte Stellen unter Verwendung der rohen Methylierungsraten -erstellt. Die Heatmap ist in **Abbildung 4** dargestellt. Ein signifikanter Unterschied in den Methylierungsraten zwischen Fettleibigen und Nicht-Fettleibigen wäre als Farbverschiebung sichtbar. Auch wenn keine Verschiebung sichtbar ist, zeigen 15 Stellen eine Variabilität in ihrem Methylierungsstatus. Nach ihren Methylierungsraten sortiert, bilden diese Stellen zwei unterschiedliche Cluster in der Heatmap.

hs_rRNA_28S_2365, hs_rRNA_28S_2422, hs_rRNA_28S_2448, hs_rRNA_18S_0576, hs_rRNA_18S_0797, hs_rRNA_28S_2876, hs_rRNA_18S_1272, hs_rRNA_18S_0517 und hs_rRNA_28S_4620 gehören zum ersten Cluster und haben im Allgemeinen höhere Methylierungsraten.

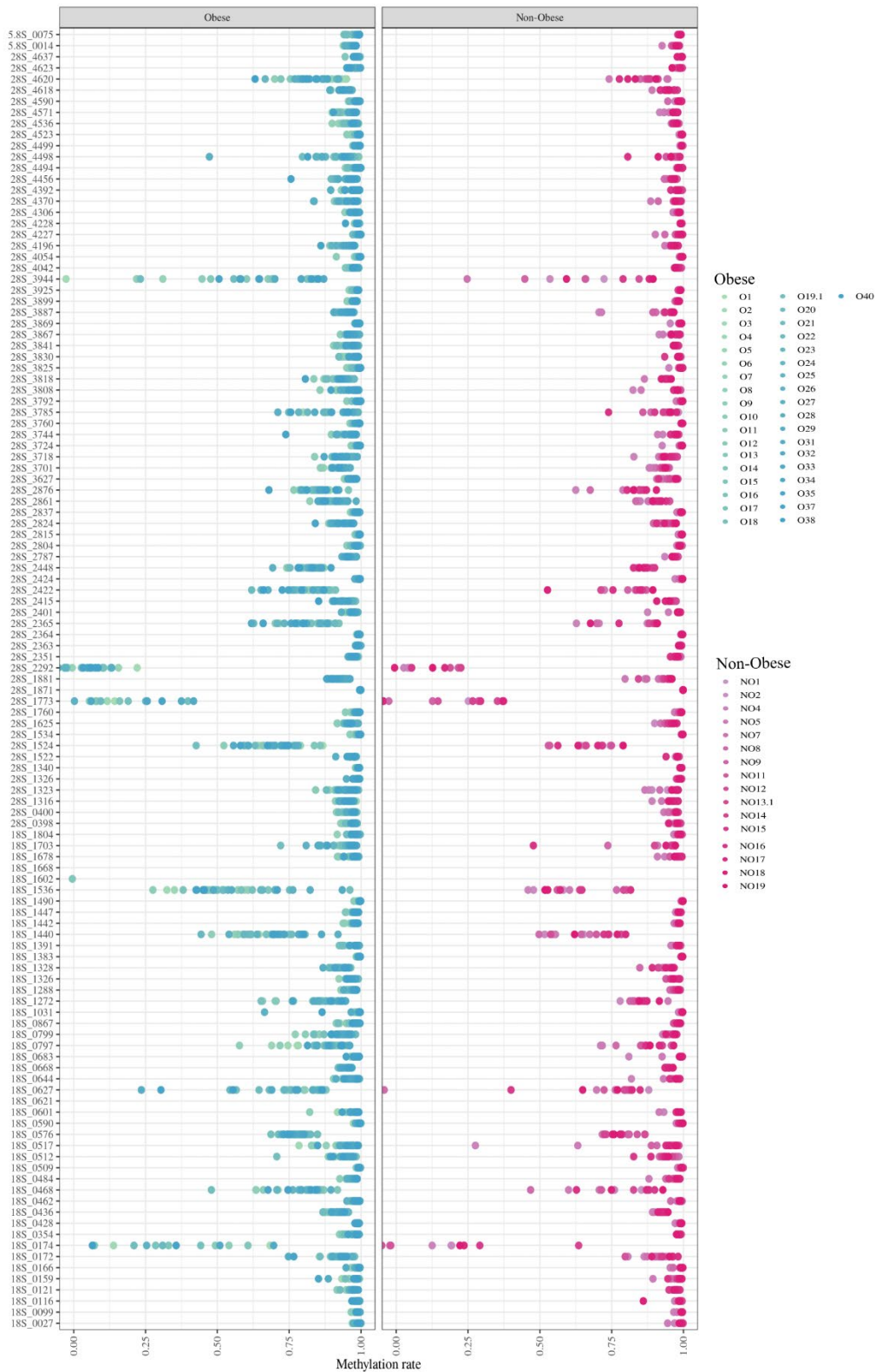


Abbildung 3 Punktdiagramm der Methylierungsraten für Nm-Stellen. Jeder Punkt steht für eine Probe. Fettleibige Proben sind in roten Farbtönen dargestellt, nicht fettleibige -Proben in grünen Farbtönen. Die Verteilungen sind für 117 untersuchte Nm-Stellen dargestellt. Zum besseren Vergleich sind fettleibige und nicht fettleibige -Proben getrennt aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Präfix "hs_rRNA_" in den Standortnamen weggelassen.

hs_rRNA_18S_0468, hs_rRNA_28S_1524, hs_rRNA_18S_1440, hs_rRNA_18S_0627, hs_rRNA_18S_1536 und hs_rRNA_28S_3944 gehören zum zweiten Cluster und weisen daher generell niedrigere Methylierungsraten auf. Die Varianz in der Methylierung scheint nicht mit der Fettleibigkeit korreliert zu sein und könnte auf unbekannte Faktoren zurückzuführen sein, die hier nicht weiter untersucht werden.

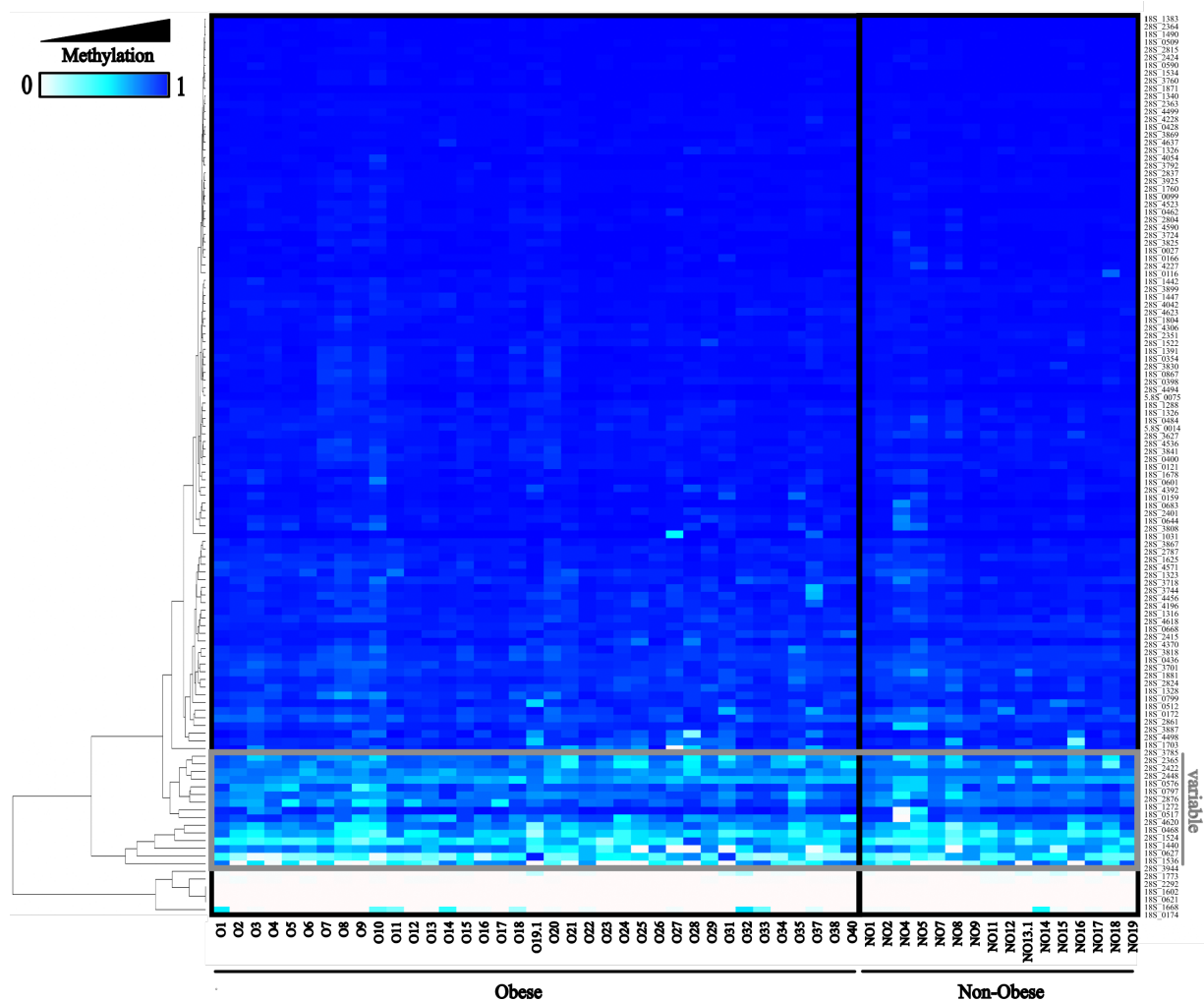


Abbildung 4 Heatmap für 117 referenzierte methylierte Stellen . Proben von Fettleibigen und nicht Fettleibigen wurden gegen methylierte Stellen aufgetragen. Die Gruppen sind durch eine schwarze Linie getrennt. Die Methylierungsraten werden über einen Farbverlauf von weiß (nicht methyliert, Methylierungsrate gleich 0) bis dunkelblau (methyliert, Methylierungsrate gleich 1) dargestellt. Die Clusterbildung auf der Grundlage der Methylierungsraten wird in einem Dendrogramm dargestellt (links). Zwei Cluster weisen eine hohe Varianz in der Methylierung auf, die in grau dargestellt ist.

Statistische Unterschiede zwischen Normalgewichtigen und Fettleibigen

Um statistisch zu prüfen, ob es Unterschiede zwischen den Methylierungsraten von Fettleibigen und Nicht-Fettleibigen gibt-, wurden, wie beschrieben, Wilcoxon-Tests durchgeführt. Wilcoxon-Tests zeigen, ob eine von zwei Verteilungen eine Tendenz zu höheren oder niedrigeren Werten aufweist. Für eine detaillierte Beschreibung der statistischen Analyse siehe Abschnitt **1.5**. 22 Standorte zeigten Signifikanz (Schwellenwert 5 %) und wurden weiter untersucht. Die Verteilungen sind in **Abbildung 5** dargestellt.

Fettleibige und Nicht-Fettleibige unterscheiden sich in ihrer wahrgenommenen Verteilung in einer Teilmenge der Standorte. Daher wurden Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt, um zu untersuchen, ob dies eine entscheidende Eigenschaft des Datensatzes ist. Kolmogorov-Smirnov-Tests zeigen, ob zwei Gruppen der gleichen Verteilung folgen (siehe Abschnitt **1.5** für weitere Einzelheiten).

Zur Korrektur der Multiplizität wurden die P-Werte der statistischen Tests nach der Benjamini-Hochberg-Methode anhand der Falschentdeckungsrate angepasst. Die angepassten P-Werte sind neben der jeweiligen Verteilung in **Abbildung 5** dargestellt. Signifikante Werte sind in rot dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier nur die bereinigten P-Werte diskutiert; eine umfassende Auflistung der statistischen Daten finden Sie in **Tabelle 1** im Anhang.

8 P-Werte aus dem Wilcoxon-Test blieben nach Korrektur signifikant, für den -Kolmogorov-Smirnov-Test waren 8 Werte ebenfalls signifikant, allerdings teilweise für verschiedene Standorte. Ausgehend von den unten dargestellten -Verteilungen scheinen die Unterschiede eher gering zu sein. Allerdings scheinen sich die Verteilungen von Fettleibigkeit zu niedrigeren Werten für `hs_rRNA_28S_4228`, `hs_rRNA_28S_2448`, `hs_rRNA_28S_4637`, `hs_rRNA_28S_4523`, `hs_rRNA_18S_0099`, `hs_rRNA_28S_1522`, `hs_rRNA_28S_2401` und `hs_rRNA_18S_0683` auszubreiten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine kleine Untergruppe von Standorten Unterschiede in ihrer Verteilung und eine Tendenz zu niedrigeren Werten bei Fettleibigen aufweist, wenn auch in geringem Maße. Dies könnte ein Hinweis auf eine höhere Variabilität der Methylierung bei Übergewichtigen für einige Nm-Stellen sein.

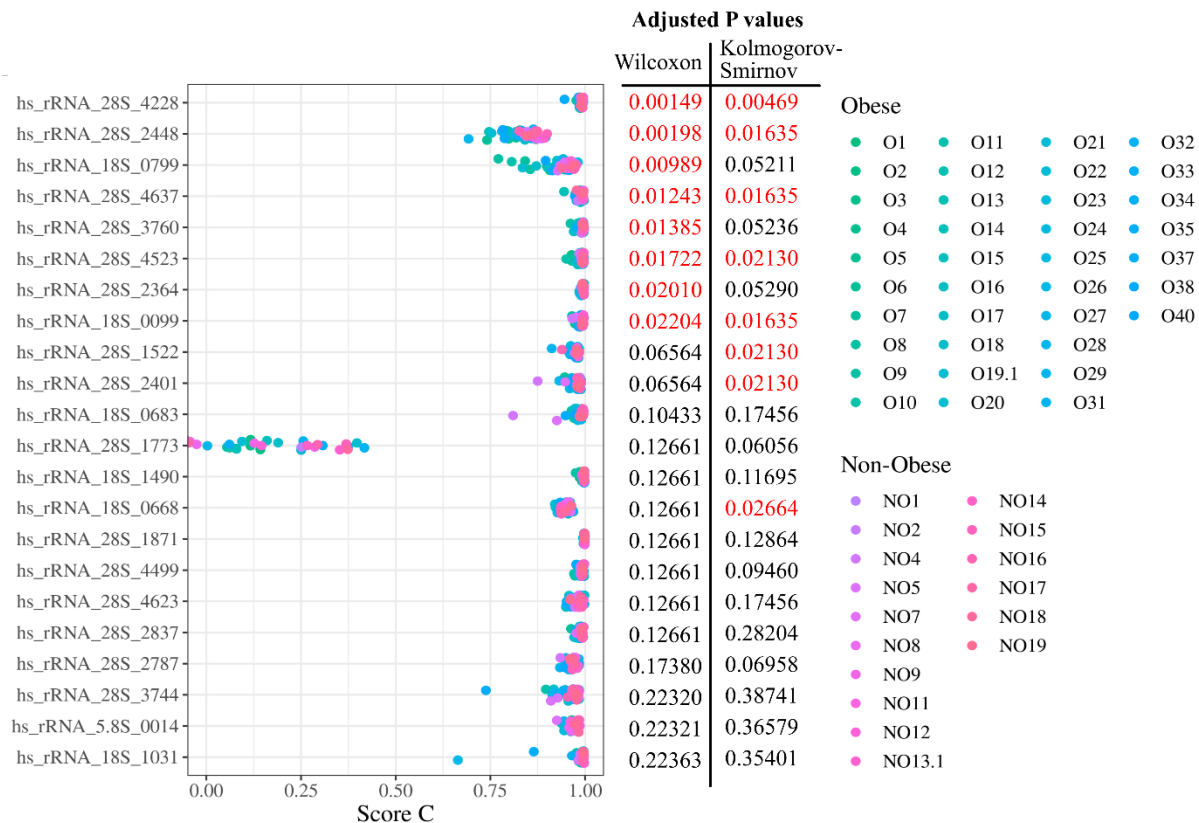


Abbildung 5 Methylierungsraten und statistische Daten für signifikante Stellen . Die Methylierungsraten werden als Jitter-Plots für jeden Standort dargestellt (links). Jeder Datenpunkt wurde in der Höhe um einen zufälligen Wert verschoben, um die Verteilung zu zeigen, während die Methylierungsrate unverändert blieb. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe und ist entweder grün oder blau (fettleibig) oder violett oder rosa (nicht fettleibig) gefärbt. -Die korrigierten P-Werte aus dem Wilcoxon-Test und dem -Kolmogorov-Smirnov-Test werden rechts neben der jeweiligen Verteilung angezeigt. Signifikante P-Werte sind in rot angegeben.

Für das Vulkan-Diagramm wurde die rohe Differenz der Methylierungsrate als Median der Nicht-Fettsüchtigen -abzüglich des Medians der Fettsüchtigen für jeden Standort berechnet-. -Sie wurde dann gegen den negativen dekadischen Logarithmus des unbereinigten P-Wertes aus dem Wilcoxon-Test -aufgetragen. Der Schwellenwert von 5 % ist als Balken angegeben. Jeder Punkt über dem Balken steht für einen Standort mit einem signifikanten P-Wert. Ein niedriger P-Wert gepaart mit einem hohen Unterschied in der Methylierungsrate ist ein Indikator für Unterschiede in beiden Gruppen. Vielversprechende Standorte würden sich in der oberen linken und oberen rechten Ecke anhäufen. Das Vulkandiagramm ist in **Abbildung 6** dargestellt.

Die meisten Standorte mit einem P-Wert über dem Schwellenwert weisen nur einen geringen Unterschied in der Methylierungsrate auf. hs_rRNA_28S_2448, hs_rRNA_18S_0799 und hs_rRNA_28S_1773 liegen über dem P-Wert-Schwellenwert und zeigen größere Unterschiede als die

meisten Standorte. Allerdings sind sie immer noch vergleichsweise gering. Um als signifikant zu gelten, sollte ein Unterschied in der Methylierungsrate bei etwa 0,2 liegen, was einem Methylierungsgrad von 20 % entspricht. Während der Unterschied in den Methylierungsraten zu gering ist, um auf einen biologisch relevanten Unterschied in der Methylierung hinzuweisen, kann die Analyse signifikanter Stellen auf eine abweichende Variabilität der Methylierung in beiden Gruppen hinweisen (siehe **Abbildung 5**).

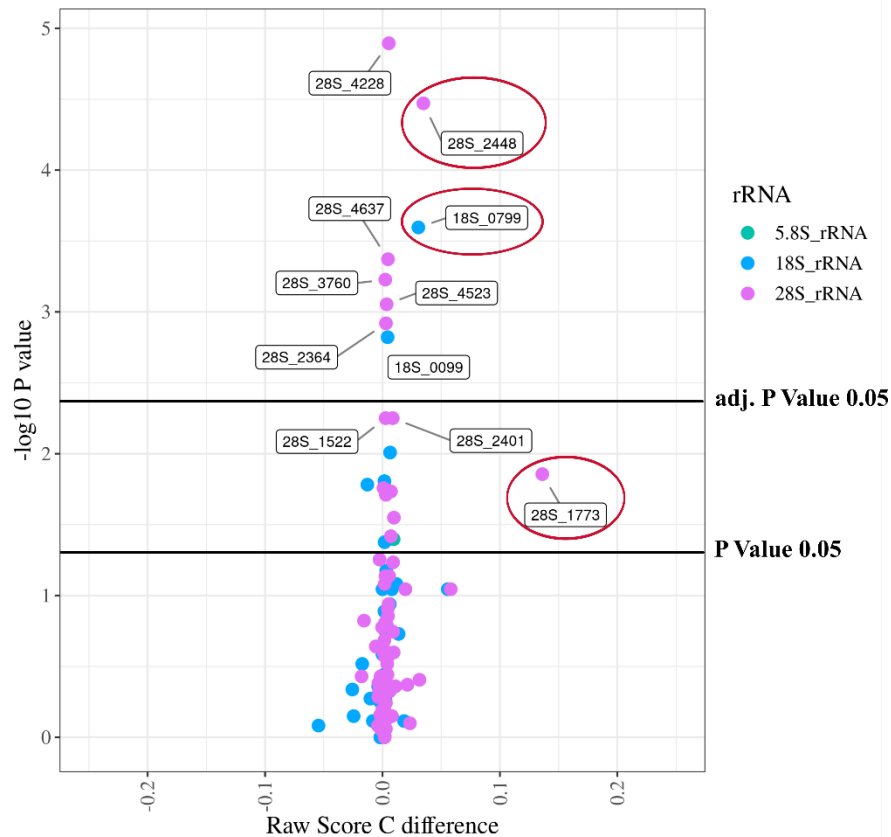


Abbildung 6 Volcano Plot der referenzierten methylierten Stellen . Jeder Datenpunkt steht für eine getestete Stelle. Die rohe Differenz der Methylierungsrate zwischen Übergewichtigen und Nicht-Übergewichtigen wurde gegen den negativen dekadischen Logarithmus der P-Werte aus den Wilcoxon-Tests aufgetragen. Die Differenz der Methylierungsrate wurde als Differenz zwischen den Medianen von Adipösen und Nicht-Adipösen berechnet. Der P-Wert bzw. die angepasste P-Wert-Schwelle von 5% wurde als Balken angezeigt. Jede Stelle oberhalb des Balkens hat einen signifikanten P-Wert bzw. bereinigten P-Wert. Der bereinigte P-Wert ist nicht direkt proportional zum P-Wert, genaue Werte sind in Tabelle 1 angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde das Präfix 'hs_rRNA_' für die Kennzeichnung der Standorte weggelassen. 3 mit roten Kreisen markierte Proben haben P-Werte über dem Schwellenwert, gepaart mit einer Methylierungsratendifferenz, die höher ist als bei den meisten Proben.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die wichtigsten Positionen der Finanzierung bestehen aus (i) Personal, (ii) Verbrauchsmitteln und (iii) Aufträgen an Dritte

(i) Personal

Es war ursprünglich eine Postdocstelle E13 für drei Jahre für alle Arbeiten eingeplant gewesen. Anfänglich wurde das Projekt vollumfänglich von Frau Dr. **XXXX** als Postdoc bearbeitet. Nach Ihrem Ausscheiden und unter anderem bedingt durch die Corona Pandemie konnte kein dauerhaft vollwertiger Ersatz gefunden werden, so dass einzelne Aufgabenfelder durch verschiedene Mitarbeiter bearbeitet wurden, die sich jeweils noch in die Materie einarbeiten mussten.

01.07.19-28.02.21 Dr. Annika Kotter / Postdoc / Probenmanagement / Logistik / LC-MS Analytik

01.06.21-31.08.21 **XXXX** / Doktorandin / Probenmanagement und -Logistik / Probenvorbereitung

15.06.22-31.07.22 Dr. **XXXX** / Postdoc / Probenvorbereitung zur Sequenzierung / LC-MS Analytik

01.07.22-31.12.22 **XXXX** / Doktorand/ Probenmanagement und -Logistik / Datenverarbeitung / Probenvorbereitung

01.01.23-31.05.23 **XXXX** / Doktorandin/ Probenmanagement und -Logistik / Datenverarbeitung / Probenvorbereitung zur Sequenzierung / LC-MS Analytik

01.01.23-31.05.23 **XXXX** / Computergestützte Datenauswertung von Big Data aus Sequenzierungsexperimenten

(ii) Verbrauchsmittel (~77 k€)

Diese bestanden hauptsächlich aus Enzymen zur Probenvorbereitung, Oligonucleotiden als Standards oder Primer in Sequenzierungsexperimenten, Steriles Laborplastik zum Arbeiten mit RNA, Medien und andere Verbrauchsmittel der Zellkultur zur Generierung von RNA Standards und allgemeinen Laborchemikalien.

(iii) 3. Spezialisierte RNAseq Protokolle wurden in Auftragsarbeit ausgeführt (30 k€).

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Insgesamt wurde ein Großteil, aber nicht alle der Zeile erreicht. Dies ist im Wesentlichen auf zwei Faktoren zurückzuführen. Zum einen waren wir, basierend auf dem Stand der Literatur und der Erfahrung und Reputation der Partnerlabore, davon ausgegangen, dass die Isolierung von sauberer RNA aus Spermien robust etabliert und unproblematisch sei. Die überraschend notwendig gewordenen Optimierung dieses Arbeitsschrittes hat signifikante Verzögerungen im weiteren Verlauf des Projektes bewirkt. Teile dieser Optimierungsarbeiten fielen quasi „günstiger Weise“ in eine Periode der relativen Inaktivität, welche durch Faktor zwei, nämlich die Corona Pandemie, bewirkt worden war. Dadurch wurde diese Zeit zumindest teilweise konstruktiv im Sinne des Projektes genutzt. Die Pandemie hat, wie unschwer nachzuvollziehen ist, die Rekrutierung von Spendern durch die Kooperationspartner verlangsamt, zeitweise bis zum völligen Stillstand. Trotz einer ausgabenneutralen Verlängerung des Projektes um ein Jahr ist diese Verzögerung nicht aufgeholt worden. Dementsprechend wurden die Meilensteine M3 und M6 noch nicht voll erfüllt. Wir befassen uns derzeit mit der weiteren Datenverarbeitung von Sequenzierdaten aus BisulfiteSEQ und RiboMethSEQ Experimenten, welche diesbezüglich sehr aufwendig ist. Hierzu werden hauseigenen Ressource eingesetzt. Insgesamt werden die erhaltenen Daten aber als sehr interessant eingestuft. Diese Daten zu erarbeiten wäre ohne die Förderung nicht möglich gewesen.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Die Ergebnisse sollen entlang dreier Handlungsstränge weiterer Verwertung zugeführt werden.

Derzeit finden Mikroinjektionsexperimente durch Valérie Grandjean statt, um die vermuteten epigenetischen Effekte der Nukleinsäurepräparationen im Experiment zu validieren.

Die oben detaillierten Ergebnisse zur Ribosemethylierung in ribosomaler RNA werden derzeit um Daten aus Zellkultur ergänzt und zur Publikation vorbereitet.

Die aus der Überarbeitung des Probenaufreinigungsprotokolls gewonnenen Erkenntnisse dienen nunmehr als Grundlage um die Resultate anderer Arbeitsgruppen in diesem Feld kritisch zu hinterfragen. Die entsprechende Projektplanung befindet sich noch im Anfangsstadium.

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

Nicht zutreffend

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Bisher wurden keine Publikationen veröffentlicht. Die oben detaillierten Ergebnisse zur Ribosemethylierung in ribosomaler RNA werden derzeit um Daten aus Zellkultur ergänzt und zur Publikation vorbereitet.

Anhang 1: Erfolgskontrollbericht

Anhang 2: Abschlussbericht des Gesamtkonsortiums an JPI

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel HEROS	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Helm, Mark	5. Abschlussdatum des Vorhabens Mai 2023
	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Arbeitskreis Helm Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Lebenswissenschaften Johannes Gutenberg-Universität Staudingerweg 5, 55128 Mainz	9. Ber. Nr. Durchführende Institution keine
	10. Förderkennzeichen *) 01EA1903
	11. Seitenzahl 16
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	12. Literaturangaben noch zu ermitteln
	14. Tabellen keine
	15. Abbildungen 6
16. Zusätzliche Angaben keine	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) geplant	
18. Kurzfassung <p>Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass mehrere nicht übertragbare Krankheiten, darunter auch Fettleibigkeit und die damit verbundenen Stoffwechselstörungen, über mehrere Generationen hinweg durch nicht genetische Mechanismen von den Eltern auf die Nachkommen vererbt werden. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass elterliche Umwelteinflüsse epigenetische Veränderungen in der Keimbahn hervorrufen könnten, die auf die Nachkommenschaft übertragen werden. Ätiologische Faktoren und Risikofaktoren, die zum Auftreten nicht übertragbarer Krankheiten beitragen, haben daher das Potenzial, die Entwicklung der Pathologie(n) bei den Nachkommen zu fördern.</p> <p>Grundsätzlich ist die Rolle der Spermien-RNA bei der epigenetischen Vererbung kein neues Phänomen und wurde größtenteils in experimentellen Modellen untersucht. Die Validierung beim Menschen, welche allgemein als schwierig und kompliziert gilt, war hier das zentrale Projektziel. In diesem Projekt ging es daher konkret um die Übertragung von mit Fettleibigkeit assoziierten Phänotypen von fettleibigen Männern. Speziell ging es um die Identifizierung der für die Übertragung relevanten molekularen Spezies, insbesondere von RNA Spezies sowie deren posttranskriptionalen Modifikationen, welche die pertinente Information weitergeben könnten.</p> <p>Es handelt sich um ein internationales Projekt, in welchem die beiden anderen Gruppen in Frankreich und Spanien Material, i.e. Nukleinsäuren aus Spermien von Donoren, isolierten und zur Analyse an den Arbeitskreis Helm an der JGU Mainz schickten. Die Bestimmung von RNA Modifikationen wurde per LC-MS und Hochdurchsatzsequenzierung bearbeitet. Zunächst wurde festgestellt, dass die vermeintlichen RNA Präparationen stark mit DNA durchsetzt waren, was eine Neuetablierung experimenteller Protokolle erforderte. Es wurden sodann die Ribosmethylierungsmuster von ribosomaler RNA aus Spermien verschiedener Kohorten von fettleibigen Männern, Kontrollgruppe, sowie von fettleibigen Männern nach chirurgischem Eingriff bestimmt. Während der experimentelle Teil abgeschlossen werden konnte, steht eine endgültige Auswertung der umfangreichen Datensätze noch aus.</p>	
19. Schlagwörter Epigenetik ; Epitranskriptomik; RNA Modifikationen ; Spermien ; Dickleibigkeit	
20. Verlag unbekannt	21. Preis unbekannt

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.