

Dritter Zwischenbericht

„Etablierung einer Plattform zur Testung von Mikrotubuli-stabilisierenden Wirkstoffen zur Behandlung von SPG4-HSP“

Prof. Dr. med Beate Winner,

Dr. rer. nat. Tania Rizo

Stammzellbiologische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen,

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen

1. Wir bedanken uns für die Unterstützung bei dem Förderverein für HSP-Forschung und möchten hiermit ein Update zum Stand unseres Projektes geben. Ziel unseres Projektes ist es, eine Mess-Plattform zu etablieren, mit der wir die Wirkung unterschiedlicher Substanzen auf humane induzierte pluripotente Stammzell (iPSZ)- abgeleitete Neurone bestimmen können. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) sind pluripotente Stammzellen, die durch künstliche Reprogrammierung von nicht-pluripotenten Hautzellen entstanden sind. Die Umwandlung wird durch eine von außen angeregte Expression spezieller Gene (Transkriptionsfaktoren) in der Körperzelle angestoßen, für die verschiedene Techniken existieren. IPS-Zellen ähneln embryonalen Stammzellen in vielen Eigenschaften stark und haben hohes medizinisches Potential, da die Forschung an ihnen weniger ethische Probleme mit sich bringt als die an embryonalen Stammzellen. Außerdem lassen sich speziell auf Patienten angepasste iPS-Zellen erzeugen.

Bisher haben wir folgendes erreicht:

1. Die Generierung neuronaler Vorläuferzellen aus IPSZ- von SPG4-Patienten und isogenen iPSZ sowie die Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie.
2. Die Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen in Neurone und die Etablierung einer Methode zur Quantifizierung axonaler Schwellungen.
3. Die Ausplattierung von Patienten- und Kontroll-Neuronen auf Microfluidics und die Messung des axonalen Transports von Mitochondrien.

Bei der Quantifizierung von axonalen Schwellungen haben wir etwas Interessantes festgestellt: Im Vergleich zu Kontroll-Neuronen, reagierten Patienten-Neurone besonders empfindlich gegenüber Kalziumänderungen und entwickelten eine erhöhte Menge an axonalen Schwellungen. Aufgrund dieser Beobachtungen haben wir überprüft, ob Veränderungen im SPG4-Gen die Kalzium-Homöostase beeinträchtigen. Der Begriff Homöostase beschreibt in der Physiologie die Aufrechterhaltung weitgehend konstanter Verhältnisse in einem offenen System. Homöostase erzeugt ein dynamisches Gleichgewicht und ist damit ein essenzielles Prinzip für die Lebenserhaltung und Funktion eines Organismus oder eines Organs.

Um die Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase bei SPG4- und Kontrollzellen zu messen, haben wir in unserem Labor die Methode des sogenannten „Kalzium-Imaging“ etabliert. In Abbildung 1 wird die Menge an Kalzium-Ionen in der Zelle über die Zeit gemessen. Anhand von einem Fluoreszenz-Farbstoffs, der abhängig von der Kalziumkonzentration sein Absorptionsmaximum ändert (von 340 zu 380nm), konnten wir beobachten, dass SPG4-Zellen tatsächlich, im Vergleich zu Kontrollen, den Kalziumhaushalt schlechter regulieren können. Wir denken, dass dies ein sehr sensibler Parameter ist, der schon vor Schwellungen oder Transportänderungen vorhanden ist. Daraufhin haben wir

verschiedene Konzentrationen an Mikrotubuli-modifizierenden Wirkstoffen, unter anderem Paclitaxel getestet, um festzustellen, ob diese die veränderte Kalzium-Homöostase in SPG4-Neuronen wiederherstellen können (siehe Abbildung 2). Wir haben uns dazu entschlossen, diese Veränderung der Kalzium Homöostase als einen weiteren Mess-Parameter in unsere Studie mit einzuschließen.

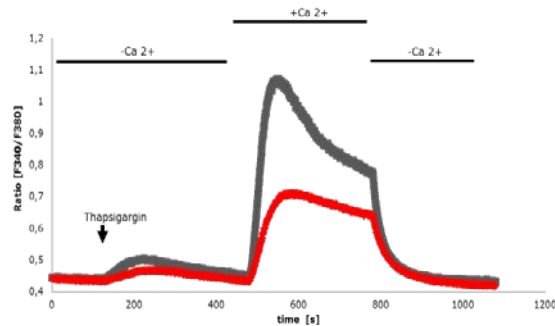


Abbildung 1. Kalzium-Imaging von iPSZ- abgeleiteten Neuronen. Die graue Kurve zeigt die Antwort von Kontroll-Neuronen auf Änderungen von Kalzium. Die rote Kurve beschreibt die Antwort von SPG4- Neuronen.

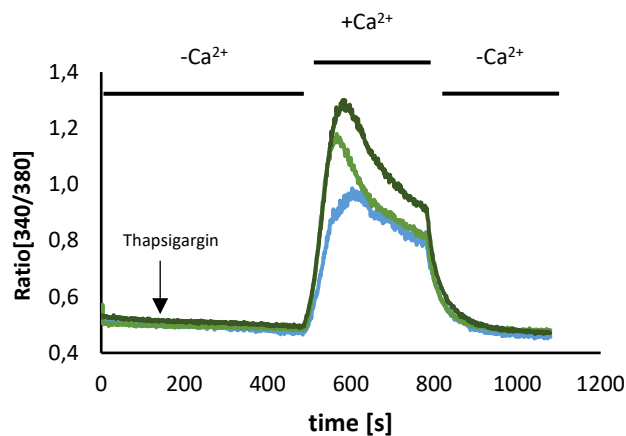


Abbildung 2. Kalzium-Imaging von iPSZ- abgeleiteten Neuronen, die mit einem Mikrotubuli-modifizierenden Wirkstoff behandelt wurden. Die blaue Kurve zeigt die Kalzium-Änderung unbehandelter SPG4- abgeleiteter Neurone. Die grünen Kurven zeigen die Kalzium-Änderung der SPG4- abgeleiteten Neuronen nach der Behandlung mit verschiedene Konzentrationen an Paclitaxel.

Als nächstes werden wir untersuchen, ob diese Konzentration an Paclitaxel, die die Kalziumantwort wiederherstellt, auch die axonalen Schwellungen reduziert. Sollte die Konzentration an Paclitaxel die Menge an axonalen Schwellungen reduzieren, würde eine Stabilisierung der Kalzium-Homöostase für eine weitere mögliche Behandlungsstrategie sprechen.

Paclitaxel hemmt durch Bindung an β -Tubulin den Abbau von Mikrotubuli. Bei der Behandlung von unterschiedlichen Krebsarten wird Paclitaxel häufig eingesetzt, da es in hohe Konzentrationen die Zellteilung hindert. Niedrig dosiertes Paclitaxel zeigte sich, in unterschiedlichen Studien vielversprechend bei der Behandlung von anderen Leiden, wie z.B. Entzündungen aber auch zur Unterstützung der Nerven-Regeneration.

In unserer Studie wird Paclitaxel ausschließlich als Model für ein Mikrotubuli stabilisierenden Wirkstoff angewendet. Parallel werden auch andere Mikrotubuli-modifizierende Wirkstoffe getestet, die weniger Nebenwirkungen aufweisen, darunter Noscopine und Davunetide.