

Projekttitel:	Korrektur patientenspezifischer induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) zur kausalen Therapie von Mukoviszidose
Projektnummer:	S03/11
Beteiligte Wissenschaftler:	Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Martin, Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe, Medizinische Hochschule Hannover; Prof. Dr. phil. Toni Cathomen, Institut für Zell- und Gentherapie, Universitätsklinikum Freiburg
Laufzeit:	Martin: 02/2011-07/2013; Cathomen: 02/2011-12/2013
Projektabschluss:	Martin: 07/2013; Cathomen: 12/2013
Fördervolumen:	235.000 Euro

Ziel des Projekts:

Langfristiges Ziel des Projektes war die Entwicklung einer innovativen Stammzelltherapie für Mukoviszidose (Zystische Fibrose, CF) basierend auf einer bahnbrechenden Entdeckung der Stammzellforschung: Aus der Haut gewonnene Zellen können im Labor so verändert werden, dass sie die gleichen Eigenschaften wie embryonale Stammzellen besitzen, d. h. sie werden zu „Alleskönnern“ (pluripotent).

Diese induzierten, also künstlich erzeugten, pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) lassen sich aus patienteneigenen Körperzellen gewinnen und beliebig vermehren. Damit werden unter anderem das Problem der geringen Verfügbarkeit von Stammzellen sowie ethische Bedenken umgangen. iPS-Zellen sind ein hervorragendes Werkzeug für die Entwicklung von Zellersatztherapien für genetische Erkrankungen wie CF, da sie sich genetisch korrigieren, vermehren und wieder zu den gewünschten Körperzellen umwandeln lassen. Außerdem können mit ihnen die Erkrankung im Labor weiter untersucht werden und entsprechende Medikamente entwickelt werden.

In diesem Projekt wurden zwei grundlegende Schritte in Richtung der Entwicklung einer Zellersatztherapie für CF erfolgreich angegangen. Zunächst wurden iPS-Zellen aus dem Blut verschiedener CF-Patienten hergestellt und charakterisiert. Anschließend erfolgte eine Korrektur des defekten Gens. Das Erreichen dieser Teilziele sowie die Umwandlung von iPS-Zellen in Zellen der Atemwege (Durchführung in zusätzlichen Forschungsprojekten) sollen nun die Basis für innovative Zelltherapieansätze zur Wiederherstellung einer normalen Lungenfunktion liefern.

Ergebnisse:

Bisher wurden aus zwei CF-Patienten, homozygot für die F508del Mutation, iPSZellen hergestellt. Die Charakterisierung der etablierten iPS-Zellen zeigte eine embryonalen Stammzellen vergleichbare Morphologie und ein entsprechendes Kulturverhalten sowie die Expression typischer Pluripotenzmarker, und belegte das Potenzial in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu können. Karyotypische Untersuchungen zeigten keine chromosomalen Veränderungen.

Am Beispiel eines bronchialen epithelialen Zellkulturmodells konnte eine funktionelle Korrektur der F508del-Mutation im CFTR Gen mithilfe sogenannter Zinkfinger-

Nukleasen und der Integration eines größeren Wildtyp (WT)-Genabschnitts durchgeführt werden. Auch in den CF-patientenspezifischen iPS-Zellen konnte das mutierte Gen erfolgreich durch eine nicht mutierte WT-Version ersetzt werden. Weitere funktionelle Analysen zur Bestätigung der vollständigen Wiederherstellung der Proteinfunktion stehen noch aus. Darüber hinaus, und von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Zelltherapiekonzepte, wurde ein Protokoll entwickelt, welches auch die rückstandslose Korrektur der genetischen Mutation in iPS-Zellen über homologe Rekombination sowie die Identifikation korrigierter Zellklone über simples PCR-Screening erlaubt. Dabei kommen sogenannte TALE-Nukleasen und einzelsträngige Oligonukleotide zum Einsatz. Die Etablierung korrigierter CF-iPS Einzelzellklone ist dabei noch ausstehend. Die Differenzierung von iPS-Zellen in respiratorische iPS-Derivate und Gallengangsepithel konnte in anders finanzierten Projekten ebenfalls erfolgreich etabliert werden, so dass das grundlegende Konzept der Projektidee bestätigt werden konnte.