

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: LMU Klinikum
Medizinische Klinik und Poliklinik I

Projektleiterin: Dr. Tonina Müller/ Prof. Dr. Christian Schulz

Projekttitel: Temporally controlled mapping of newly synthesized myeloid proteomes in myocardial infarction

Projekttyp: Kooperation mit externen Partnern
DZHK B 23-006 Ext

Förderkennzeichen: 81X2600280

Laufzeit des Projektes: 01.04.2023 - 30.09.2025

Kurzbericht zu:

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

1. der ursprünglichen Aufgabenstellung

Residente Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle für die Gewebemöostase und erhalten sich durch lokale Proliferation. Beim Myokardinfarkt werden Neutrophile rasch in das Infarktareal rekrutiert, um durch die Freisetzung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies die Immunantwort einzuleiten. Im Gegensatz zu Neutrophilen spielen residente Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Auflösung der Entzündung und der Geweberegeneration nach einem Myokardinfarkt. Trotz der breiten Verfügbarkeit der RNA-Sequenzierung, die die Charakterisierung grundlegender molekularer Veränderungen in myeloiden Zellen ermöglicht, war die Analyse des zellspezifischen Proteoms in vivo bislang nicht möglich.

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

In den letzten Jahren wurde die Heterogenität von Makrophagen mit ihrer unterschiedlichen Herkunft in Verbindung gebracht. Die meisten gewebsresidenten Makrophagen stammen von embryonalen Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab und persistieren in den meisten adulten Geweben, einschließlich des Herzens. Sie spielen beim Myokardinfarkt eine kardioprotektive

Rolle, indem sie die Auflösung der Entzündung, die Angiogenese und die Geweberegeneration fördern.

Neutrophile werden nach einem Infarkt rasch in das Herz rekrutiert, wo sie proinflammatorische Zytokine, neutrophile extrazelluläre Traps (NETs), extrazelluläre Vesikel und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen. Sie treiben die Entzündung voran und orchestrieren die frühe Immunantwort. Neben ihrer proinflammatorischen Rolle interagieren sie mit Makrophagen und steuern deren Differenzierung hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp.

Bislang konnte das zellspezifische Proteom von Makrophagen und Neutrophilen nach ihrer Isolation aus entnommenen Organen sowie durch In-vitro-Kultivierung untersucht. Diese Studien sind limitiert durch die Verwendung isolierter Zellen wodurch das Sekretom sowie dessen mögliche Rolle bei der Orchestrierung der Immunantwort in vivo nicht analysiert werden kann.

In diesem Projekt wenden wir ein neues Mausmodell an, um eine zellselektive metabolische Markierung in myeloiden Immunzellen mit der nichtkanonischen Aminosäure Azidonorleucin (ANL) zu erreichen. Während ANL von der endogenen Translationsmaschinerie nicht genutzt wird, wird es durch eine gentechnisch veränderte Methionyl-tRNA-Synthetase (L274G, MetRS*) aktiviert und anschließend von MetRS*-exprimierenden Zellen als Ersatz für Methionin eingebaut. Proteine mit Met-ANL-Substitutionen werden anschließend spezifisch mithilfe der Click-Chemie angereichert, was die Extraktion zelltypspezifischer Proteine direkt aus Geweben ohne jegliche physische Manipulation der Zellen ermöglicht – selbst bei Vorhandensein eines großen Backgrounds nicht markierter Proteine.

3. dem Ablauf des Vorhabens

Zunächst erfolgte eine Optimierung des experimentellen Protokolls für die in vivo-Applikation von ANL, um eine zuverlässige Markierung der Proteine zu erreichen ohne Toxizität für die Tiere. Durch die Optimierung der Applikationsbedingungen stellen wir eine maximale Inkorporation von ANL in Zielproteine sicher und verbessern dadurch die Gesamtsensitivität und Zuverlässigkeit der nachgelagerten Analysen.

Die Gewinnung von Gewebeproben erfolgte im murinen Modellen nach Induktion eines Myokardinfarkts. Die gesammelten Proben wurden an das Labor von Felix Meissner in Bonn versandt, wo das Proteom mittels Click-Chemie aufgereinigt wurde und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert wurden.

Parallel dazu wurden histologische Analysen von Myokard- und weiteren Gewebeproben durchgeführt. Die für die Aufarbeitung und Färbung der meisten Gewebetypen erforderlichen Protokolle wurden optimiert und gewährleisten eine standardisierte histologische Auswertung.

4. den wesentlichen Ergebnissen des Vorhabens

Wir konnten zellspezifische Proteine von Neutrophilen sowie residenten Makrophagen nach Induktion eines Myokardinfarkts nachweisen, und hierbei zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine unterschiedliche Proteinexpression zeigen. Zudem Dabei gelangen uns durch unterschiedliche Applikation von ANL um verschiedene Zeitpunkte von Tag 1 bis Tag 14

abzubilden. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich unterschiedliche zeitliche Hochregulation spezifischer Proteine in Neutrophilen und residenten Makrophagen, was auf funktionell differenzierte Rollen dieser Zelltypen in den verschiedenen Phasen der Infarktantwort hinweist. Insbesondere konnten Proteine identifiziert werden, deren Expression früh nach dem Infarkt verstärkt auftrat und vermutlich an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt ist, während andere Proteine erst in späteren Zeitpunkten vermehrt exprimiert wurden und mit Prozessen der Entzündungsauflösung, Gewebereparatur und Regeneration assoziiert sein könnten. Diese zellspezifischen und zeitabhängigen Proteomveränderungen bilden eine wichtige Grundlage für weiterführende Analysen. In nachfolgenden Projekten sollen die identifizierten Proteine hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung und ihres Beitrags zur Regulation der Immunantwort nach Myokardinfarkt untersucht werden, um neue mechanistische Einsichten in die Rolle von Neutrophilen und Makrophagen im Verlauf des Myokardinfarkts zu gewinnen.

5. der Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine Zusammenarbeit erfolgte mit Prof. Felix Meissner, Universität Bonn.

München, den

.....
Dr. Tonina Müller

München, den 25.02.2026

.....
Prof. Dr. Christian Schulz

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger: LMU Klinikum
Medizinische Klinik und Poliklinik I

Projektleiterin: Dr. Tonina Müller/ Prof. Dr. Christian Schulz

Projekttitle: Temporally controlled mapping of newly synthesized myeloid proteomes in myocardial infarction

Projekttyp: Kooperation mit externen Partnern
DZHK B 23-006 Ext

Förderkennzeichen: 81X2600280

Laufzeit des Projektes: 01.04.2023 - 30.09.2025

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:

In Ziel 1 sollte zunächst das Proteom von Makrophagen und Neutrophilen in steady-state Kondition analysiert werden. Auf Grund von ausgeprägten Schwierigkeiten bei der Inkorporation von ANL und der deutlich verminderten Proteinsynthese ohne inflammatorischen Trigger ist war ein ausreichendes Labeling im Steady State mit dem bisherigen Mausmodell technisch bislang nicht umsetzbar. Dies soll in Anschlussprojekten in in neu generierten Mausmodell mit einer gesteigerten Effizienz der ANL Inkorporation umgesetzt werden (siehe 5.)

In Ziel 2 sollte das Proteom von Dottersackmakrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten in den ersten 14 Tagen nach permanenter und transients LAD Ligation im Infarktmodell untersucht werden. Dies konnte mittels oraler Inkorporation von ANL in den Mäusen erreicht werden. Dabei konnte eine unterschiedliche Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden und so die funktionale Bedeutung von Dottersackmakrophagen in der Infarktregeneration unterstrichen werden.

Zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs von residenten Makrophagen während der Infarktprogression wurde ein funktionelles Makrophagen-Panel für den Vergleich des

zellspezifischen Proteoms zwischen Tag 1 und Tag 4 nach Myokardinfarkt in RankCre⁺ Zellen genutzt. Diese Analyse zeigte eine deutliche Veränderung des Proteoms, [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass infarktassoziierte Makrophagen eine koordinierte funktionelle Erweiterung durchlaufen, [REDACTED]

[REDACTED]

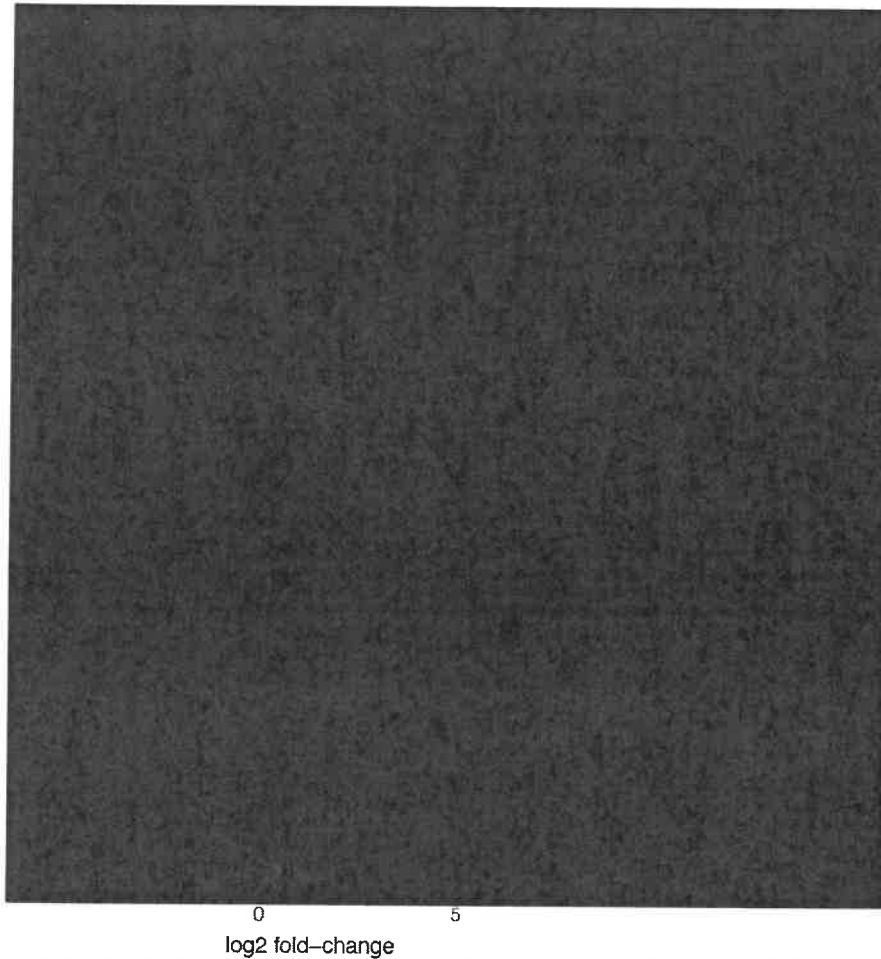
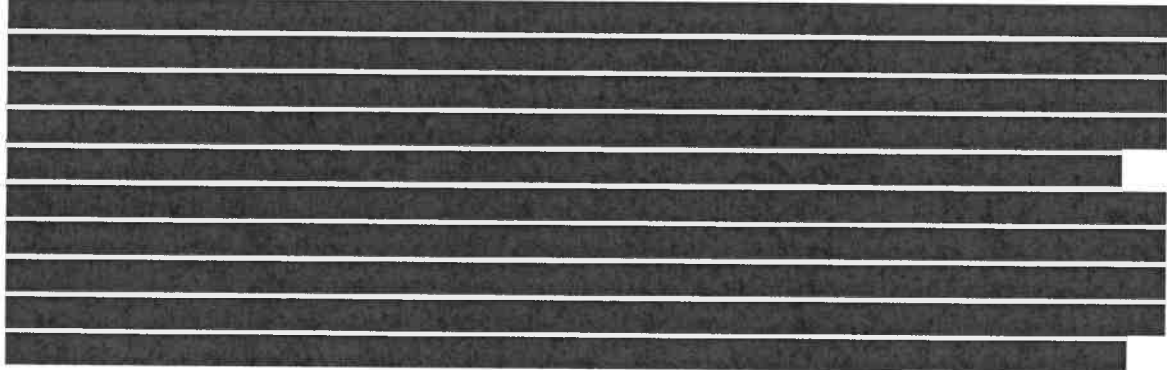


Abbildung 1: Zunahme des Proteoms residenter Makrophagen 4 Tage nach Myokardinfarkt



In Ziel 3 sollte das zeitabhängige Proteom von Neutrophilen nach Myokardinfarkt untersucht werden. Hierfür wurde ein Mrp8Cre Mausmodell gewählt. Aufgrund anfänglicher Schwierigkeiten in der länger andauernden Gabe von ANL wurde hierbei zunächst auf einen Zeitpunkt fokussiert und dabei das Proteom im Infarktareal (Herzapex) und des umgebenden Herzmuskels (Herzbasis) untersucht. Hierbei konnte in den unterschiedlichen Arealen eine deutlich veränderte Proteinexpression von Neutrophilen gezeigt werden.

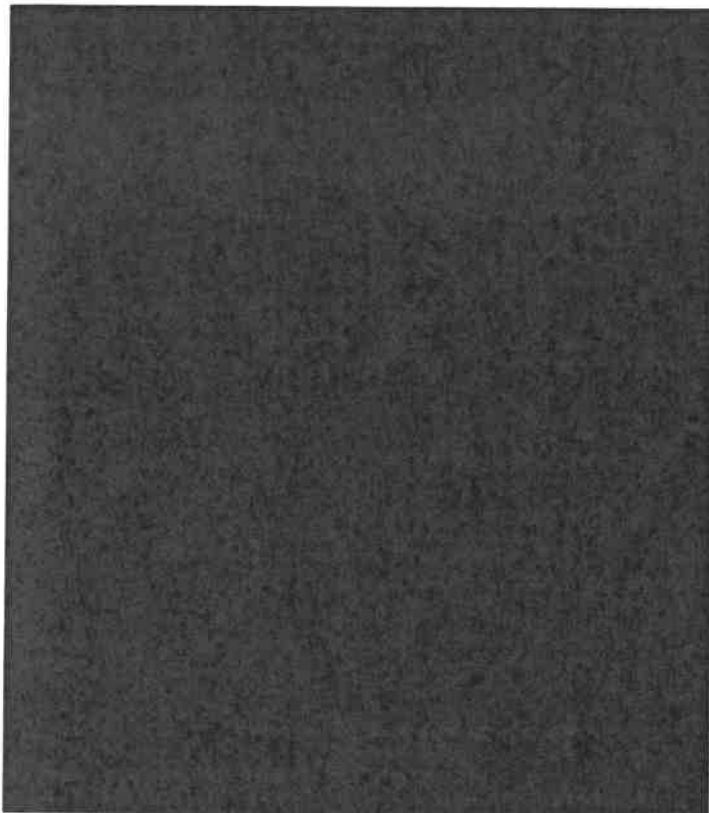
Es zeigten sich [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Zusammenfassend zeigen diese Daten, [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

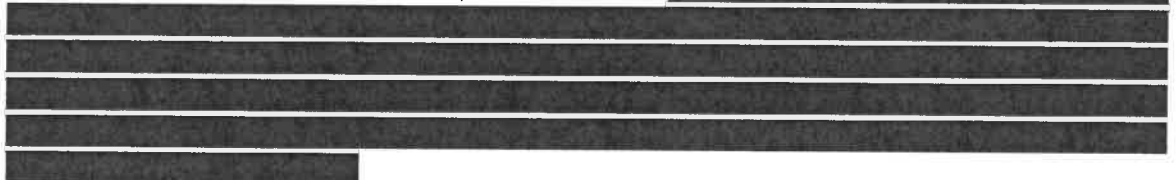
Diese Ergebnisse unterstreichen eine ausgeprägte lokal adaptierte Differenzierung nach kardialer Gewebeschädigung.



log2 fold-change

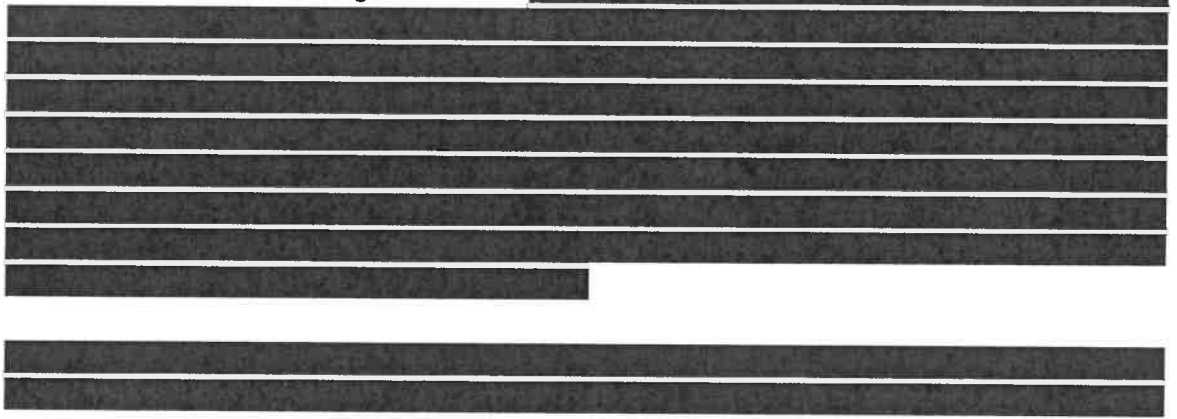
Abbildung 2: Unterschiede im Proteom Mrp8+ Zellen in Apex und Basis nach Myokardinfarkt

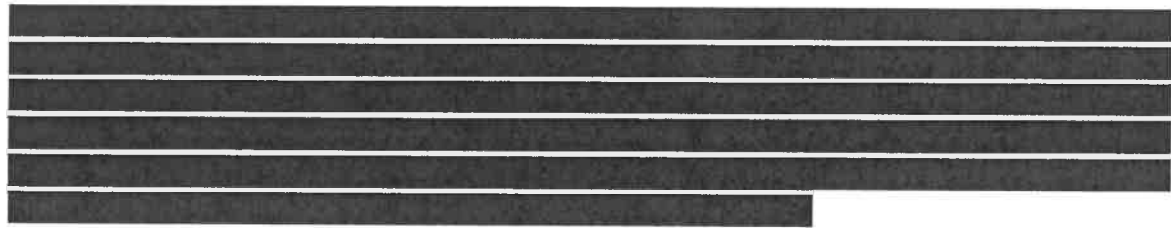
Vulcanoplot zum Vergleich der in Mrp8-Cre-MetRS-Herzen detektierten ANL-angereicherten Proteine zwischen Apex (Infarktareal) und Herzbasis.



Es erfolgte zudem der Vergleich des Neutrophilen Proteoms nach Myokardinfarkt sowie nach einer bakteriellen Infektion in der Leber. Der Vergleich erfolgte ausschließlich auf Basis der angereicherten Fraktionen und schloss keine no-ANL-Hintergrundkontrollen ein.

Die Gesamtzusammensetzung der angereicherten Fraktion unterschied sich deutlich zwischen beiden Entzündungsreaktionen.





Da diese Analyse keine Korrektur anhand von no-ANL-Kontrollen beinhaltet, spiegeln die Ergebnisse primär zustandsabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung der ANL-angereicherten Fraktion wider und können auch unspezifische Ko-Anreicherungen von gewebs- oder plasmaderivierten Proteinen umfassen. Die beobachteten Veränderungen sollten daher als Unterschiede in der Zusammensetzung der angereicherten Fraktion interpretiert werden und nicht als eindeutiger Nachweis einer intrinsischen translationsbezogenen Reprogrammierung.

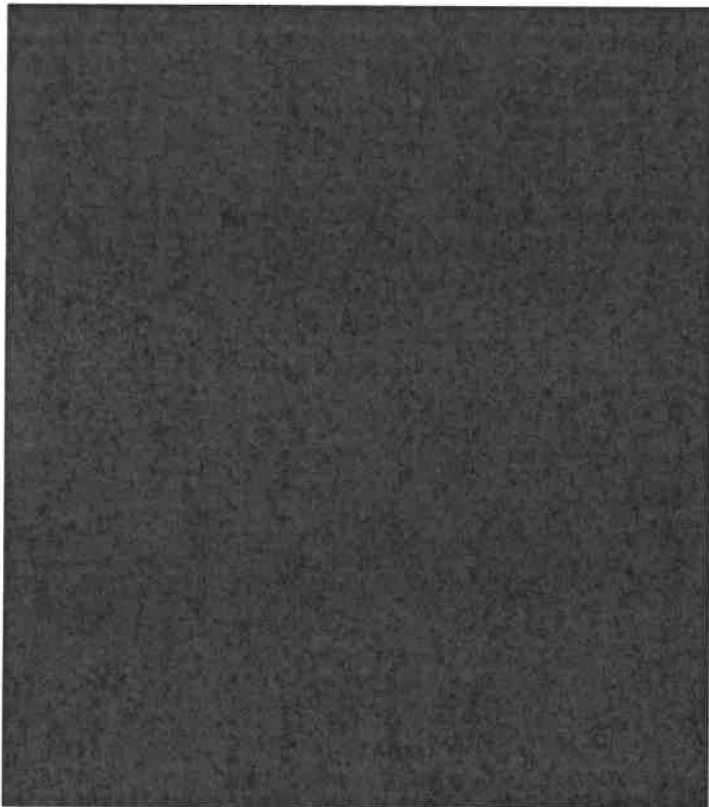
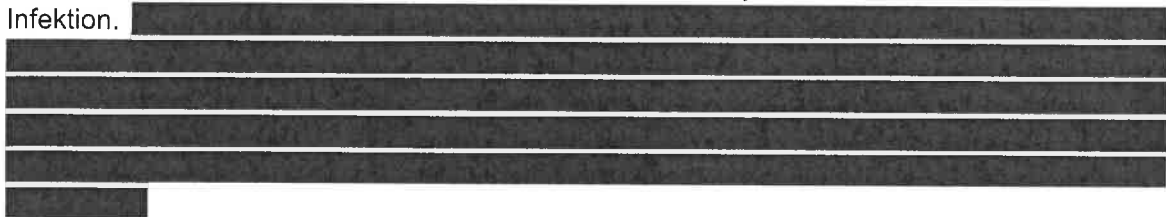


Abbildung 3: Unterschiedliche Zusammensetzung der ANL-angereicherten Fraktion in Mrp8-Cre-Herzen nach Myokardinfarkt oder Infektion (Apex).

Vulcanoplot zum Vergleich der in der Herzspitze (Apex) detektierten ANL-angereicherten Proteine in Mrp8-Cre-MetRS-Herzen nach sterilem Myokardinfarkt versus bakterieller Infektion.



2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die Förderung umfasste Sachmittel zur BONCAT Labeling und FUNCAT Staining (17.800€, LMU München) sowie zur Aufreinigung der Proben und Durchführung der Massenspektrometrie (29.400€, Bonn).

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Im Rahmen der präklinischen Forschung werden ausgezeichnete wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners (i.e. beteiligte Shared Expertise) bzw. eines nicht-DZHK-Partners zur Verfügung gestellt. In diesem Projekt wurde die Expertise von Prof. Dr. Felix Meissner (Bonn) in der Proteomanalyse unter Verwendung eines spezifischen Mausmodells der metabolischen Proteommarkierung genutzt. Aufbauend auf seinen früheren Arbeiten zur direkten proteomischen Quantifizierung von Makrophagen-Sekretomen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried hat die Arbeitsgruppe von Prof. Meissner Methoden zur zellspezifischen Proteommarkierung etabliert und die Detektion von MetRS*-markierten Proteinen systematisch optimiert.

Residente Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle für die Gewebemöostase und erhalten sich durch lokale Proliferation, wohingegen im Rahmen eines Myokardinfarkts Neutrophile rasch in das Infarktareal rekrutiert werden, um durch die Freisetzung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies die Immunantwort einzuleiten. Im Gegensatz zu Neutrophilen spielen residente Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Auflösung der Entzündung und der Geweberegeneration nach einem Myokardinfarkt. Trotz der breiten Verfügbarkeit der RNA-Sequenzierung, die die Charakterisierung grundlegender molekularer Veränderungen in myeloiden Zellen ermöglicht, war die Analyse des zellspezifischen Proteoms in vivo bislang nicht möglich.

In diesem Projekt konnten wir erstmals mittels metabolischer Markierung das zellspezifische Proteom von residenten Makrophagen und Neutrophilen im Myokardinfarkt nachweisen.

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

Die erzielten Ergebnisse sind die Grundlage für weitere Projekte auf dem Gebiet der zellspezifischen Regulation der Immunantwort nach einem Myokardinfarkt. Identifizierte Proteine stellen die Basis für weitergehende funktionale Untersuchungen dar.

Die Ergebnisse konnten im Rahmen eines Beitrags beim TRR-332-Meeting vorgestellt werden und bildeten eine Grundlage für die Nutzung des Modells für weitere wissenschaftliche Fragestellungen innerhalb des Konsortiums.

Die Ergebnisse sollen zudem zeitnah im Rahmen einer gemeinsamen Publikation zur Verfügung gestellt werden.

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

Während der Durchführung der Analysen konnte ein optimiertes Mausmodell in der Arbeitsgruppe Schuman/ Castelaró-Alvarez entwickelt werden (<https://doi.org/10.1038/s41684-025-01589-2>). Das neue 3xMetRS*-Mausmodell verbessert das bestehende BONCAT-System durch eine deutlich erhöhte Effizienz der ANL-Inkorporation und damit eine gesteigerte Sensitivität sowie zeitliche Auflösung der Proteommarkierung. Die Notwendigkeit einer Methionin-Depletion entfällt, was die physiologische Belastung der Tiere reduziert und die experimentelle Handhabung sowie Reproduzierbarkeit verbessert.

Die zelltypspezifische Proteommarkierung ist zudem bereits in heterozygoten Tieren zuverlässig möglich, wodurch das Modell einfacher in genetische Modelle integriert werden kann. Aufgrund der hohen Sensitivität erlaubt das System zudem die Analyse sehr kleiner Zellpopulationen in vivo und die Detektion neu synthetisierter Proteine bereits nach kurzen Markierungsintervallen. Insgesamt stellt das 3xMetRS*-Mausmodell ein leistungsfähiges und überlegenes Werkzeug für die zelltypspezifische Proteomanalyse in vivo dar, welches wir zeitnah einsetzen möchten, um unser Projekt fortzuführen.

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Im Rahmen dieses Projekts wurden folgende Publikationen veröffentlicht / sind folgende Kongressbeiträge erfolgt:

Neutrophils and T helper cells counterregulate coagulation in systemic infection. TRR332 Meeting, September 2023, Essen.

München, den

.....
Dr. Tonina Müller

Mannheim, den

.....
Prof. Dr. Christian Schulz