Gefördert durch:

CLUSTERS 4 FUTURE
Innovationsnetzwerke für unsere Zukunft

Bundesministerium für Forschung, Technologie und Raumfahrt

curATime

Abschlussbericht

zum Teilvorhaben:

„microbAIome: Wirt-Mikrobiom-Interaktionen bei Atherothrombose“

„curATime - Cluster für Atherothrombose und individualisierte Medizin“

Zuwendungsempfänger: TRON gGmbH	**Förderkennzeichen:** 03ZU1202CC
Teilprojektleiter: Dr. Mustafa Diken	
Verantwortlicher Autor: Dr. Mustafa Diken	
Laufzeit des Vorhabens: 01.03.2023 – 28.02.2026	
Berichtszeitraum: 01.03.2023 – 28.02.2026	

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 03ZU1202CC gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Teil I - Kurzbericht

Es ist bekannt, dass das Darmmikrobiom einen relevanten Einfluss auf die Entstehung von arteriellen Thrombosen hat, welche wiederum zur Atherosklerose führen können. Hierbei spielen insbesondere die mikrobiellen Metabolite eine Rolle, die die Bakterien ausscheiden und die die Plaquebildung, also eine mögliche Vorstufe der Atherothrombose fördern könne. Zudem können diese Metabolite auch die Immunantwort des Patienten beeinflussen, welches ebenfalls Thrombosen begünstigen kann.

Das übergeordnete Ziel des curATime Projekts microbAIome, dass im Rahmen des Innovationsfelder curAIdent durchgeführt wurde, war, die komplexen Wirkungen des Mikrobioms im Darm auf das Herz-Kreislauf-System, insbesondere bei Atherosklerose und späterer Atherothrombose besser zu verstehen. Hierzu sollten Mikrobiom-regulierter Zielstrukturen und Pathomechanismen identifiziert werden, welche für eine zukünftige therapeutische Intervention in der Atherothrombose geeignet sind. TRONs zuvor geplante Aufgabe war die Herstellung und Prüfung von RNA- und siRNA-Formulierungen zur Targetierung des Endothels, sowie die *in vivo* Bewertung dieser Formulierungen.

Während der Projektlaufzeit wurde von TRON zunächst mRNA-Designs und Klonierungen, sowie RNA-Synthesen durchgeführt, die zur Prüfung von der Biodistribution dieser auf Organ- und Gewebeebene in Mausmodellen dienen sollten. Hierzu wurden von TRON im ersten Schritt RNA-Reporterkonstrukte für Translation einer Luziferase, sowie für eGFP- und Thy1.1-RNA-Konstrukte für die immunhistochemische Analyse der Biodistribution der entsprechenden mRNAs auf Gewebeebene hergestellt. Nachfolgende wurde für die Überexpression von ACER-2, einem Target zur gezielten Beeinflussung des Sphingolipid-Synthesewegs, ebenfalls mRNAs hergestellt und dem Projektleiter (CTH) übergeben. Nach weiteren Absprachen mit der Projektleitung (CTH) wurden zusätzliche mRNAs zur Targetierung der Artherothrombose-fördernden Proteine Sgms1 und S1pr1 erstellt. Die Biodistributionsanalysen aller hergestellten mRNAs wurden direkt vom Projektleiter (CTH) durchgeführt.

Die generierten ACER-2-targetierenden RNAs, sowie die mRNAs zur Targetierung der Atherothrombose-fördernden Proteine Sgms1 und S1pr1 konnten zusammen mit den oben aufgeführten Kontroll-mRNAs als Grundlage für Analysen des Projektleiters (CTH) dienen. Dieser untersuchte in ersten Krankheitsmodellen die Dosisabhängigkeit, Spezifität und Wirksamkeit dieser therapeutischen Ansätze zur Vermeidung von Atherothrombose und konnte diese bewerten.

In enger Verzahnung mit dem curATarget-Projekt wurden von TRON Arbeiten zur „Untersuchung des Einflusses des Darmmikrobioms auf atherosklerotische Plaques in Ldlr$^{-/-}$-Mäusen mittels scRNA-seq“ innerhalb des Projektes durchgeführt.

Teil II - Eingehende Darstellung

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

Experimentelle und klinische Daten belegen, dass das Darmmikrobiom einen funktionell relevanten Einfluss auf die Pathogenese arterieller Thrombosen sowie die Ausprägung atherosklerotischer Läsionen ausübt. Insbesondere mikrobielle Metabolite tragen zur Plaquebildung bei, die zur Atherothrombose führen kann. Diese Metabolite interagieren ebenfalls mit der Immunantwort des Wirts, welche zusätzliche Faktoren für eine entstehende Atherothrombose liefern kann. Hierbei fungiert das Mikrobiom als Quelle für Lipopolysaccharide, welche vaskuläre Entzündungsprozesse unterstützen und somit auch auf diesem Weg zur Atherothrombose beitragen können. Die genauen Prozesse sind hierbei noch nicht identifiziert.

Dementsprechend war das übergeordnete Ziel des curATime Projekts microbAIome, die komplexen Wirkungen des Mikrobioms im Darm auf das Herz-Kreislauf-System, insbesondere bei Atherosklerose und späterer Atherothrombose besser zu verstehen. Hierzu sollten im Projekt detaillierte Analysen der Zusammensetzung des Mikrobioms auf dessen Auswirkungen auf Entzündungsmechanismen durchgeführt werden, die für eine optimale Integrität der Darmbarriere, sowie für die indirekte Beeinflussung anderer Organfunktionen, wie z.B. des Herz-Kreislaufsystems relevant sind, u.a. mit Betrachtung des Sphingolipid-Synthesewegs, der für die Entwicklung von Atherosklerose und für die arterielle Thrombusbildung von entscheidender Bedeutung ist.

In Vorarbeiten hatte der Projektleiter in gnotobiotischen Mausmodellen gezeigt, dass das Leberendothel als eine zentrale Schaltstelle bildet, über die das Darmmikrobiom die arterielle Thrombusbildung verstärkt. Dementsprechend sinnvoll war es, im ersten Schritt dieses zu targetieren.

TRONs Aufgaben lagen im Vorhaben hauptsächlich in Arbeitspaket 4 und bestanden daraus, seine Expertise im RNA-Design anzuwenden, um eine bestmögliche Targetierung der von dem Projektleiter (CTH) genannten Zielstrukturen durchführen zu können. Innerhalb der Projektlaufzeit wurde sich mit dem Projektkoordinator (CTH) darauf geeinigt, dass TRON die Proben als mRNA für die Analysen zur Verfügung stellt und nicht, wie ursprünglich geplant, als siRNA oder innerhalb von in Nanopartikeln-formulierten Konstrukten. Somit wurde im Rahmen von Arbeitspaket 4 von TRON zunächst mRNA-Design und Klonierungen durchgeführt, die, zuallererst der Prüfung von der Biodistribution von Formulierungen auf Organ- und Gewebeebene in Mausmodellen dienen sollten. Hierzu wurden von uns mRNA-Reporterkonstrukte für Translation einer Luziferase zur Messung der Biodistribution mittels *in vivo*-Lumineszenz in Organen, bzw. eGFP- und Thy1.1-RNA-Konstrukte für die immunhistochemische Analyse der Biodistribution dieser Formulierungen auf Gewebeebene vorbereitet, von dem assoziierten Partner BioNTech synthetisieren lassen und haben dieses an den Projektleiter (CTH) übergeben. Im nächsten Schritt

sollte TRON für die Targetierung des Leberendothels die mRNA zur Überexpression des Proteins ACER-2 (Alkaline Ceramidase 2) vorbereiten, damit der Projektleiter (CTH) dieses auf die Beeinflussung des Sphingolipid-Synthesewegs überprüfen konnte. Nachdem der Projektleiter (CTH) zunächst noch Vorversuche zur Verifizierung von ACER-2 als geeignetes Target beendet hatte, designte und klonierte TRON für die Überexpression von ACER-2 entsprechende Plasmide für die nachfolgende Generierung von mRNA bei BioNTech. Auch diese wurde dem Projektleiter (CTH) für weitere Untersuchungen übergeben, sodass die von TRON geplanten Meilensteine 11 und 12 etwas verspätet, aber ohne Folgen für das Projekt erreicht wurden.

Nach Übergabe der Reporterkonstrukte konnte der Projektleiter (CTH) Analysen um die Biodistribution auf Organebene, sowie zur Aufnahme und Expression von RNA über sinusoidale Leberendothelzellen, bestimmen. Zusätzlich konnten erste Schlüsse über die Beeinflussung von Endothelzellen durch den Sphingolipid-Syntheseweg mit Hilfe der ACER-2-targetierenden RNAs und des Vergleichs mit den Reporter-RNAs gezogen werden. Nach Zusammentragen der Erkenntnisse wurde TRON vom Projektkoordinator mitgeteilt, welche weiteren Konstrukte zur Targetierung des Sphingolipid-Stoffwechsels hergestellt werden sollten. Hierzu wurden die mRNA designt und Klonierungen zur Produktion von RNA für die Targetierung der Atherothrombose-fördernden Proteine Sgms1 (Sphingomyelin Synthase 1) und S1pr1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1) aus dem Sphingolipid-Stoffwechsel durchgeführt. Zusammen mit den von TRON generierten ACER-2-targetierenden RNAs konnte der Projektleiter (CTH) somit in ersten Krankheitsmodellen die Dosisabhängigkeit, Spezifität und Wirksamkeit dieser therapeutischen Ansätze zur Vermeidung von Artherothrombose bewerten. Nachdem die mRNAs zur Targetierung von Sgms1 und S1pr1 übergeben wurden, konnten diese vom Projektleiter in Krankheitsmodellen genutzt werden. Dementsprechend wurde Meilenstein 3 von TRON erreicht.

Zusammenfassend kann TRON berichten, dass die im Antrag formulierten Ziele des Teilvorhabens C erreicht wurden. Die beiden Meilensteine 11 und 12 des Arbeitspakets 4 konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Ebenfalls konnte die i*n-vivo*-Bewertung der zur Verfügung gestellten mRNAs vom Projektleiter getestet werden, sodass auch Meilenstein 3 erreicht wurde.

In enger Verzahnung mit dem curATarget-Projekt wurden von TRON Arbeiten zur „Untersuchung des Einflusses des Darmmikrobioms auf atherosklerotische Plaques in Ldlr$^{-/-}$-Mäusen mittels scRNA-seq“ innerhalb des Projektes durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein scRNA-seq-Protokoll für murine atherosklerotische Plaques von TRON etabliert. Dies umfasste die Optimierung der Gewebeaufbereitung, einschließlich mechanischer und enzymatischer Dissoziation, gefolgt von einer Zellseparation mittels Durchflusszytometrie.

Für das Experiment wurden insgesamt 18 Mäuse analysiert, davon neun unter keimfreien (germ-free, GF) Bedingungen und neun unter konventionellen (CONV-R) Bedingungen. Atherosklerotische Plaques wurden aus den Aorten isoliert, anschließend wurden Zellen extrahiert und $CD45^+$-Immunzellen sortiert. Es folgte die Einzelzellverkapselung nach dem Standardprotokoll von 10x Genomics sowie die Erstellung von cDNA- und TCR-Bibliotheken und deren Sequenzierung. Die Sequenzierung war technisch erfolgreich, jedoch wurden insgesamt vergleichsweise geringe Zellzahlen detektiert. Die wichtigsten Ergebnisse zeigten dabei, dass atherosklerotische Plaques aus keimfreien Mäusen eine höhere Anzahl vitaler Zellen im Vergleich zu CONV-R-Mäusen zeigen. Zusätzlich konnte herausgefunden werden, dass T-Zellen den größten Anteil der in den Plaques vorhandenen Immunzellen darstellten und dass nur ein geringer Anteil der T-Zellen eine klonale Expansion aufzeigte, welche bei beiden Mäusepopulationen auftraten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Darmmikrobiom die Zellviabilität innerhalb atherosklerotischer Plaques beeinflusst, jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf das Auftreten klonaler T-Zell-Expansion hat.

2. Wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die bereitgestellten Fördermittel wurden zweckentsprechend für die Durchführung der beantragten Arbeiten eingesetzt. Der Schwerpunkt der Ausgaben lag auf Personalaufwendungen für wissenschaftliche Mitarbeitende, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die mRNA-Klonierungen, sowie für die Kosten zur Qualitätskontrolle der entstandenen Konstrukte. Die eingesetzten Mittel waren für die Durchführung der Arbeiten erforderlich und angemessen. Sämtliche Ausgaben standen in direktem Zusammenhang mit der Erreichung der Projektziele.

Das Projekt wurde im Zeitraum vom 01.03.2023 – 28.02.2026 durchgeführt. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises sind die im Projekt entstanden Personalkosten (Position 0837) mit ca. 42% der Gesamtkosten des Teilprojektes, sowie die Materialkosten (Position 0813) mit ca. 48%. Der Anteil der Verwaltungskosten lag bei ca. 10% (Position 0860).

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Rahmen des Teilvorhabens durchgeführten Arbeiten waren notwendig, um eine wichtige Grundlage für die Erzielung der Gesamtprojektziele zu erstellen. Ziel des Projektes war es, die komplexen Wirkungen des Mikrobioms im Darm auf das Herz-Kreislauf-System, insbesondere bei Atherosklerose und späterer Atherothrombose besser zu verstehen und Zielstrukturen für eine Verhinderung des teilweisen negativen Einflusses des Mikrobioms zu identifizieren. Für die Herstellung von mRNAs für die Targetierung der Zielstrukturen war TRON zuständig. Hierbei designte TRON die entsprechende mRNAs und übergab sie für

die Synthese an BioNTech, bevor diese im nächsten Schritt an die Projektleitung (CTH) für weitere Analysen in Krankheitsmodellen übergeben wurden.

Die eingesetzten Fördermittel waren sowohl für die Erreichung der wissenschaftlichen Ziele als auch für die Umsetzung des translationalen Ansatzes des Verbundvorhabens erforderlich. TRONs Beitrag diente dementsprechend als Grundlage für den Erfolg des Projektes und wäre ohne die bereitgestellte Förderung nicht realisierbar gewesen.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Besonders hervorzuheben sind hier die Erfahrungen, die aus der Verwendung der von TRON bereitgestellten mRNAs, vom Projektleiter in ersten Krankheitsmodellen genutzt werden konnten. Diese Erkenntnisse dienen nun als Grundlage für weitere Experimente, die von den Projektleitern aus dem CTH nachverfolgt werden können. So legen diese anfänglichen Analysen einen Grundstein für die spezifische Targetierung des Sphingolipid-Stoffwechsels, die in der Entwicklung von Präventionstherapien der Atherothrombose genutzt werden könnten. Zusätzlich ist hervorzuheben, dass die Erkenntnisse aus der Targetierung dieser Zielstrukturen in der zweiten Projektphase des microbAIome-Projektes, sowie für Partnerprojektes dieses von Nutzen sein können und somit auch langfristig für die Entwicklung von mRNA-basierten Therapeutika im kardiovaskulären Umfeld dienen.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektlaufzeit sind keine Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen bekannt geworden.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen nach Nr. 5 NKBF

- 1nd curAMeet Cluster Conference, 06.02.2024, Mainz, Deutschland - Poster Präsentation
  - vorgetragen von der Projektleitung (CTH)
- 2nd curAMeet Cluster Conference, 11.03.2025, Mainz, Deutschland - Poster Präsentation
  - vorgetragen von der Projektleitung (CTH)
- 3nd curAMeet Cluster Conference, 24.02.2026, Mainz, Deutschland – Vortrag
  - vorgetragen von Olga Dremova (CTH)