

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger: Georg-August-Universität Göttingen
Universitätsmedizin Göttingen

Projektleiter*in: Prof. Dr. Laura Zelarayán

Projekttitle: Rewiring of endogenous signaling pathways to restore homeostasis in the injured mammalian heart

Förderkennzeichen: 81X4300106

Laufzeit des Projektes: 01.04.2021 – 30.04.2023

Kurzbericht zu:

1. der ursprünglichen Aufgabenstellung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVDs) sind mit einer Transkriptionsstörung verbunden, die mehrere Signalwege betrifft. Es wäre wünschenswert, die Transkriptionsfaktoren (TFs), die diese Störung koordinieren, zu modulieren, aber diese Modulation ist durch konventionelle Verfahren begrenzt. Heute stehen die CRISPR/Cas9-basierten Technologien an vorderster Front der Genom-Engineering-Tools und ermöglichen die präzise und kontrollierbare Modulation der endogenen Transkription. Dabei bieten sie die Möglichkeit, das Zellverhalten und die Gewebefunktion in vivo zu programmieren. Wir haben jedoch ein unvollständiges Bild davon, wie genau die Netzwerkaktivierung, die zu transkriptomischen Veränderungen führt, phänotypische Effekte vermittelt. Ziel dieses Forschungsprojekts ist die Etablierung und Validierung von Werkzeugen zur Identifizierung kontextspezifischer, endogen steuerbarer und synergistischer Transkriptionsnetzwerke zur Wiederherstellung der Homöostase im kranken Säugetierherzen. Hier wird (I) die CRISPR-Aktivierung (a) mit Einzelzell-Transkriptomdaten (scRNA-Seq) kombiniert, um Kardiomyozyten-(CM)-spezifische transkriptionelle Dysregulation unter Stress genau zu identifizieren und (II) diese Daten zu nutzen, um dynamische Genregulation abzuleiten Netzwerke (GRNs) und zielgerichtete Schlüsselregulatoren zu identifizieren, die mit relevanten Signalwegen verbunden sind.

Um zielgerichtete synergistische Schlüsselregulatoren zur Wiederherstellung der Herzhomöostase zu entschlüsseln, werden transkriptionelle Einzelzell-Gene Networks in akuten und chronischen kardialen hypertrophen Modellen (hervorgerufen durch transversale Aortenverengung (TAC)) entschlüsselt.

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

Es besteht weltweit ein ungedeckter klinischer Bedarf an therapeutischen Strategien, die auf multiple Transkriptionsstörungen abzielen, um komplexe Krankheiten zu behandeln und das Herz vor dem Versagen zu bewahren. Idealerweise zielt eine Komponente dieses Ansatzes auf transkriptionelle regulatorische Elemente (TRE) ab, den Konvergenzpunkt mehrerer Signalwege, die synergetisch mehrere Gene kontrollieren. Die Herausforderung der strengen Kontrolle der endogenen Genexpression in vivo wurde durch die Entwicklung von CRISPR-Systemen in Verbindung mit Transkriptionsmodifikatoren überwunden. Dieses Werkzeug ermöglicht die therapeutische Umprogrammierung des Zell- und Gewebeverhaltens. Für die Modellierung und Behandlung von Krankheiten könnte die gleichzeitige Aktivierung und Unterdrückung mehrerer Gene, die die Genregulation abzuleiten Netzwerke GRN beeinflussen, im Vordergrund neuartiger netzwerkbasierter Methoden stehen, die die nächste große Klasse therapeutischer Ziele darstellen, allerdings fehlt noch ein realistischer Ansatz für die Anwendung einer solchen Therapie. Die CRISPR-vermittelte

Transkriptionskontrolle bietet eine Plattform für leistungsstarke personalisierte Therapeutika. Um die Funktion von Genen und GRN im Zusammenhang mit komplexen Krankheiten zu untersuchen, haben wir in Zusammenarbeit mit dem Labor von Eric Olson (University of Texas Southwestern Medical Center, USA) ein In-vivo-Instrument entwickelt, mit dem die Genexpression auf kontrollierbare und endogene Weise mit dem CRISPR/Cas9-System beeinflusst werden kann. Das Modell besteht aus einem künstlich hergestellten katalytisch inaktiven dCas9, das mit dem VPR-Transkriptionsaktivator fusioniert ist und in CM durch den Myh6-Promotor exprimiert wird. Mit der systemischen Verabreichung von (g)RNAs durch einen AAV-Vektor, der dCas9 in die Promotorregion des Gens von Interesse bringt, kann die Transkription in der nativen zellulären Umgebung auf robuste, spezifische, schnelle, titrierbare und reversible Weise mit spezifischen genomweiten On-Target-Effekten induziert werden, wodurch unerwünschte schädliche Wirkungen im Mausherz begrenzt werden.

3. dem Ablauf des Vorhabens

Das Projekt besteht aus 3 Arbeitspaketen (WP). Im Göttinger Projektteil wurden WP1, WP3 bearbeitet. WP2 wurde vom Kooperationspartner in Heidelberg bearbeitet.

WP1. Profil des In-vivo-Single-Zell-Transkriptoms von Kardiomyozyten (KM) nach hypertrophem Remodeling.

WP2. Die KM-spezifische In-vivo- Gene Network-Dynamik bei hypertrophem Remodeling in verschiedene Stadien wurde abgeleitet. In der Top-10-Liste, haben wir KLF15 und abhängige Netzwerke mit einer Veränderung der Aktivität zwischen den Bedingungen entdeckt.

WP3. KLF15-CM-spezifisches in-vivo-Gene Network wurde mittels CRISPRa-AAV während Herzremodeling wiederhergestellt, um endogene Signalwege anzugreifen. Hier wurde eine kardiale funktionelle und molekulare homoestatische Wiederherstellung beobachtet.

Es gab eine Laufzeitverlängerung bis 30.04.2023, da es durch die Pandemie und die damit verbundene Priorisierung zu Verzögerungen bei der Lieferung von AAVs kam und somit Experimente verspätet gestartet werden konnte.

4. den wesentlichen Ergebnissen des Vorhabens

Durch netzwerkbasierendes maschinelles Lernen von Einzelzelltranskriptomen des Herzens haben wir herausgefunden, dass die Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors KLF15 und deren Netzwerk den Übergang zum Herzmuskelversagen fördert. Wir zeigen, dass die Wiederherstellung der endogenen Klf15-Expression in Kardiomyozyten mittels CRISPR/Nuklease-defizienter (d)Cas9-basierter Technologie den pathologischen Herzumbau abschwächt und die Herzfunktion sowohl bei Mäusen als auch in einem 3D-Modell des menschlichen Herzmuskels erhält. Schließlich generierten und validierten wir in vivo und in menschlichem Herzgewebe eine therapeutisch einsetzbare mini-dCas9VPR-Variante, die eine endogene Genaktivierung auslöste, die sich für eine adeno-assoziierte Virusübertragung eignet. Diese Proof-of-Concept-Arbeit stellt eine therapeutische Strategie vor, die es ermöglicht, die stressvermittelte Herunterregulierung von Schlüsselgenen, die normalerweise die Herzfunktion erhalten, endogen wiederherzustellen, um Herzversagen mit Hilfe der eigenen Zellmaschinerie zu verhindern.

5. der Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen erfolgte mit Prof. Dr. Christoph Dieterich, Bioinformatics & Systems Cardiology, Klaus Tschira Institute for Integrative Computational Cardiology & Department of Internal Medicine III, Heidelberg University

Göttingen, den 23.10.2023

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger: Georg-August-Universität Göttingen
Universitätsmedizin Göttingen

Projektleiter*in: Prof. Dr. Laura Zelarayán

Projekttitle: Rewiring of endogenous signaling pathways to restore homeostasis in the injured mammalian heart

Förderkennzeichen: 81X4300106

Laufzeit des Projektes: 01.04.2021 – 30.04.2023

Eingehende Darstellung zu:

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

WP1. Profil des In-vivo-Single-Zell-Transkriptoms von Kardiomyozyten (KM) nach hypertrophem Remodeling (Göttingen). Adulte Mäuse wurden TAC- und Sham-Interventionen unterzogen und die Herzen wurden 3 Tage (kompensatorisch) und 10 Wochen (Failing-Phase) später präpariert. Eine KM-angereicherte Fraktion wurde mit einer modifizierten Langendorff-Perfusion für scRNA-Seq gewonnen.

WP2. Die KM-spezifische In-vivo- Gene Network-Dynamik bei hypertrophem Remodeling in verschiedene Stadien wurde abgeleitet. Die primäre und downstream Analyse auf Zell- und Genebene wurde durchgeführt, um das KM-network zu identifizieren. Hier können wir die GO-Analyse der am stärksten differenziell exprimierten Gene beobachten, die einen deutlichen Unterschied in den biologischen Prozessen zwischen den "Sham" (gesund) und den "TAC" (Hypertrophie)-Bedingungen zeigt. Eine Korrelation zwischen Ejektionsfraktion und den Stress-Score bestätigt das Krankheitsmodell. Die Inferenz von Transkriptionsfaktoren wurde mit BITFAM durchgeführt und WP2 abgeschlossen. In der Top-10-Liste, haben wir KLF15 und abhängige Netzwerke mit einer Veränderung der Aktivität zwischen den Bedingungen entdeckt.

WP3. KLF15-CM-spezifisches in-vivo-Gene Network wurde mittels CRISPRa-AAV während Herzremodeling wiederhergestellt, um endogene Signalwege anzugreifen. Hier wurde eine kardiale funktionelle und molekulare homoestatische Wiederherstellung beobachtet.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die Förderung umfasste am Göttinger Partnerstandort Personalmittel für einen Doktoranden TV-L 65% E13.2 * 6 months (3,9 PM) und Sachmittel 14.311 Euros.

Die Mittel wurden wie geplant eingesetzt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Die Arbeiten wurden im Wesentlichen wie geplant durchgeführt.

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

Die anvisierten Ziele wurden erreicht und die Daten wurden analysiert. Wir planen die Ergebnisse in 2024 zu publizieren.

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.

Im Rahmen dieses Projekts sind die folgenden Veröffentlichungen entstanden:

Abstracts:

1. Elucidating the role of cell interaction in progressive tissue remodeling upon heart failure progression

F. Bleckwedel^{1,2}, E. Schoger^{1,2,3}, Janek Fischer^{1,2}, Kamal Hazzouri^{1,2}, E. Boileau^{4,5}, Gabriela Salinas⁶, C. Dieterich^{4,5}, L. C. Zelarayán^{1,2,3}

¹ Institute of Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Göttingen (UMG), Göttingen, Germany

² German Center for Cardiovascular Research (DZHK) - Partner site Göttingen, Germany

³ Cluster of Excellence "Multiscale Bioimaging: from Molecular Machines to Networks of Excitable Cells" (MBExC), University of Göttingen, Germany

⁴ Klaus Tschira Institute for Integrative Computational Cardiology, Department of Internal Medicine III, University Hospital Heidelberg

⁵ German Center for Cardiovascular Research (DZHK) - Partner site Heidelberg/Mannheim

⁶ NGS- Integrative Genomics Core Unit (NIG)

DGK Herztag 2022, 29.09-01.10. 2023 Bonn (Abstract 331)

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V.

2. Single cell identification of cardiomyocytes' transcription factors involved in transition to heart failure.

F. Bleckwedel^{1,2}, E. Schoger^{1,2,3}, E. Boileau^{4,5}, C. Dieterich^{4,5}, L. C. Zelarayán^{1,2,3}

¹ Institute of Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Göttingen (UMG), Göttingen, Germany

² German Center for Cardiovascular Research (DZHK) - Partner site Göttingen, Germany

³ Cluster of Excellence "Multiscale Bioimaging: from Molecular Machines to Networks of Excitable Cells" (MBExC), University of Göttingen, Germany

⁴Klaus Tschira Institute for Integrative Computational Cardiology, Department of Internal Medicine III, University Hospital Heidelberg

⁵ German Center for Cardiovascular Research (DZHK) - Partner site Heidelberg/Mannheim

KEYSTONE SYMPOSIA

on Molecular and Cellular Biology

Heart Development and Disease: From Genes to Cures (B1)

February 12-15, 2023 • Santa Fe, NM, USA

Göttingen, den 23.10.2023