

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Titelblatt zum Schlussbericht

(Gemäß Nrn. 6.6 BNBest-BMBF 98 bzw. 11.6 NKBF 98)

BOAC – Bone-on-a-Chip-System für die präklinische Untersuchung
neuer therapeutischer Ansätze für die autosomal rezessive Osteopetrose

– Teilprojekt B -

Zuwendungsempfänger: Charité Universitätsmedizin Berlin

Förderkennzeichen: FKZ 031L0234B (161L0234B)

Autoren: Dr. Sven Geißler & Dr. Nina Stelzer

Laufzeit: 01.01.2021 -31.05.2024

Vertraulichkeit: keine

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen FKZ 031L0234B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.

Kontaktperson: Dr. Sven Geißler
Straße: BCRT, Charité Universitätsmedizin Berlin, Föhrer Straße 15
PLZ Ort: 13353 Berlin
E-Mail: Sven.Geissler@Charite.de
Telefon: +49 30450 559539

Sachbericht zum Projekt (Teil I)

Vorhabenbezeichnung: BOAC – Bone-on-a-Chip-System für die präklinische Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze für die autosomal rezessive Osteopetrose – Teilprojekt B“

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2021 – 31.05.2024 (Laufzeitverlängerung)

Berichtszeitraum: 01.01.2021 – 31.05.2024

Projektpartner: Charité Universitätsmedizin Berlin (Dr.-Ing. Sven Geißler)

1. Hintergrund und ursprünglicher technischer Stand und Aufgabenstellung des Projektes

Die sequenzielle Aussaat und dynamische Kultivierung von Multipotenten adulten Stromalzellen (MSCs), Osteoblasten (hOB) und mononukleären Zellen (Monozyten) auf dezellularisierter menschlicher Spongiosa ermöglicht die Entwicklung klinisch relevanter Bone-on-a-Chip-Systeme zur Analyse genetischer Knochenerkrankungen wie der autosomal rezessiven Osteopetrose (ARO). Diese tödliche Krankheit entsteht durch angeborene Mutationsdefekte die zu nicht-funktionalen (knochenabbauenden) Osteoklasten (OC) führt und ist nur durch eine risikoreiche Transplantation von Hematopoetischen Stammzellen (HSC) aus geeigneten Spendern behandelbar. Eine Alternative könnte der Einsatz von autologen (Patienten-eigenen) HSCs sein, bei denen der Gendefekt durch somatische Gentherapie korrigiert wurde. Dazu haben wir eine induziert pluripotente Stammzelllinien (iPSCs) von einem ARO-Patienten mit CLCN7-Mutationen (ARO-iPSC) etabliert und ein Methoden zur Differenzierung dieser iPSCs in mononukleäre Zellen (ARO-Monozyten) entwickelt (in 2D Kulturen), die weiter zu Osteoklasten (ARO-OC) reifen können. Wie beim Patienten resorbieren diese ARO-OC keinen Knochen in 2D-Kulturen, allerdings könnte durch eine genetische Korrektur der CLCN7-Mutationen die Resorptionsaktivität wiederhergestellt werden. Diese ARO-iPSCs sollen für die Testung zweier Gentherapieansätze verwendet werden: 1. CRISPR/Cas9-Integration eines therapeutischen Konstrukts in einen Safe Harbor Locus, 2. Integration eines Transposon-basierten Konstrukts (Arbeiten des Projektpartners). Beide Ansätze werden zunächst in 2D-Kulturen getestet, allerdings kann das Verhalten der gentechnisch therapierten Zellen nur in Langzeit-3D-Kulturen (Bone-on-a-Chip-System) verlässlich beurteilt werden. Solche System sind jedoch derzeit weder etabliert, noch überhaupt verfügbar. Ziel dieses Teilprojektes war es daher entsprechende Protokolle und Methoden zu entwickeln, um iPSC-basierte Monozyten (mit und ohne Gendefekt) auf 3D-Gerüsten zu Osteoklasten zu differenzieren, anschließend diese Konstrukte mit MSCs und Osteoblasten zu besiedeln und in einer Langezeitkultur zu untersuchen. Anschließend sollte dieses System genutzt werden um die Sicherheit und Funktionalität von gentechnisch therapierten IPSC- Vorläuferzellen zu beurteilen. Der menschliche Knochen umfasst auch das Knochenmark, welches nicht nur der Ursprung von Blut- und Immunzellen ist, sondern auch als Speicher der Immunerfahrung dient. Daher wurde in einem explorativen Schritt das komplexe System um die Immunerfahrung erweitert, indem Mononukleäre Knochenmarkszellen zusätzlich in das System gegeben wurden. Dieser neuartige Ansatz sollte eine bessere präklinische Prüfung neuer Gentherapien (für ARO) ermöglichen und helfen bisher verwendete Mausexperimente zu reduzieren, welche die humane Situation nur bedingt widerspiegeln.

2. Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Projektes wurden zunächst Differenzierungsprotokolle für iPSC-abgeleitete Monozyten zu Osteoklasten in 2D- und 3D-Kulturen etabliert. Es wurden verschiedene Zellzahlen in statischen Kulturen getestet, jedoch führte dies nicht zu einer ausreichenden Osteoklastenbildung. Daher wurden dynamische Kulturen der besiedelten 3D-Knochengerüst durchgeführt, bei denen eine Zellzahl von 1,5 Millionen Monozyten pro Scaffold als optimal identifiziert wurde. Es wurden entsprechende lösliche Knochenresorptionsparameter etabliert, wobei CTX als optimaler Marker zur kontinuierlichen Überwachung der Osteoklastenaktivität im 3D Modell identifiziert

wurde. Ein Lektin-basiertes Färbeverfahren zur Analyse der Resorption auf Knochenchips wurde ebenfalls erfolgreich implementiert. Für die Co-Kultur mit OBs und MSCs wurde ein weiteres indirektes System entwickelt, welches zur Optimierung von Bedingungen für die Co-Kultivierung unterschiedlicher primärer und iPSC-abgeleiteten Zellen genutzt wurde. Parallel wurden osteopetrose-assoziierte Genmutationen in primären Monozyten mittels CRISPR/Cas eingeführt, um die Sicherheit und Effektivität der Therapie auch mit primären Zellen testen zu können und die Spenderheterogenität zu erhöhen. Es wurden Protokolle zur Kryokonservierung der iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen (iMakrophagen) oder MSC (iMSC) entwickelt. Basierend auf diesen Arbeiten wurde ein vollständiges funktionelles iPSC-basiertes System entwickelt, welches die dynamische Langzeitkultivierung über mehr als 30 Tage erlaubt. Es wurde auch ein neuer Co-Registrierungsalgorithmus (von CT-Aufnahmen) für dieses in vitro System entwickelt, welcher die präzise Analyse der Knochenresorption in den 3D-Kulturen ermöglicht. Dabei wurden hochauflösende Nano-CT-Aufnahmen am ESRF in Grenoble erstellt und der Knochenumbau in den 3D in vitro Modellen durch Co-Registrierung quantitativ bewertet. Zur Testung der Interventionsstrategien, wurden gentherapeutisch veränderte ARO-iPSCs in dem neuen 3D Modell untersucht, wobei Exon 14 und Exon 10 in den entsprechenden ARO-iPSC-Linien genetisch korrigiert wurden. Die Zellen differenzierten sowohl zu iMSCs als auch zu iMakrophagen in 2D und wurden kryokonserviert. Anschließend erfolgte die Weiterdifferenzierung in einer dynamischen 3D-Kultur zu funktionellen Osteoblasten (iOB) und Osteoklasten (iOC), deren Funktionalität in einer Langzeitkultur bewertet wurde. Das System wurde dabei um primäre BMMNCs erweitert, um den Einfluss des Immunsystems zu berücksichtigen. Die Ergebnisse zeigen, dass die gentherapeutische Intervention die Funktion der ARO-iPSC-abgeleiteten Zellen erfolgreich wiederherstellt, ohne negative Auswirkungen auf die Osteoblastenfunktionalität zu haben. Ein signifikanter Anstieg des Knochenresorptionsmarkers CTX-I konnte in den Überständen der korrigierten iPSC-Kulturen im Vergleich zu den Ausgangszelllinien (ARO-iPSC) nachgewiesen werden, was die Anwesenheit funktioneller Osteoklasten bestätigt und immunhistologisch validiert wurde. Die Werte der Knochenbildungsmarker (BALP und PO4-) in den Überständen unterschieden sich nicht signifikant von den primären Zellwerten, was darauf hindeutet, dass die Gentherapie keinen negativen Einfluss auf die knochenbildenden Zellen hat. Außerdem wurden keine erhöhten Immunzellaktivitäten oder signifikante Anstiege von Entzündungsmarkern beobachtet, was darauf hinweist, dass die Gentherapie nicht zwangsläufig zu unerwünschten Immunreaktionen führt. Diese Ergebnisse belegen, dass die korrigierten iPSC-abgeleiteten MSCs und Osteoklasten in dynamischen 3D-Kulturen nicht nur lebensfähig bleiben, sondern auch die funktionellen Eigenschaften primärer Zellen hinsichtlich Knochenbildung und -abbau nachahmen.

3. Wesentlichen Ergebnisse aus der Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen/Partnern (Kooperationsprojekte)

Im Rahmen des Projektes wurde die gewonnen Erkenntnisse auch auf andere Anwendungsbereiche übertragen. Optimierung von IVT-mRNA für regenerative Medizin: In Kooperation testeten wir verschiedene mRNA-basierte Therapieverfahren in unseren 3D-Kulturen für die Optimierung der Wirkung und Reduktion der Immunogenität solcher Interventionen. 3D-Knorpelassay: Wir entwickelten einen robusten 3D Assay (auf Basis unseres System) zur Evaluierung der chondrogenen Potenz. Übertragung des Systems auf andere genetisch-bedingte Knochenerkrankungen: Wir konnten zeigen, dass unsere in vitro Systeme auch mechanistische Untersuchungen anderer Knochenstörungen ermöglicht. 3D-Knochenmarkmodell für Plasmazellen: Unser optimiertes 3D-Modell für primäre Zellen erhält humane Plasmazellen langfristig in vitro und erwies sich als wertvolle Plattform für Studien zu Immuntherapien.

Sachbericht zum Projekt (Teil II)

Vorhabenbezeichnung: BOAC – Bone-on-a-Chip-System für die präklinische Untersuchung neuer therapeutischer Ansätze für die autosomal rezessive Osteopetrose – Teilprojekt B“

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2021 – 31.05.2024 (Laufzeitverlängerung)

Berichtszeitraum: 01.01.2021 – 31.05.2024

Projektpartner: Charité Universitätsmedizin Berlin (Dr.-Ing. Sven Geißler)

1. Ursprüngliche Ziele und ausführliche Darstellung der durchgeführten Arbeiten

Die Entwicklung iPSC-basierter Bone-on-a-Chip-Modelle ist wichtig, um klinisch relevante Plattformen zur Analyse genetischer Knochenerkrankungen wie der autosomal rezessiven Osteopetrose (ARO) zu schaffen und die präklinische Bewertung neuer Gentherapien in einem humanähnlichen, 3D-Langzeitkultursystem zu ermöglichen. Das ursprüngliche Ziel dieses Teilprojektes war daher die Entwicklung eines Bone-on-a-Chip-Modells auf Basis von iPSC-abgeleitete Zellen unter Nutzung eines bestehenden Modells aus primären humanen Zellen. Hierbei sollten zunächst die aus primären humanen Monozyten-abgeleiteten Osteoklasten (hOC) durch iPSC-abgeleitete Monozyten und Osteoklasten (iPSC-Monozyten / iPSC-OC) ersetzt werden. Im nächsten Schritt sollten schrittweise auch die anderen primären humane Knochenzellen (Multipotente Stromazellen [hMSC], Osteoblasten [hOB]) durch iPSC-abgeleiteten Zelltypen substituiert und in einem 3D Modell (mit primären Knochenmarkszellen) untersucht werden, was die Beurteilung von Abstoßungsreaktionen der gegenwärtigen und der neuen (Gen)Stammzelltherapie erlaubt. Dies sollte auch die Testung von iPSCs umfassen, welche von ARO-Patienten mit CLCN7-Mutationen (ARO-iPSC) abgeleitet wurden, um zu evaluieren, in wieweit das Modell den tatsächlichen Krankheitsphänotyp widerspiegeln kann. Abschließend sollten gentherapeutisch korrigierte ARO-iPSCs (corrected C7E14 & corrected C7E10) im Modell getestet werden, um Effizienz und Sicherheit einer solchen therapeutischen Maßnahme zu beurteilen. Für dieses Vorhaben wurden verschiedene Arbeitspakete und Zielsetzungen definiert und wie nachfolgend dargestellt bearbeitet.

1.1. Testung der von Kontroll-iPSCs abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen im Bone-on-a-Chip-Modell

1.1.1. Ziel: Kultivierung von iPSCs-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen in statischen und dynamischen (dezellularisierten) Knochengerüst

Es wurden zunächst Experimente in 2D durchgeführt, um Differenzierungsprotokolle für die von iPSC-abgeleiteten Monozyten zu Osteoklasten zu etablieren. Zunächst wurden Experimente in 2D durchgeführt, um Protokolle für die Differenzierung von iPSC-abgeleiteten Monozyten zu Osteoklasten zu etablieren. Im Vergleich zu primären humanen Zellen aus Knochenmark und Blut konnten die initialen Zellzahlen und die erforderliche Differenzierungsdauer für die Besiedelung der iPSC-abgeleiteten Monozyten im 3D Knochengerüst erreicht werden. Im Vergleich zu primären humanen Zellen aus Knochenmark und Blut konnten mit den neuen Protokollen auch die anfänglichen Zellzahlen und die erforderliche Differenzierungsdauer für iPSC-Zellen erreicht werden, um die 3D-Knochengerüste erfolgreich mit iPSC-abgeleiteten Monozyten besiedeln zu können. Überstände aus den statischen Monokulturen wurden genutzt, um zusätzliche Knochenresorptionsparameter wie Cathepsin K zu etablieren. Diese Proben dienten außerdem der Entwicklung von Protokollen für histologische Färbungen der Osteoklasten sowie für Mikro-CT-Analysen.

In statischen 3D-Kulturen wurden verschiedene Zellzahlen getestet, jedoch zeigte sich, dass die statische Kultivierung nicht zur erfolgreichen Osteoklastenbildung führte. Daher wurden in einer zweiten Versuchsreihe unterschiedliche Zellzahlen in einer dynamischen Kultur untersucht, wobei eine optimale Zellzahl von 1,5 Millionen Zellen pro Scaffold ermittelt wurde (Abbildung 1). Zusätzlich wurden indirekte Knochenresorptionsparameter etabliert, wobei CTX als optimaler löslicher Marker im Kulturmedium zur Überwachung der Osteoklastenaktivität identifiziert wurde, da er mit deren Differenzierung und Aktivität korreliert. Ein lektinbasiertes Färbeverfahren zur Quantifizierung der osteoklastären Resorption auf Knochenchips wurde ebenfalls erfolgreich implementiert.

In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner wurde ein Protokoll entwickelt, das die Kryokonservierung der iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen ermöglicht und eine ausreichende Viabilitätsrate nach dem Auftauen sicherstellt. Eine erste dynamische Langzeitkultivierung im 3D-System über 37 Tage zeigte eine erfolgreiche Differenzierung dieser Zellen zu funktionellen Osteoklasten. Die Zellviabilität wurde anhand der LDH-Konzentration im Kulturüberstand überwacht, während die Resorption des Knochengerüsts durch den löslichen Faktor CTX-I dokumentiert wurde. Bereits innerhalb der ersten 10 Tage konnten funktionelle Osteoklasten nachgewiesen werden, und die Resorptionsfähigkeit blieb über den gesamten Versuchszeitraum hinweg erhalten. Anschließend wurden monozytäre Vorläuferzellen aus zwei weiteren iPSC-Zelllinien generiert und in 3D-Monokulturen getestet, um das Bone-on-a-Chip-Modell später mit insgesamt drei iPSC-abgeleiteten Wildtyp-Linien zu validieren. Die dynamischen Langzeitkulturen wurden über 37 Tage hinsichtlich löslicher Faktoren im Zellkulturüberstand untersucht, und die osteoklastäre Differenzierung wurde parallel in 2D auf Knochenscheiben morphologisch und funktionell analysiert. Die Zellviabilität blieb während der gesamten Kultivierungsdauer stabil, und die CTX-I-Konzentration bestätigte die Bildung funktioneller Osteoklasten bereits nach 10 Tagen (Abbildung 1). Die quantitative Analyse zur Veränderung des Knochengerüsts wurde anhand der Kulturen des Vorjahres durchgeführt. Trotz des Nachweises von Resorptionsmarkern in den Überständen konnte jedoch kein quantitativer Umbau über die Co-Registrierung erfasst werden. Gemeinsam mit dem Kooperationspartner, der die μ CT-Messungen und Co-Registrierungsanalysen durchführt, wurde dieses Analyseverfahren optimiert. Zusammenfassend konnten die geplanten Versuche erfolgreich abgeschlossen werden und zeigen, dass das entwickelte In-vitro-Modell eine vielversprechende Plattform zur Untersuchung der Osteoklastogenese und Knochenresorption darstellt und Potenzial für die Entwicklung und Validierung neuer Therapien gegen Osteoporose oder Osteopetrose bietet.

1.1.2. Ziel: Co-Kultur von iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen mit primären MSCs und Osteoblasten (hOB) in dynamischen (dezellularisierten) 3D Knochengerüsten.

Optimierung des Zellkulturmediums und Entwicklung eines indirekten Co-Kultursystems: Die ersten Versuche in dynamischen 3D-Kulturen zeigten, dass eine Anpassung des Zellkulturmediums notwendig war, um die iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen mit primären humanen Zellen erfolgreich zu kultivieren. Es wurde daher ein Insert-basiertes, indirektes Co-Kultursystem etabliert, um spezifische Fragestellungen zu klären, die auf das 3D-System übertragbar sind (Abbildung 2). Dieses System erlaubt eine separate Analyse des osteoblastären und osteoklastären Phänotyps (trotz Co-Kultivierung), sowie ein breiteres Screening verschiedener Faktoren in höherem Durchsatz. Da für die Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten unterschiedliche Kultivierungsmedien benötigt werden, wurde die optimale Reihenfolge der Co-Kultur ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass Osteoblasten und MSCs die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten hemmen können. Daher wurde festgestellt, dass die Monozyten zuerst auf dem Knochengerüst zu differenzieren sind, bevor Osteoblasten und MSCs kultiviert werden (Abbildung 2b-c). Zusätzlich wurde die minimale Differenzierungsdauer für beide Zelltypen ermittelt: eine 14-tägige osteoklastäre Differenzierung, gefolgt von einer 14-tägigen osteogenen Differenzierung. Parallel dazu begann die Einführung osteopetrose-assoziiierter Genmutationen in primäre humane Monozyten mittels CRISPR/Cas-Ansätzen. Diese Methode ergänzt den Einsatz iPSC-abgeleiteter

Zellen und bewahrt die Spenderheterogenität, wodurch die Aussagekraft zur Sicherheit und Effektivität der Therapie gesteigert werden könnte. Ein erster Proof-of-Concept-Versuch bestätigte die prinzipielle Durchführbarkeit ohne Beeinträchtigung der Projektzeitplanung.

Optimierung der Kultivierungstemperatur: Ein erster Versuch mit iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen in Co-Kultur mit primären Osteoblasten und MSCs zeigte nach 28 Tagen sowohl Knochenresorption als auch die Sekretion mineralisierter Matrix. Die Temperatur im Insert-basierten Co-Kultursystem wurde anschließend optimiert (Abbildung 3): Durch die Erhöhung von 33 °C auf 37 °C bei primären Monozyten wurde eine längere osteoklastäre Resorption erreicht. Bei 37 °C bildeten sich innerhalb von fünf Tagen erste mehrkernige Osteoklasten, die kontinuierlich an Größe zunahmten (Abbildung 5a). Auch die Resorptionskapazität, gemessen anhand von Lectin und CTX-I, nahm bei erhöhter Temperatur zu (Abbildung 3a-c). Primäre MSCs und Osteoblasten zeigten ebenfalls beschleunigte osteogene Differenzierung und Matrixmineralisierung bei 37 °C (Abbildung 4d-e).

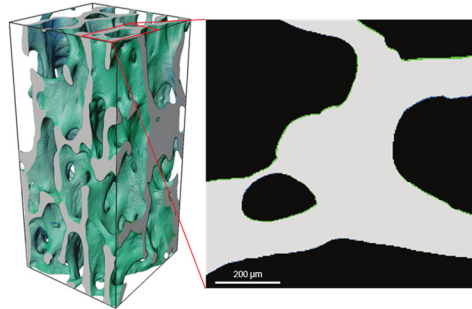
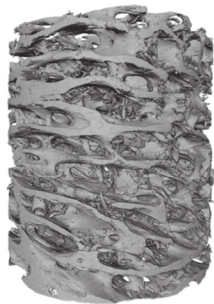
Entwicklung eines neuen Co-Registrierungsalgorithmus: Zur Bewertung der Knochenresorption auf den 3D-Gerüsten wurde ein neuer Co-Registrierungsalgorithmus entwickelt, um den Knochenumbau während der Co-Kultur präzise zu analysieren. Am ESRF in Grenoble, Frankreich, wurden hochauflösende Nano-CT-Aufnahmen der 3D-Konstrukte vor und nach der Kultivierung erstellt, um durch Co-Registrierung detaillierte Informationen zur Knochenbildung und -resorption zu erhalten (Abbildung 4). Der Algorithmus wurde so optimiert, dass auch Labor- μ CT-Aufnahmen mit geringerer Auflösung integriert werden können, was eine zeitliche und räumliche Quantifizierung der Osteoklastenresorption auf Trabekel-Ebene ermöglicht.

Co-registration workflow

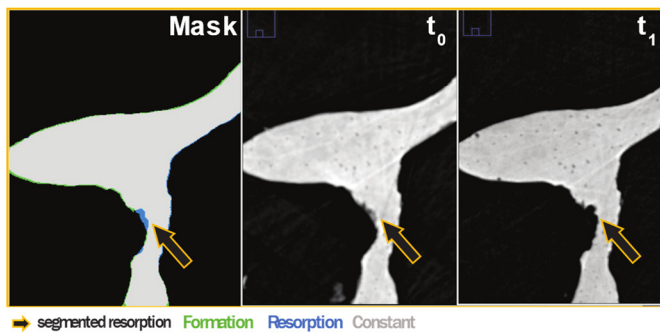
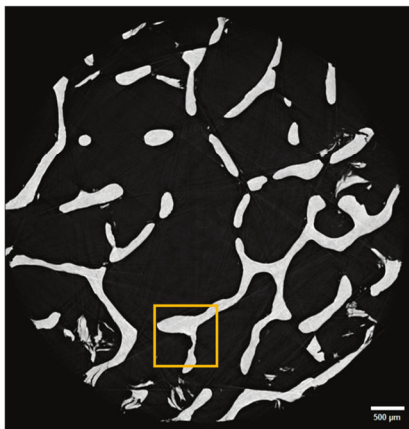


scaffold μ CT scan
before (t_0) and after (t_1) cultivation

Bone turnover analysis: segmentation



Co-registration of two time points



3D rendering

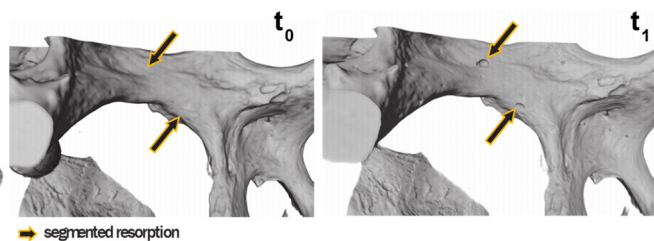
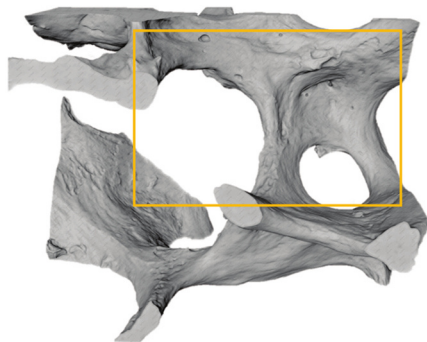


Abbildung 4: Co-registration workflow exemplarisch gezeigt anhand eines 6 Wochen kultivierten Scaffolds vom iPSC Wildtyp BOAC.

1.1.3. Ziel: Vollständiger Bone-on-a-Chip aus iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen

Abschließend wurden monozytäre Vorläuferzellen von insgesamt drei iPSC-Wildtypszelllinien in dynamischen Langzeitkulturen mit primären MSCs und Osteoblasten getestet. Über 35 Tage wurden lösliche Faktoren im Zellkulturüberstand gemessen und die Zellviabilität über die LDH-Konzentration überwacht. Die CTX-I-Konzentration zeigte, dass innerhalb der ersten 10 Tage funktionelle Osteoklasten gebildet wurden, während primäre MSCs und Osteoblasten Phosphat sowie knochenspezifisches ALP sekretierten, was auf eine erfolgreiche osteogene Differenzierung hinweist. Zur Bestätigung des Knochenumbaus wurde nach der Kultivierung eine erneute Registrierung des Knochengerüsts mittels microCT durchgeführt und eine quantitative Bewertung vorgenommen. Die kultivierten Knochengerüste wurden anschließend fixiert, in Paraffin eingebettet und zeitnah

histologische untersucht, um spezifische Zelltypen sowie die neu gebildete extrazelluläre Matrix zu identifizieren (Abbildung 5). Zusätzlich wurde die Population der mononukleären Knochenmarkszellen vor und nach der 3D-Kultivierung mittels Durchflusszytometrie analysiert, um die Erhaltung der Immunzellpopulationen während des Kultivierungszeitraums zu bestätigen. Die Arbeiten konnten erfolgreich abgeschlossen werden, und ein vollständiges Bone-on-a-Chip-System zur Co-Kultur von iPSC-abgeleiteten monozytären Vorläuferzellen mit primären Osteoblasten und MSCs wurde etabliert.

1.2. Schrittweises Ersetzen Weiterer Primärer Zelltypen des Bone-on-a-Chip-Modells durch von iPSCs abgeleitete Zellen

1.2.1. Ziel: Einzelnes Ersetzen von MSCs/OBs und OCs durch iPSC-abgeleitete Zellen im Bone-on-a-Chip-Modell

Entwicklung der Differenzierungsprotokolle: Dieses Arbeitspaket erforderte die Zuarbeit des Projektpartners, der die Entwicklung relevanter Differenzierungsprotokolle für MSCs aus iPS-Zellen übernahm. Es fand ein regelmäßiger Austausch über Methoden, Materialien und Ergebnisse statt, wobei der aktuelle Stand der Arbeiten im Bericht der AG Kornak dokumentiert ist. Der Projektpartner entwickelte mehrere Protokolle zur Differenzierung von MSCs aus iPS-Zellen, die auf der Zugabe von Wachstumsfaktoren oder kleinen Molekülen basierten. Diese Protokolle wurden an verschiedenen iPS-Zelllinien getestet und mit MSCs aus anderen Quellen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Protokolle MSCs mit ähnlichen morphologischen und teilweise funktionellen Eigenschaften hervorbrachten. Eine endgültige Entscheidung über das optimale Protokoll wurde an dieser Stelle jedoch noch nicht getroffen, da weitere Experimente zur Optimierung und Validierung der Methode erforderlich waren. **Optimierung und Validierung der Differenzierungsprotokolle:** Nach mehreren Protokollanpassungen gelang es dem Projektpartner, MSCs aus iPSC-abgeleiteten Zellen zu generieren, die primären MSCs morphologisch und teilweise funktionell ähnelten. Diese iPSC-abgeleiteten MSCs wurden in ersten dynamischen Langzeitkulturen gemeinsam mit primären monozytären Vorläuferzellen getestet. Allerdings zeigten die iPSC-MSCs in 3D-Kulturen keine Sekretion mineralisierter Matrix, und die Phosphatkonzentration blieb über den Verlauf der Kultur im Vergleich zu primären Kontrollkulturen gering. Um die Ergebnisse zu optimieren, arbeitete der Projektpartner mit einer weiteren Arbeitsgruppe zusammen, die bereits erfolgreiche Protokolle zur Herstellung funktionaler iPSC-abgeleiteter MSCs etabliert hatte. Auf Basis dieser Protokolle konnte der Kooperationspartner iPSC-abgeleitete MSCs (iMSC) generieren, welche in diesem Teilprojekt zu iPSC-OB weiter differenziert werden konnten. In einem Testlauf wurden die iMSC und entsprechende iOC in Monokultur oder in Co-Kultur mit mit primären Zellen in einem dynamischen 3D-System getestet. Diese Kulturen zeigten erstmals einen Anstieg von Knochenbildungsmarkern wie Phosphat und knochenspezifischem ALP im Zusammenhang mit den iPSC-abgeleiteten MSCs (iMSCs) (Abbildung 6) und bestätigten die Resorptionsfähigkeit der iPSC-OC in Langzeitkultur. Mit diesen Ergebnissen konnte das Versuchsziel, MSCs und OBs einzeln durch iPSC-abgeleitete Zellen zu ersetzen, erfolgreich erreicht werden.

1.2.2. Gemeinsames Ersetzen von MSCs/OBs und OCs durch iPSC-abgeleitete Zellen im Bone-on-a-Chip-Modell (vollständiges Modell)

Es wurden die iPSC-abgeleiteten MSC/OB (iMSC) und Monozyten/OC (iOC) erstmals gemeinsam in der dynamischen Langzeitkultur getestet und zu entsprechenden Kulturen mit primären humanen Zellen verglichen. Zusätzlich wurden auch hier Knochenmarkszellen (BMMNC) zu diesen Modellen hinzugegeben, um die Immunzellkomponente des Knochens zu simulieren. In den primären Kulturen wurden ein autologer Ansatz (gleicher Spender von MSC / OC /BMMNCs) und in iPSC-Kulturen allogener Ansatz (iMSC/iOC vs. BMMNCs von andern Spender). Ziel dieser Versuche war es, die osteogene und osteoklastäre Aktivität der iPSC-abgeleiteten Zellen im Vergleich zu primären Zellen unter dynamischen Bedingungen und den Einfluß der Immunzellkomponente zu bewerten (Abbildung 7). Die iPSC-abgeleiteten MSCs zeigten dabei in den 3D-Kulturen einen deutlichen Anstieg der Knochenbildungsmarker BALP (Bone Alkaline Phosphatase) und Phosphat. Dieser

Anstieg war ähnlich zu dem, was in primären MSC-Kulturen beobachtet wurde, und deutet darauf hin, dass die iPSC-abgeleiteten MSCs eine ähnliche osteogene Aktivität entfalten können. Parallel dazu wurde auch die Funktionalität der iPSC-abgeleiteten Osteoklasten untersucht: Die Co-Kulturen führten zu einem Anstieg der CTX-I-Konzentrationen im Kulturüberstand, was auf eine aktive Knochenresorption hinweist. Dieser Marker, der die Degradation von Knochenmatrix widerspiegelt, bestätigte die Fähigkeit der iPSC-abgeleiteten Osteoklasten zur effektiven Knochenresorption. Diese Ergebnisse belegen, dass die iPSC-abgeleiteten MSCs und Osteoklasten in dynamischen 3D-Kulturen nicht nur lebensfähig bleiben, sondern auch die funktionellen Eigenschaften primärer Zellen hinsichtlich Knochenbildung und -abbau nachahmen. Diese erfolgreiche Etablierung dynamischer Langzeitkulturen eröffnet somit neue Perspektiven für die Verwendung iPSC-abgeleiteter Zelltypen in der Modellierung von Knochenremodellierung und Krankheitsmechanismen in vitro und legt den Grundstein für zukünftige Anwendungen in der Arzneimitteltestung und der Entwicklung von Therapien zur Behandlung von Knochenkrankheiten.

1.3. Präklinische Testung Gentherapie-Strategien für die ARO im Bone-on-a-Chip-Modell.

1.3.1. Ziel: Evaluierung von aus „Gen-therapierten“ iPSCs-abgeleiteten Stamm- oder Vorläuferzellen im ARO Bone-on-a-Chip-Modell (Langzeit-3D-Kultur)

Im letzten Abschnitt des Projekts wurden gentherapeutisch veränderte ARO-iPSCs untersucht, wobei Exon 14 und Exon 10 in den entsprechenden ARO-iPSC-Linien genetisch korrigiert wurden. Die Zellen differenzierten sich sowohl zu induzierten mesenchymalen Stammzellen (iMSCs) als auch zu induzierten Makrophagen (iMakrophagen) in 2D und wurden cryokonserviert. Anschließend erfolgte die Weiterdifferenzierung in einer dynamischen 3D-Kultur zu funktionellen Osteoblasten (iOB) und Osteoklasten (iOC), deren Funktionalität in einer Langzeitkultur bewertet wurde. Zudem wurde das System um primäre BMMNCs erweitert, um den Einfluss des Immunsystems zu berücksichtigen. Die Ergebnisse zeigen, dass die gentherapeutische Intervention die Funktion der ARO-iPSC-abgeleiteten Zellen erfolgreich wiederherstellt, ohne negative Auswirkungen auf die Osteoblastenfunktionalität zu haben. Ein signifikanter Anstieg des Knochenresorptionsmarkers CTX-I konnte in den Überständen der korrigierten iPSC-Kulturen im Vergleich zu den Ausgangszelllinien (ARO-iPSC) nachgewiesen werden, was die Anwesenheit funktioneller Osteoklasten bestätigt und immunhistologisch validiert werden konnte (Abbildung 8). Die Werte der Knochenbildungsmarker (BALP und PO4-) in den Überständen unterschieden sich nicht signifikant von den primären Zellwerten, was darauf hindeutet, dass die Gentherapie keinen negativen Einfluss auf die knochenbildenden Zellen hat. Außerdem wurden keine erhöhten Immunzellaktivitäten oder signifikante Anstiege von Entzündungsmarkern beobachtet, was darauf hinweist, dass die Gentherapie nicht zwangsläufig zu unerwünschten Immunreaktionen führt. Diese Ergebnisse belegen, dass die korrigierten iPSC-abgeleiteten MSCs und Osteoklasten in dynamischen 3D-Kulturen nicht nur lebensfähig bleiben, sondern auch die funktionellen Eigenschaften primärer Zellen hinsichtlich Knochenbildung und -abbau nachahmen. Die erfolgreiche Etablierung der entsprechenden Gentherapien und ihre Evaluation in einer humanen dynamischen in vitro Langzeitkultur eröffnen somit nicht nur neue Perspektiven für die Modellierung anderer Krankheitsmechanismen in vitro, sondern ermöglichen auch Abschätzungen über die Effizienz entsprechender experimenteller Interventionen. Somit wurden alle Hauptziele dieses Teilprojektes erfüllt und eine klinisch relevante Plattform zur Analyse genetischer Knochenerkrankungen geschaffen, die eine präklinische Bewertung neuer Gentherapien in einem humanähnlichen, 3D-Langzeitkultursystem ermöglicht.

1.4. Übertragung der Entwickelten Technologie auf andere Anwendungsbereiche (Kooperationsprojekte / Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen)

1.4.1. Innovative Strategien zur Optimierung der IVT-mRNA für therapeutische Anwendungen in der regenerativen Medizin

In vitro transkribierte (IVT-)mRNA hat sich als Schlüsseltechnologie in der Impfstoffentwicklung etabliert. Gemeinsam mit Kooperationspartnern haben wir das therapeutische Potential von IVT-mRNA für die Anwendung im Bereich der Regenerativen Medizin untersucht. Hierfür haben wir iVT-mRNAs verwendet, die für VEGF kodieren, und untersucht in wieweit diese zur Modulation des sekretorischen Phänotyps therapeutischer Zellen verwendet werden können. Dabei haben wir die, im Rahmen dieses Teilprojektes etablierten, humanen 2D und 3D in vitro Testsystem angewendet, um die Sicherheit und Effizienz einer solchen Therapie zu evaluieren. Erste Versuchen mit bisherigen (Standard)-IVT-mRNA Ansätzen zeigten in den Modellen, dass deren Immunogenität die Sekretion von pro-angiogener Mediatoren aus MSC beeinträchtigt und anti-angiogene Chemokine induziert. Um diese Immunogenität zu reduzieren, wurde die IVT-mRNA mit chemisch modifizierten Ribonukleotiden optimiert und in unseren in vitro Systemen getestet. Die 5-Methoxy-Uridin-Modifikation verbesserte das Sekretom der transduzierten Zellen und verlängerte die Sekretion von VEGF. Zudem wurde festgestellt, dass die Sekretion von IVT-mRNA-kodierten Proteinen von einer optimierten Zelladhäsion abhängt. Die Kapselung in Kollagen-Hyaluronsäure-Hydrogelen erhöhte die Sekretion von VEGF und unterstützenden pro-angiogenen Mediatoren. Die Kombination von minimal immunogenen mRNA-Technologien mit matrixbasierten Ansätzen eröffnet neue Möglichkeiten für die therapeutische Behandlung komplexer Prozesse wie Gewebeischämie, Angiogenese und Regeneration.

1.4.2. Entwicklung eines potenten 3D-Knorpelassays: Regenerative Potenziale menschlicher stromaler Zellen

Im Rahmen einer weiteren Kooperation haben wir, auf Basis unseres Modells, einen neuen robusten 3D-Knorpelassay entwickelt, welcher therapeutische (chondrogene) Potenz verschiedener Zelltypen / Modifikationen vorhersagen kann. In diesem Assay konnten wir zeigen, dass nur Konchenmarks-MSC (BMSCs) und primäre Chondrozyten ein natürliches chondrogenes Potential haben und stabile Knorpelorganoide in vitro bilden können, während andere Zelltypen nur kleine, kontrahierte Aggregate produzierten. Die BMSC-abgeleiteten Knorpelscheiben zeigten signifikant höhere Gewichte und Proteoglykaninhalte im Vergleich zu den Aggregaten anderer Gewebequellen. Um die osteochondrale Potenz der gezüchteten Knorpelscheiben in vivo zu testen, wurden diese humanen Organoide in kritische Femurdefekte bei Mäusen transplantiert. Die Transplantation der BMSC-abgeleiteten Knorpelscheiben führte zu einer vollständigen Frakturheilung, während andere Zelltypen keine Anzeichen für Knochenheilung zeigten. Diese Ergebnisse belegen die hohe Vorhersagekraft des entwickelten Assays für in vivo Heilergebnisse. Dieser potente 3D-Knorpelassay kann für das Screening und Testung von therapeutischen Interventionen in vitro genutzt werden und die entsprechenden Tierversuche in diesem frühen Entwicklungsstadium ersetzen.

1.4.3. Die Rolle von ARHGAP36 in der Heterotopen Ossifikation: Mechanismen und therapeutische Ansätze

In einer weiteren Kooperation wurde die entwickelten in vitro Systeme auf andere genetische Erkrankungen übertragen, wie beispielsweise die heterotope Ossifikationen. Heterotope Ossifikation ist eine Erkrankung, die durch abnormale Mineralisierung von Weichgeweben verursacht wird, wobei Signalwege wie BMP, TGF β und WNT eine zentrale Rolle spielen. Unser Kooperationspartner identifizierte bei einer Patientin eine interchromosomale Duplikation, die zur fehlerhaften Expression von ARHGAP36 in Fibroblasten führte und eine ultra-seltene progressive Form der heterotopen Ossifikation verursachte. Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen, wurden wir gebeten in unseren Modellen zu untersuchen, ob ARHGAP36 als Hemmer des TGF β -Signalwegs und als Aktivator des Hedgehog-Signalweg sowie Gene, die mit der Produktion von

extrazellulärer Matrix in Verbindung stehen, wirkt. Unsere in vitro Studien zeigten, dass ARHGAP36 die Osteoblastendifferenzierung fördert und die Aktivität von BMP-TGF β -Signalwegen verringert. Die Überexpression von ARHGAP36 in MSCs und Chondrozyten führte zu einer erhöhten Ablagerung von extrazellulärer Matrix und einer Hochregulierung osteogener Marker. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung unserer entwickelten in vitro Modellen zur Erforschung der genetischen Mechanismen von Knochenbildungstörungen und zur Entwicklung gezielter Therapien für knochenbezogene Erkrankungen.

1.4.4. Entwicklung eines innovativen 3D-Kulturmodells zur langfristigen Aufrechterhaltung menschlicher Plasmazellen im Knochenmark

Wir haben ebenfalls das dynamische 3D Ausgangssystem, welches auf primären humanen Zellen basierte weiterentwickelt. Hierfür haben wir in einem Kooperationsprojekt auf den Erhalt von Plasmazellen fokussiert. Plasmazellen (PCs) im Knochenmark sind entscheidend für humorale Immunreaktionen bei malignen und nicht-malignen Erkrankungen wie multiplem Myelom, Immundefizienzen und Autoimmunerkrankungen. Spezifische Mikroumgebungen im Knochenmark bieten biomechanische und lösliche Faktoren, die das langfristige Überleben der PCs unterstützen. Es besteht ein großer Bedarf an Modellsystemen, um die Biologie der PCs besser zu verstehen und neue therapeutische Strategien zu entwickeln, da die meisten präklinischen Daten bisher aus in vivo-Studien an Mäusen stammen und in vitro Studien an menschlichen PCs aufgrund eingeschränkter Überlebensfähigkeit in 2D-Kulturen limitiert sind. Wir haben unser mikrophysiologisches, dynamisches 3D-Kulturssystem für das Knochenmark so angepasst, das menschliches Primärgewebe (Femurbiopsien) durch einem Hydrogel-Gerüst mechanisch unterstützt werden. Dies bewahrte die native Nischenarchitektur des Knochenmarks und ermöglichte das Überleben der PCs in vitro über einen Zeitraum von bis zu zwei Wochen. Das System erlaubt zudem die Migration von Lymphozyten in die Zirkulation des mikrophysiologischen Systems. Das langfristige Überleben der PCs war mit der stabilen Präsenz von löslichen Faktoren wie APRIL, BAFF und IL-6 in der Kultur verbunden. Die steigenden Konzentrationen von Immunglobulinen im Medium bestätigen die Funktionsfähigkeit der PCs über die Kulturdauer. Diese Studie einen der ersten erfolgreichen Berichte über die langfristige Aufrechterhaltung primär abgeleiteter nicht-maligner PCs in vitro dar. Unser innovatives Modellsystem eignet sich somit für umfassende in vitro Studien zur Regulation menschlicher PCs und zur Erforschung gezielter therapeutischer Ansätze wie CAR-T-Zelltherapie oder Biologika.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Nachweis für den Projektzeitraum (01.10.2020-30.04.2024; FkZ.:161LO234B)	Beträge in EUR
812	148.452,79
843	37.700,65
ILV	180,00
Summe Ausgaben	186.333,44

3. Verwertungsplan

Wissenschaftliche / technische Verwertungsziele (einschließlich struktureller und anwendungsbezogener Verwertungsziele)		während der Laufzeit des Vorhabens	im Anschluss an das Vorhaben
Ziel	Erläuterungen		
Verbreitung der Erkenntnisse	Veröffentlichung der erzielten Ergebnisse in wissenschaftlichen Fachzeitschriften und für die breite Öffentlichkeit, Vorträge und Poster bei Fachkongressen oder anderen Veranstaltungen	X	X
Aus-, Weiter-, Fortbildung	Vorhaben dient der Heranbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses (Erstellung von Dissertationen) und Ergebnisse finden Eingang in die Lehre (Graduiertenprogramm).	X	X
Forschungsstrukturen	Weiterführung aufgebauter Forschungsstrukturen im Rahmen von Kooperationsnetzwerke (DFG, SFB 1444 und Proto, EU)		X
Patientenversorgung	1. Etablierung eines gentherapeutischen Verfahrens für die autosomal rezessive Osteopetrose. 2. Ausdehnung auf die autosomal dominante Osteopetrose Typ 2. 3. Bone-On-A-Chip zur Testung von ATMPs für Knochen/Knochenmarkserkrankungen		X
Gesundheit von bestimmten Zielgruppen	Beiträge zur Prävention und Gesundheitsförderung, Verbesserung der Lebensqualität und Lebensdauer etc.		X
Wirtschaftliche Verwertungsmöglichkeiten	Das Bone-On-A-Chip Systems ist für den Anwendungsbereich der Pharamkologie interessant. Hierfür werden gegenwärtige Kooperation (Auftragsforschung) mit einem Industriepartner und Forschungsinstituten besprochen.		X

4. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Projektdurchführung wurden dem Zuwendungsempfänger keine Dritt-Ergebnisse oder anderweitige Fortschritte auf dem Projektgebiet bekannt, die eine Änderung der Zielsetzung, Durchführung oder Verwertung der Ergebnisse erfordert hätten.

5. Erfolgte Veröffentlichungen nach Nr. 5 der NKBF/NABF

- I. Martini S, Drzeniek M, Stark R, Kollert M, Du W, Reinke S, Ort M, Hardt S, Kotko I, Kath J, Schlickeiser S, Geißler S, Wagner D, Krebs A, Volk H. Long Term in Vitro Maintenance of Plasma Cells in a Hydrogel Enclosed Human Bone Marrow Microphysiological 3d Model System. *Biofabrication*. 2024;16. DOI 10.1088/1758-5090/ad5dfe.
- II. Drzeniek NM, Kahwaji N, Picht S, Dimitriou IM, Schlickeiser S, Moradian H, Geissler S, Schmueck-Henneresse M, Gossen M, Volk HD. In Vitro Transcribed Mrna Immunogenicity Induces Chemokine-Mediated Lymphocyte Recruitment and Can Be Gradually Tailored by Uridine Modification. *Adv Sci (Weinh)*. 2024:e2308447. DOI:10.1002/advs.202308447
- III. Poupardin R, Wolf M, Maeding N, Paniushkina L, Geissler S, Bergese P, Witwer KW, Schallmoser K, Fuhrmann G, Strunk D. Advances in Extracellular Vesicle Research over the Past Decade: Source and Isolation Method Are Connected with Cargo and Function. *Adv Healthc Mater*. 2024:e2303941. DOI:10.1002/adhm.202303941
- IV. Melo US, Jatzlau J, Prada-Medina CA, Flex E, Hartmann S, Ali S, Schopflin R, Bernardini L, Ciolfi A, Moeinzadeh MH, Klever MK, Altay A, Vallecillo-Garcia P, Carpentieri G, Delledonne M, Ort MJ, Schwestka M, Ferrero GB, Tartaglia M, Brusco A, Gossen M, Strunk D, Geissler S, Mundlos S, Stricker S, Knaus P, Giorgio E, Spielmann M. Enhancer Hijacking at the Arhgap36 Locus Is Associated with Connective Tissue to Bone Transformation. *Nat Commun*. 2023;14(1):2034. DOI:10.1038/s41467-023-37585-8
- V. Hochmann S, Ou K, Poupardin R, Mittermeir M, Textor M, Ali S, Wolf M, Ellinghaus A, Jacobi D, Elmiger JAJ, Donsante S, Riminucci M, Schafer R, Kornak U, Klein O, Schallmoser K, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Polansky JK, Geissler S, Strunk D. The Enhancer Landscape Predetermines the Skeletal Regeneration Capacity of Stromal Cells. *Sci Transl Med*. 2023;15(688):eabm7477. DOI:10.1126/scitranslmed.abm7477
- VI. Textor M, Hoburg A, Lehnigk R, Perka C, Duda GN, Reinke S, Blankenstein A, Hochmann S, Stockinger A, Resch H, Wolf M, Strunk D, Geissler S. Chondrocyte Isolation from Loose Bodies-an Option for Reducing Donor Site Morbidity for Autologous Chondrocyte Implantation. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2). DOI:10.3390/ijms24021484
- VII. Drzeniek NM, Kahwaji N, Schlickeiser S, Reinke P, Geissler S, Volk HD, Gossen M. Immuno-Engineered Mrna Combined with Cell Adhesive Niche for Synergistic Modulation of the Msc Secretome. *Biomaterials*. 2023;294:121971. DOI:10.1016/j.biomaterials.2022.121971

Es sind 2 weitere Manuskripte in Vorbereitung, welches das optimierte humane 3D in vitro System auf Basis von primären Zellen und auf Basis von iPSC (inkl. Validierung der Gentherapie) näher beschreiben.