

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Max-Planck Institut für Herz und Lungenforschung

Projektleiter: Dr. Arica Beisaw

Projekttitle: Leveraging mechanisms from zebrafish to promote engraftment of transplanted human cardiomyocytes

Säule B

Förderkennzeichen: 81X2200317

Laufzeit des Projekts: 01.04.2022 – 31.03.2023

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung,

Ziel unseres Projekts war es, die Mechanismen zu nutzen, die der Invasion von Kardiomyozyten in fibrotisches Narbengewebe zugrunde liegen (Beisaw), um das Einwachsen transplantiert menschlicher Kardiomyozyten in präklinischen Säugetiermodellen zu fördern (Weinberger). Wir führten eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung der Grenzzone in regenerierenden Zebrafischherzen durch, um Regulatoren der Kardiomyozyteninvasion zu finden, und untersuchten die Rolle eines Kandidaten, *mmp14b*, in diesem Prozess. Darüber hinaus haben wir *MMP14*-überexprimierende menschliche iPSC erzeugt, um festzustellen, ob die Überexpression von *MMP14* das Einwachsen menschlicher Kardiomyozyten in die fibrotische Narbe des infarzierten Säugetierherzens fördern kann.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

Das Projekt wurde im Rahmen der Säule B („Präklinische Forschung“) des DZHKs durchgeführt, bei der die Finanzierung durch die flexiblen Mittel des DZHKs bei Beteiligung von mindestens zwei DZHK-Partnerstandorten bzw. einem DZHK-Partnerstandort mit einem nicht-DZHK-Partner erfolgt. Die entsprechenden Vorgaben wurden beachtet und das Projekt mit der Untersuchung der Kardiomyozyteninvasion im Zebrafisch wurde hauptsächlich am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (DZHK-Standort Rhein-Main) in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie in Hamburg (DZHK-Standort Hamburg/Kiel/Lübeck) durchgeführt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Ziel unseres Projekts war es, molekulare und zelluläre Mechanismen zu bestimmen, die die Invasion von Kardiomyozyten in fibrotisches Narbengewebe in regenerierenden Zebrafischherzen regulieren, und diese Mechanismen zu nutzen, um das Einwachsen transplantiert menschlicher iPSC-Kardiomyozyten in einem Säugetier-Myokardinfarktmodell zu fördern. Zu diesem Zweck haben wir genetische Modelle zum Knockout von *mmp14b*, einem Matrix-Metalloproteinase-Gen, das in Kardiomyozyten der Grenzzone und in

Makrophagen exprimiert wird, entwickelt und die Rolle von Mmp14b bei der Kardiomyozyteninvasion untersucht. Darüber hinaus führten wir eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung von Zellen der Randzone in regenerierenden Zebrafischherzen durch, um nach potenziellen Regulatoren des Kardiomyozyteninvasionsprozesses zu suchen. Schließlich war es unser Ziel, MMP14-überexprimierende humane iPSC-Zellen zu erzeugen, um festzustellen, ob die Überexpression von MMP14 in humanen Kardiomyozyten deren Einnistung in fibrotisches Narbengewebe in infarzierten Säugetierherzen fördern kann.

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,

Es wurde die gesamte Information bzgl der wissenschaftlichen Literatur der Datenbank Pubmed sowie öffentlich zugänglich Datenbanken (z.B. UCSD, GEO) genutzt. Allgemeine Recherchen wurden z.B. mit Pubmed und Google durchgeführt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen erfolgte mit:

- Prof. Dr. Didier Stainier, Abteilung III - Developmental Genetics, Max-Planck-Institut for Heart and Lung Research in Bad Nauheim (DZHK Rhein-Main)
- MD Florian Weinberger, Institut of Experimental Pharmacology and Toxicology, UKE Hamburg (DZHK Hamburg/Kiel/Lübeck)

II. Eingehende Darstellung zu

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

In Ziel 1 war es unser Anliegen, die molekularen und zellulären Mechanismen der Kardiomyozyteninvasion in sich regenerierenden Zebrafischherzen zu untersuchen. Wir priorisierten ein Kandidatengen, *mmp14b*, und erzeugten genetische Knockout-Modelle, um die Funktion von Mmp14b bei der Kardiomyozyteninvasion zu verstehen. Wir versuchten, konditionale *mmp14b*-Allele für einen zelltypspezifischen Knockout in adulten Zebrafischen zu erzeugen. Wir waren aber nicht erfolgreich, da sie verkürzte loxP-Stellen in den *mmp14b*-Genlocus integrierten, die nicht mit dem Cre/loxP-Rekombinasesystem verwendet werden konnten. Daher erzeugten wir eine vollständige Deletionsmutante, um die Rolle von Mmp14b bei der Kardiomyozyteninvasion zu untersuchen. Wir stellten fest, dass Mmp14b für die Makrophagenrekrutierung in die Grenzzone, den Umbau der extrazellulären Matrix und die Kardiomyozyteninvasion in das fibrotische Narbengewebe in regenerierenden Zebrafischherzen essentiell ist. Wir haben auch erfolgreich eine Kardiomyozyten-spezifische *mmp14b*-Überexpressionslinie hergestellt und untersuchen derzeit die Auswirkungen der

mmp14b-Überexpression auf die Migration/Invasion von Kardiomyozyten in In-vitro- und In-vivo-Modellen. Um weitere Kandidatengene zu entdecken, die den Prozess der Kardiomyozyteninvasion regulieren, haben wir eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung der Randzone von regenerierenden Herzen durchgeführt. Diese Analyse führte zu einer Reihe von priorisierten Kandidatengenen, die die Kardiomyozyteninvasion fördern könnten, und wir generieren derzeit Loss-of-Function- und Überexpressions-Allele, um ihre Funktion bei der Kardiomyozyteninvasion zu untersuchen.

In Ziel 2 wollten wir herausfinden, ob eine Überexpression von *MMP14* in menschlichen iPSC-Kardiomyozyten das Einwachsen in fibrotisches Narbengewebe in Säugetierherzen fördern kann. Mittels CRISPR/Cas9 wurde eine Matrix-Metalloproteinase 14 (*MMP14*)-überexprimierende induzierte pluripotente Stammzelllinie (*MMP14*-OE) hergestellt. Hierfür wurde ein *MMP14*-Konstrukt in den AAVS1-Lokus von induzierten pluripotenten Stammzellen eingebracht. Die korrekte Integration wurde mittels Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Es wurden Master- und Arbeitszellbanken der *MMP14*-OE Zelllinie hergestellt. Die *MMP14*-Überexpression wurde durch Immunfluoreszenz Färbungen nachgewiesen. Zur Durchführung der Tierversuche wurde ein Tierversuchsantrag bei der Behörde für Justiz und Verbraucherschutz eingereicht und durch die Behörde bewilligt. Bei der kardialen Differenzierung zeigte sich jedoch, dass die *MMP14*-OE iPS-Zellen nicht zu Kardiomyozyten differenzieren, sodass ein induzierbares System etabliert wurde. Hierunter kann durch die Gabe eines Tetrazyklinantibiotikums die Überexpression eines Proteins, nach erfolgreicher kardialer Differenzierung, erfolgen. Dies wurde zunächst mit einem grün-fluoreszierenden Protein erfolgreich etabliert und soll nun im nächsten Schritt für *MMP14* erfolgen.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die Förderung umfasst 24.266,50 €. Die tatsächliche Mittelverwendung wichen leicht von der geplanten Mittelverwendung ab. Da keine Inlandreisen stattgefunden haben, wurde entsprechend mehr Verbrauchsmaterialien gekauft. Die Umwidmung der Reisekosten in Verbrauchsmaterialien lag unter 20%.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Die durchgeführten Forschungsarbeiten sowie die dafür aufgewandten Ressourcen waren notwendig und angemessen, da sie der im Projektantrag formulierten Planung im Wesentlichen entsprachen. Die im Arbeitsplan formulierten Aufgaben alle erfolgreich bearbeitet werden.

Dieses Projekt ist für die kardiovaskuläre Forschung von Bedeutung, da wir die Effizienz therapeutischer Strategien zur Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt mit Hilfe von Erkenntnissen aus regenerativen Organismen erhöhen wollen. Therapeutische Strategien zur Verwendung von gentechnisch verändertem Herzgewebe (aus hiPSCs) zur Behandlung von Herzinsuffizienz sind in Deutschland in ersten klinischen Studien am Menschen erprobt worden, aber die Forschung in präklinischen Modellen hat gezeigt, dass der Prozentsatz der Kardiomyozyten, die nach einem Infarkt in fibrotisches Narbengewebe

einwachsen, gering ist. Unser Ziel ist es, die Transplantationsrate zu erhöhen, indem wir die Mechanismen der natürlichen Kardiomyozyteninvasion im sich regenerierenden Zebrafischherz nutzen.

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

Wir planen, die Ergebnisse dieser Studien bis September 2023 zur Veröffentlichung in einer international anerkannten wissenschaftlichen Zeitschrift einzureichen. Darüber hinaus wird die Untersuchung von Kandidatengenen zur Regulierung der Kardiomyozyteninvasion aus unserer Einzelzell-RNA-Sequenzierungsanalyse die Grundlage für Förderanträge bei der DFG, der Boehringer Ingelheim Stiftung und dem FEBS Excellence Award bilden.

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.

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.

Publikation: Die Einreichung der wissenschaftlichen Ergebnisse zur Veröffentlichung in einer Fachzeitschrift ist für September 2023 geplant.

Kongressbeiträge:

Talks: "Macrophage:Cardiomyocyte interaction in the regenerating heart". CPI Scientific Symposium – Cardiovascular repair and regeneration, Frankfurt, Deutschland, 2022.

Posters:

Arica Beisaw, Julia Dallmann, Stefan Guenther, Till Lautenschlaeger, and Didier Y.R. Stainier. "Macrophages regulate cardiomyocyte repopulation of fibrotic tissue during zebrafish heart regeneration". Weinstein Cardiovascular Development and Regeneration Conference. Mai 12-14, 2022. Marseille, Frankreich.

Arica Beisaw, Julia Dallmann, Stefan Guenther, Till Lautenschlaeger, and Didier Y.R. Stainier. "Macrophages regulate cardiomyocyte repopulation of fibrotic tissue during zebrafish heart regeneration". Presented at the Gordon Research Conference for Cardiac Regulatory Mechanisms. June 25-July 1, 2022. New London, NH, USA

Bad Nauheim, 24.08.2023

Datum

Unterschrift des/r Projektleiters/in

Dr. Arica Beisaw