

- Muster Zusammenfassung -

Chen Rui Dr. med.

Development of an inducible transgenic mouse model that overexpresses crucial transcription factors for tendon regeneration

Fach/Einrichtung: Universität Heidelberg Institut für Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Thomas Skutella

Die partielle Reprogrammierung von adulten Sehnenzellen nach einer Verletzung durch Etablierung eines temporären und lokal begrenzten pluripotenten Zustands ist eine neuartige zelluläre molekulare therapeutische Strategie, um die Narbenbildung nach einer Verletzung zu begrenzen und die Regeneration des betroffenen Gewebes zu fördern (Lu et al., 2020; Sarkar et al., 2020; Wang et al., 2021). Narbenbildung und fehlerhafte Heilung treten nach Verletzungen von adultem Gewebe auf und begrenzen die Regeneration des betroffenen Gewebes.

Das Grundprinzip der zellulären Reprogrammierung in vivo besteht darin, die Proliferationsfähigkeit reprogrammierter Zellen durch Transformation/De-Differenzierung (Dedifferenzierung) zu fördern, was zur Bildung von Vorläuferzellen im verletzten Gewebe führt (Dedifferenzierung, Transdifferenzierung), die sich in die typischen Zielzellen dieses Gewebes differenzieren (Transdifferenzierung, Re-Differenzierung). Der Prozess der Dedifferenzierung wird in der Regel durch Yamanaka-Faktoren erreicht, und die Prozesse der Re- und Transdifferenzierung können durch Transkriptionsfaktoren erleichtert werden, die eine wichtige regulatorische Rolle bei der Entwicklung des Gewebes spielen, oder durch Transkriptionsfaktoren, die andere Zelltypen (Stammzellen oder Fibroblasten) direkt in funktionelle, reife, gewebetypische Zellen umwandeln können.

Nach Aktivierung mit Doxycyclin exprimieren endogene Scx-exprimierende (mit Scarlet markierte) Achillessehnen-Vorläuferzellen in der Mauslinie OSKM-Transkriptionsfaktoren (Oct3/4, Sox2, KLF4 und c-Myc), was zu einem lokal begrenzten pluripotenten Zustand der Zellen, einer gesteigerten Proliferationsfähigkeit und einem verbesserten zellulären Status (scheinbare Verjüngung) führt, wodurch die Reparatur verbessert und die Narbenbildung

reduziert wird. Gleichzeitig werden die vier wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der embryonalen Sehnenentwicklung, Td4F (Scx, Mxk, Egr1 und Egr2), parallel zu EmGFP exprimiert, wodurch das Zellschicksal eingeleitet, die Effizienz der Redifferenzierung in Zielzellen gefördert und die funktionelle Gewebereparatur verbessert wird. Die Nachbeobachtung wird soweit fortgesetzt, bis reife Achillessehnenzellen den Marker Typ-I-Kollagen (markiert mit BFP) stark exprimierten und Typ-III-Kollagen, den wichtigsten Kollagentyp bei der Narbenheilung, ersetzen.

Dementsprechend beabsichtigen wir, den Transkriptionsfaktor Td4F-OSKM in dieser Mutante nach experimenteller Sehnenverletzung zu aktivieren. Ziel ist es, OSKM-Faktoren in Sehnenläsionen zu induzieren, um die Bildung von Narbengewebe zu reduzieren und Td4F-Faktoren zu exprimieren, um die Differenzierung von Zellen in der Periwunde zu neuen Tenozyten (Sehnenzellen) zu fördern. Wir werden auch untersuchen, inwieweit die OSKM-vermittelte partielle Reprogrammierung den zellulären Zustand verbessert und welche Rolle die acht Transkriptionsfaktoren bei der Verringerung der in-situ-Fibrose spielen. Damit soll eine Grundlage geschaffen werden, die eine Gewebeheilung ermöglichen kann. Zu diesem Zweck werden histologische Nachkontrollen durchgeführt, um die Pathologie des geschädigten Sehnen Gewebes zu beurteilen. Diese werden mit der Untersuchung des Expressionsprofils der Fibrose und der embryonalen Sehnenentwicklung analysiert.

Um den oben genannten experimentellen Plan zu erreichen, ist es wichtig zu verstehen, inwieweit eine OSKM-vermittelte in situ Teilreprogrammierung die Fibrose reduzieren kann und ob temporäre und lokal begrenzte Achillessehnenzellen im pluripotenten Zustand durch Überexpression von Schlüsseltranskriptionsfaktoren in reife Achillessehnenzellen differenzieren können. Wir haben transgene Mauslinien mit induzierbarer Expression etabliert, die spezifisch zwei Klassen von (de-differenzierten und re-differenzierten) Transkriptionsfaktoren überexprimieren, sowie transgene Mauslinien mit fluoreszierenden Reportergenen, die den Status von Achillessehnenzellen durch fluoreszierende Proteine anzeigen. Damit wurden die Tiermodelle und die experimentelle Plattform für die Phase-II-Experimente etabliert.

Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D.L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M.S., *et al.* (2020). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 588, 124-129.

Sarkar, T.J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C.M., Chu, C.R., Horvath, S., Qi, L.S., *et al.* (2020). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat Commun* 11, 1545.

Wang, C., Rabadan Ros, R., Martinez-Redondo, P., Ma, Z., Shi, L., Xue, Y., Guillen-Guillen, I., Huang, L., Hishida, T., Liao, H.K., *et al.* (2021). In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun* 12, 3094.