

Untersuchung der Funktion des Chloridkanals TMEM16A in der Mukoviszidose-Lunge mittels induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) (1807)

Beteiligte Wissenschaftler:	Prof. Dr. Ulrich Martin, Dr. Sylvia Merkert, Dr. Ruth Olmer (LEBAO, MHH) Dr. Luis Galiotta (TIGEM, Italy)
Laufzeit:	36 Monate; 01. Dezember 2018 – 30. November 2021
Fördervolumen:	200.000 €

Ziel des Projekts: Langfristiges Ziel des Projektes war die Entwicklung eines neuen therapeutischen Ansatzes für Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF), der unabhängig von der zugrundeliegenden CFTR-Mutation ist.

Es sollte untersucht werden, ob ein alternativer Chloridkanal (TMEM16A) die Rolle des defekten CFTR-Chloridkanals übernehmen und so der gestörte Salztransport wiederhergestellt werden kann. Bisher ist unklar, ob dieser alternative Kanal den CFTR-Defekt ausgleichen könnte, wenn er aktiviert wird, oder ob eine Hemmung sinnvoll sein könnte, da der TMEM16A-Kanal die Beschaffenheit des Schleims (Mucus) in der Lunge reguliert. Für das Projekt wurden induzierte, also künstlich erzeugte, pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) verwendet. Diese „Alleskönner“ (pluripotent) lassen sich aus patienteneigenen Körperzellen gewinnen, beliebig vermehren und wieder in jede gewünschte Körperzelle, wie auch Lungenzellen, umwandeln. Damit sind sie ein hervorragendes Werkzeug für die Erforschung genetischer Erkrankungen wie CF und die Entwicklung entsprechender Medikamente und Therapien. Um zu klären ob der TMEM16A-Kanal gehemmt oder aktiviert werden muss, wurden iPS-Zellen sowohl von CF-Patienten als auch gesunden Spendern verwendet, in denen entweder das Gen für den TMEM16A-Kanal entfernt (Knockout) oder noch zusätzlich eingebracht werden sollte, um eine Überhöhung der Kanalaktivität zu erreichen (Überexpression). Diese Zellen sollten dann zu Lungenepithel umgewandelt werden, um die Effekte der veränderten TMEM16A-Aktivität auf den gestörten Salztransport und die Mucus-Beschaffenheit hin zu untersuchen.

Ergebnisse:

Über „Gene Editing“ wurde in einer CF-iPS-Zelllinie, einer Wildtyp-iPS-Zelllinie und einer korrigierten CF-iPS-Zelllinie auf klonaler Ebene sowohl eine TMEM16A-Überexpression als auch ein Knockout des TMEM16A Gens erzielt. Die generierten Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer pluripotenten Eigenschaften, ihrer genetischen Integrität und dem Verlust ihres TMEM16A-Gens bzw. der Überexpression des TMEM16A-Transgens charakterisiert.

Die Differenzierung von iPS-Zellen in Atemwegsepithel ist ein aufwändiger Prozess, der mindestens 40 Tage Zellkultivierung benötigt. Wir konnten unser Protokoll weiter optimieren

und durch die Einführung eines neuen Anreicherungs-schritts für NKX2.1^{pos} Zellen an Tag 12 der Differenzierung, eine entscheidende Verbesserung der Qualität der resultierenden Air-Liquid Interface (ALI) Kulturen erhalten. Damit ist es nun zum ersten Mal möglich, auch CF-iPS-Zell-abgeleitetes Atemwegsepithel herzustellen und funktionell zu untersuchen. Um den Anteil der Mukus-produzierenden Becherzellen (Goblet-Zellen) zu erhöhen wurde eine Stimulation mit IL-4 durchgeführt. Mittels Proteinanalysen (Western Blot) konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung die TMEM16A-Expression erhöht. Auch aufgrund pandemiebedingter Verzögerungen können abschließende funktionelle Untersuchungen zur Beurteilung des Einflusses von TMEM16A auf das CF-Atemwegsepithel erst jetzt durchgeführt werden. Die Klärung dieser Frage hat eine hohe klinische Relevanz insbesondere für CF-Patienten mit Mutationen, die bisher nur schlecht mit Medikamenten behandelt werden können. Sollte sich TMEM16A als therapeutisches Ziel eignen, können so neue Therapien auf Grundlage unseres CF-Modells entwickelt werden.