

opto-TLR-MSC

Entwicklung einer optogenetisch kontrollierbaren MSC-Zelllinie für die präzise Regulation immunmodulatorischer Faktoren.

Programm / Ausschreibung	Bridge, Bridge_NATS, Bridge_NATS 2019	Status	abgeschlossen
Projektstart	01.01.2021	Projektende	31.03.2024
Zeitraum	2021 - 2024	Projektlaufzeit	39 Monate
Keywords	MSCs, Optogenetik, Hypoxie, Normoxie, Immunmodulation, Therapie		

Projektbeschreibung

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) werden aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften als potenzielle Zelltherapeutika umfassend untersucht. In diesem Zusammenhang scheint die Therapie mit MSCs vor allem bei der Behandlung von Erkrankungen mit Autoimmun- und Entzündungskomponenten vielversprechend zu sein. Nichtsdestotrotz sind viele Forschungsergebnisse widersprüchlich, da die Rolle von MSCs im Kontext inflammatorischer Erkrankungen immer noch unzureichend charakterisiert ist. Daher ist es nötig, neue, aussagekräftige biologische Assay-Systeme zu etablieren, die es erlauben die zugrundeliegenden Mechanismen immunmodulatorischer Effekte, die bei Stammzelltherapien auftreten, zu beschreiben. Eine denkbare Anwendung wäre zum Beispiel die Rolle von MSCs in der Therapie der akuten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-host-disease, GvHD) in vitro nachzustellen und besser verstehen zu können.

Die Aufgaben von Toll-like Rezeptoren (TLR) auf und in MSCs sind vielseitig und beinhalten die Steuerung der Proliferation und Migration der MSCs, die Reparatur beschädigter Gewebe, die Förderung der Angiogenese sowie die Regulierung des Immunsystems. So fördert die Aktivierung des TLR4 meist die Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen (MSC1 Phänotyp), die Stimulierung des TLR3 hingegen die Expression von antiinflammatorischen Molekülen (MSC2). Die „Optogenetik“ hat das Target- und Assay-Portfolio um eine Vielzahl neuer Ansätze bereichert. Bei der Optogenetik werden genetische und optische Methoden kombiniert, um Zellen zu manipulieren. Dabei werden lichtsensitive Proteindomänen von Photorezeptoren in Effektorproteine eingebaut, um diese mit Lichtreizen steuern zu können. Je nach Proteintyp und Setup kann die Beleuchtung zur Aktivierung, Inaktivierung, Lokalisation oder Stabilisierung/Destabilisierung von Signalwegen führen.

In diesem Projekt planen wir neue hochstandardisierte Zelllinien aus MSCs aufzubauen, bei denen die spezifischen Signalwege von TLR3 und TLR4 durch Lichtinduktion ein- bzw. ausgeschaltet werden können. Das Einschleusen von Reportergenen ermöglicht zusätzlich eine Echtzeitdetektion der Signalwege. Die so erhaltenen lichtaktivierbaren Zelllinien sollen nach der Charakterisierung unter möglichst physiologischen Bedingungen validiert werden, um aussagekräftige Modelle zu entwickeln. Dafür werden die Zelllinien unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) und in 3D in einem Hydrogel kultiviert und sowohl auf ihre Multipotenz (Stammzellcharakter), als auch auf das Potential, nach Lichtinduktion, den proinflammatorischen (MSC1; TLR4 Aktivierung) bzw. antiinflammatorischen (MSC2; TLR3 Aktivierung) Phänotypen auszubilden, getestet. Diese beiden biologischen Phänotypen sollen mit Hilfe von Multiplex-ELISA, Genexpressions- und quantitativen Proteomanalysen genau charakterisiert und mit dem Phänotyp nicht-stimulierter Zellen

bzw. primärer Zellen verglichen werden. Nach erfolgreichem Aufbau und Charakterisierung der 3D-Modelle planen wir sowohl die Kultivierung unter physiologisch-relevanten Bedingungen als auch die Anregung und Analyse mit Hilfe des Oli-UP-Zellkultursystem zu automatisieren. Dadurch soll die Brücke zwischen manueller Handhabung und automatisierter Zellkultivierung gelegt werden.

Die im Rahmen dieses Projektes erworbenen Kompetenzen werden die Zusammenarbeit der IMC FH Krems, der Universität Bodenkultur und der Firma LifeTaq-Analytics verstärken, zu weiteren Kooperationen mit Biotech-Unternehmen führen und zu einem langfristigen Ausbau der jeweiligen Kompetenzfelder im Bereich der Regenerativen Medizin beitragen.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a key player in the field of regenerative medicine due to their numerous regenerative properties. For example, their ability to selectively home into injury/inflammation areas and their immunomodulatory effects allows the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. However, the data published about MSCs showed conflicting results. Therefore, it is necessary to translate new, disease-relevant mechanisms such as immunomodulation, migration and homing into meaningful biological assay systems. Results from these assays will allow for a better understanding of the underlying mechanisms, which occur in stem cell therapy such as acute graft-versus-host disease, migration and homing of MSCs and immune cells.

Toll-like receptors (TLRs) that are expressed in or on MSCs are versatile and are responsible to control MSC proliferation and migration, repair of damaged tissues, promotion of angiogenesis, and the regulation of the immune system. For example, activation of TLR4 generally promotes upregulation of pro-inflammatory cytokines (MSC1 phenotype), whereas TLR3 stimulation promotes expression of anti-inflammatory molecules (MSC2).

Optogenetics is an innovative technique that combines genetic and optical methods for optical control of cells and thus has enriched the target and assay portfolio with a myriad of new approaches. In optogenetics, light-sensitive protein domains of photoreceptors are integrated into effector proteins to direct them with light stimuli. Consequently, light induction allows activation, inactivation, localization, or stabilization / destabilization of signaling pathways, depending on the protein type and setup.

In this project, we plan to engineer new highly standardized MSC cell lines using optogenetic manipulation, in which the specific signaling pathways of TLR3 and TLR4 can be switched on and off by light. TLR activation and real-time detection of the signaling pathways will be identified by using stable integrated reporter systems. The light-inducible cell lines will be characterized and subsequently validated under as physiologic conditions to develop more relevant in vitro models. For this, the cell lines will be cultivated under physiologic oxygen concentrations (hypoxia) and in a 3D hydrogel, which closely mimics in vivo conditions, and tested for their multipotency (stem cell character) and for the potential to induce both the pro-inflammatory (MSC1; TLR4 activation) and anti-inflammatory (MSC2; TLR3 activation) phenotype. These two biological phenotypes are accurately characterized by multiplex ELISA, gene expression and quantitative proteome analysis and compared to the non-stimulated cell or primary cell phenotype. After the 3D models are established and thoroughly characterized, both the cultivation of the complex models under physiologically relevant conditions and the light induction and analysis will be automated using the Oli-UP cell culture system. This is intended to bridge the gap between manual handling and automated cell cultivation.

This project will strengthen not only the cooperation of all partners involved here but will also promote close cooperation with other institutes and biotech companies in the field of regenerative medicine.

Projektkoordinator

- IMC Hochschule für Angewandte Wissenschaften Krems GmbH

Projektpartner

- Universität für Bodenkultur Wien
- LifeTaq-Analytics GmbH