

Institut Experimentelle Hämatologie

- **Direktor: Prof. Dr. Christopher Baum** (bis 31.03.2013)
- **Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Axel Schambach** (ab 01.04.2013)
 Tel.: 0511/532-5170 • E-Mail: schambach.axel@mh-hannover.de; baum.christopher@mh-hannover.de
 - www.mh-hannover.de/exphaema.html
 - Keywords: gene therapy, stem cells, reprogramming, hematology

Forschungsprofil

Das im April 2006 gegründete Institut für Experimentelle Hämatologie positioniert sich in Ergänzung der klinisch-hämatologischen und experimentellen Abteilungen der MHH. Unsere Forschung widmet sich der Entwicklung innovativer zell- und gentherapeutischer Ansätze bei hämatologischen Erkrankungen, der Stammzellbiologie und der Analyse ausgewählter Mechanismen der Leukämogenese. Besonders ausgewiesen ist die Expertise des Instituts in der Entwicklung optimierter Strategien zur Genmodifikation von blutbildenden Stammzellen, myeloiden Zellen und Lymphozyten und der präklinischen Evaluierung der therapeutischen Effizienz und biologischen Sicherheit genetisch modifizierter Zellen. Die Stammzell-Reprogrammierung in sog. induzierte pluripotente Stammzellen ist in den letzten Jahren als weiteres wichtiges Forschungsfeld hinzugekommen. Wir untersuchen die Grundlagen der Interaktion von Genvektoren, ihren Zielzellen und systemischen Faktoren. Zudem entwickeln wir neuartige Ansätze zum therapeutischen Gentergating mittels Designer-Nukleasen und homologer Rekombination oder persistierender episomaler Vektorsysteme. Die vom Institut erarbeiteten experimentellen Plattformen werden an der MHH sowie national und international von ausgewiesenen Partnern für die Grundlagenforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze bei angeborenen und erworbenen Erkrankungen genutzt. 2009 haben Prof. Dr. Toni Cathomen (vormals Charité Berlin, ab 07/2012 Institutsleiter, Uniklinik Freiburg) als W2 Professor für die genetische Modifikation somatischer Zellen (Schwerpunkte Designer-Nukleasen und homologe Rekombination) sowie Prof. Dr. Jürgen Bode als Honorarprofessor (Schwerpunkte replizierende Episomen und Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch) das Institut verstärkt. Weitere Arbeitsgruppenleiter sind Dr. Dr. Ute Modlich (Stammzellregeneration durch Wiederherstellung der Thrombopoietin-Signalfades; präklinische Modelle der Insertionsmutagenese in der Genterapie; ab 06/2013 Professur, Paul Ehrlich Institut Langen), Prof. Dr. Zhixiong Li (Mechanismen der Leukämogenese durch Tyrosinkinasen), Dr. Johann Meyer (Signalbiologie; Kontrolle des Zellschicksals über künstliche Rezeptoren), Dr. Bernhard Schiedlmeier (Blutstammzellexpansion unter Einfluss des Transkriptionsfaktors HOXB4 und verwandter Signalwege), Prof. Dr. Thomas Moritz (Genterapie von angeborenen Erkrankungen, Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen in Blutzellen) und Prof. Dr. Dr. Axel Schambach (retrovirale Vektorbiologie; Genvektorentwicklung zur Korrektur monogenetischer und erworbener Erkrankungen; Stammzellreprogrammierung). Bis zum 31.03.2013 hatte Prof. Dr. Christopher Baum die Leitung des Instituts inne. Seit seiner Bestellung zum Präsidenten der MHH leitet Prof. Dr. Dr. Axel Schambach, der kürzlich den Ruf auf eine W3 Professur an der MHH angenommen hat, das Institut kommissarisch.

Forschungsprojekte

Ein neues, sicheres Vektorsystem für die somatische Genterapie von Erkrankungen des Blut- und Immunsystems

Die Genterapie hat im letzten Jahrzehnt in einigen, wegweisenden klinischen Studien ihre Wirksamkeit unter Beweis gestellt. So konnten beispielsweise Patienten mit schweren Immundefekten, wie z.B. die schwere kombinierte

Immundefizienz SCID und die chronische Granulomatose, in Ermangelung eines passenden Knochenmarkspenders mit körpereigenen, genetisch korrigierten blutbildenden Stammzellen vielversprechend behandelt werden. In vielen Fällen zeigte sich eine komplette Rückbildung des Immundefekts, die behandelten Kinder und jungen Erwachsenen konnten wieder funktionelle Abwehrzellen ausformen und sich gegenüber Infektionen mit exogenen Pathogenen, wie Bakterien und Pilzen, erwehren.

Verringerung des Risikos der retroviralen Insertionsmutagenese bei der Gentherapie: Fortschritte in der Vektorarchitektur und im Integrationsverhalten von retroviralen Vektoren

Allerdings wurden in beiden oben genannten Studien auch schwere Nebenwirkungen beobachtet. Diese waren auf die Integration der Genföhre, des Vektors, in das Wirtszellgenom zurückerzuführen, was eine sogenannte „Insertionsmutagenese“ zur Folge hatte. Dabei kommt es durch die semi-zufällige Vektor-Integration zu einer Fehlregulation von benachbarten Genen, im Fall der beschriebenen Gentherapiestudien zur Hochregulation der Proto-Onkogene LMO2 und EVI1. Hierdurch kam es zu einer klonalen Proliferation von unreifen Blutzellen, was schließlich in einer akuten lymphatischen Leukämie bzw. einem prämyelodysplastischen Syndrom einmündete. Auch in einer aktuellen klinischen Gentherapie-Studie zum Wiskott-Aldrich-Syndrom zeigten sich entsprechende Nebenwirkungen, bedingt durch die insertionelle Hochregulation der Proto-Onkogene LMO2 und EVI1.

Mechanistische Analysen haben als Ursache der Insertionsmutagenese die Insertionspräferenz des zugrundeliegenden Retrovirus und die Architektur des Vektors identifiziert. So integrieren gammaretrovirale (auf dem Murinen Leukämievirus-basierende) Vektoren bevorzugt in den Promotor-/Enhancer-Regionen, während lentivirale (auf dem Humanen Immundefizienzvirus-basierende) Vektoren verstärkt in transkriptionelle Einheiten und die Gene selbst integrieren. Wie unser Institut in präklinischen Biosicherheitsassays zeigen konnte, ist insbesondere das erstgenannte gammaretrovirale Integrationspektrum mit der Präferenz von Promotor-/Enhancer-Regionen mit einem größeren Risiko der Insertionsmutagenese vergesellschaftet. Neuere Arbeiten am Institut für Virologie der MHH (Prof. Schulz) konnten in Kollaboration mit unserem Institut zeigen, dass bestimmte an die retrovirale Integrase bindende, zelluläre „Tethering“-Faktoren (die BET-Proteine) für dieses spezielle Integrationsmuster von MLV mitverantwortlich sind. Für HIV ist ein mechanistisch-ähnlich wirkender „Tethering“-Faktor (Lens Epithelium Derived Growth Factor) vor einigen Jahren identifiziert worden.

Die prototypische gammaretrovirale Vektorarchitektur mit ihren flankierenden, Promotor-/Enhancer-tragenden LTR- (Long Terminal Repeat) Regionen hat ebenfalls, insbesondere bei hohen Vektor-Kopienzahlen pro Zelle, zum erhöhten Risiko der insertionellen Hochregulation benachbarter Gene beigetragen. Eine Rekonfiguration der Vektorarchitektur mittels Inaktivierung der Promotor-/Enhancerregionen in den LTRs (sog. SIN Vektoren) und die Verwendung eines schwächeren, zellulären Promotors als sog. interner Promotor konnten, wie in unseren Arbeiten gezeigt, das Risiko der Insertionsmutagenese deutlich senken. Basierend auf diesen Erkenntnissen haben wir einen gammaretroviralen SIN-Vektor zur Korrektur von SCID entwickelt, welcher inzwischen erfolgreich in einer multizentrischen Studie in Boston, Paris, London, Los Angeles und Cincinnati verwendet wird und den Immundefekt effizient korrigieren konnte. Erfreulicherweise wurden hier noch keine Nebenwirkungen beobachtet.

Ein alpharetrovirales Vektorsystem mit nahezu neutralem Integrationspektrum

Ein Vergleich verschiedener retroviraler Gattungen hat ergeben, dass es Retroviren gibt, die ein nahezu neutrales Integrationsverhalten und so keine Präferenz für Promotor-/Enhancer-Regionen sowie Gene aufweisen. Dazu gehört das Rous Sarkomvirus (RSV), ein Alpharetrovirus, welches 1911 von Peyton Rous in Hühnern identifiziert wurde. Obgleich Wildtyp-RSV als nicht replikationskompetent in humanen Zellen galt, haben wir versucht, aus diesem evolutionär optimierten Virus ein vielversprechendes SIN Vektorsystem zu erstellen.

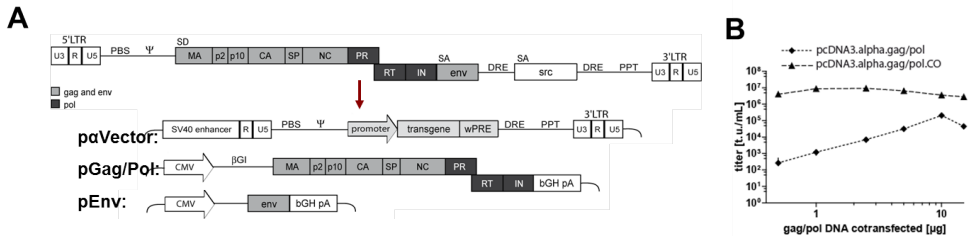


Abb. 1: Vom RSV Virus zum effizienten synthetischen 3-Plasmid Vektorsystem. (A) Oben dargestellt ist die Wildtyp Konfiguration des RSV Virus. Unten die Rekonstruktion in einem „Split-Packaging Design“, welches für die Vektorherstellung verwendet wird. Das neue alpharetrovirale Vektorsystem hat eine SIN-Architektur. Eine Überlappung von Vektor und Strukturproteinen (Gag/Pol) sowie Hüllproteinen (Env) wurde ebenso wie kryptische Spleissignale ausgeschlossen. Da nur der Vektor transferiert wird, werden in der Zielzelle keine Virusproteine gebildet. (B) Eine Kodonoptimierung (Optimierung der tRNA Nutzung hin zu von Homo sapiens favorisierten Codons) der kodierenden Regionen für die Strukturproteine (gag/pol) führte zu einer bis zu 10.000fachen Steigerung des viralen Titers.

Durch das in Abb. 1 dargestellte SIN Vektorsystem und die Codon-optimierten gag/pol Sequenzen konnten wir alpharetrovirale Vektoren mit hohem Titer erstellen. Wie für andere klinisch verwendete Vektorsysteme auch, können wir alpharetrovirale Vektoren in humanen 293(T) Zellen produzieren, so dass ein entsprechendes GMP-konformes „Upscaling“ möglich ist. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass sich alpharetrovirale Vektoren mit zahlreichen verschiedenen Hüllproteinen (z.B. das Glykoprotein vom Vesikulären Stomatitisvirus, das von einem felines Virus abgeleitete RD114 und Masernvirus-Hüllproteine) pseudotypisieren lassen, so dass eine effiziente Transduktion und optional sogar die zielgerichtete Transduktion von ausgewählte Primärzellen möglich ist.

Für spätere klinische Applikationen zur Gen- und Zelltherapie war es wichtig, im Rahmen einer autologen Knochenmarktransplantation die effiziente Transduktion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nachzuweisen. Ausgehend von einer genetisch korrigierten hämatopoetischen Stammzelle bildet sich nachfolgend das komplette Blut- und Immunsystem aus. In einem Schlüsselexperiment haben wir hämatopoetische Stammzellen der Maus mit baugleichen alpharetro- (alpha), gammaretro- (gamma) und lentiviralen (lenti) Vektoren transduziert und den Gehalt an grünen, EGFP (enhanced green fluorescent protein) –positiven Zellen in den wichtigsten Subpopulationen des Blutes bestimmt (Abb. 2; CD11b+ myeloide Zellen, CD19+ B Zellen, CD3+ T Zellen). Zusammenfassend konnte eine gleichbleibende EGFP Markierung für alle Vektorsysteme in allen 3 Linien nachgewiesen werden. Dieses deutet auf eine effiziente genetische Korrektur von hämatopoetischen Stammzellen hin. Diesen Punkt haben wir in einer sekundären Transplantation von genetisch korrigierten Stammzellen weiter untermauert.

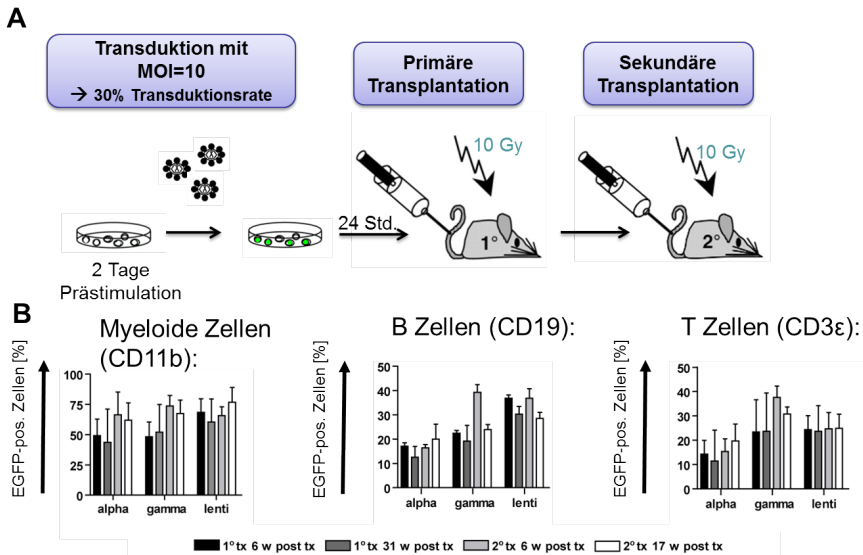


Abb. 2: Alpharetrovirale Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen im seriellen Knochenmarkstransplantationsmodell. (A) Übersicht über die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen (grün) und nachfolgende Transplantation in letal bestrahlte Empfängermäuse (10 Gy). Die hämatopoetischen Stammzellen wurden 2 Tage in Gegenwart von serum-freiem Medium und Zytokinen vorstimuliert und nachfolgend mit einem alpharetroviralen, EGFP-exprimierenden SIN Vektor transduziert (Transduktionsrate etwa 30%, angelegte Multiplicity of Infection von 10). Im Anschluss wurde mit den hämatopoetischen Stammzellen der Empfängermäuse der ersten Transplantation eine sekundäre Transplantation in weitere Empfängertiere durchgeführt, um das Langzeitanwachsen der transduzierten hämatopoetischen Stammzellen zu dokumentieren. (B) Die Prozentzahl der EGFP-positiven Zellen in den verschiedenen Linien des Blutes ist aufgetragen. Die verschiedenen Balken indizieren die verschiedenen benutzten Vektorsysteme (alpharetrovirale, gammaretrovirale und lentivirale Vektoren), gemessen während des 1. Transplantations (tx) zu den Zeitpunkten 6 und 31 Wochen (w) und während der 2. Transplantation 6 und 17 Wochen nach Transplantationsbeginn.

Neben der Effizienzbetrachtung war es besonders wichtig, auch eine verbesserte Biosicherheit und reduzierte Genotoxizität der alpharetroviralen SIN Vektoren nachzuweisen. Hierzu haben wir baugleiche alpharetrovirale, gammaretrovirale und lentivirale SIN Vektoren mit einem starken viralen Promotor verglichen. In einem von unserem Institut entwickelten IVIM (In Vitro Immortalization Assay, Modlich et al. 2006) Assay konnten wir eine deutlich geringere Replattierungsrate von transduzierten Mauszellen nachweisen (Abb. 3). Hierbei hat der alpharetrovirale Vektor eine geringere Frequenz an Transformationsereignissen als schon klinisch verwendete gammaretro- und lentivirale Vektoren gezeigt. Insgesamt wies dies auf ein niedrigeres Risiko zur zellulären Transformation von murinen Blutvorläuferzellen hin, gepaart mit einer niedrigeren Fitness von auftretenden transformierten Klonen.

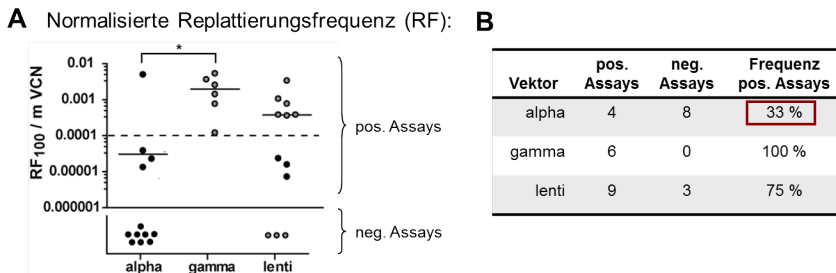


Abb. 3: Alpharetrovirale Vektoren haben ein geringeres Risiko zur insertionellen Transformation von Zellen des Blutsystems. (A) Um das Risiko der insertionellen Transformation zu untersuchen, haben wir mittels des IVIM (In Vitro Immortalization Assay, Modlich et al. 2006) die Replattierungsrate, normalisiert auf die Viruskopienanzahl (VCN), von baugleichen alpharetro-, gammaretro- und lentiviralen Vektoren verglichen. (B) Darstellung der positiven und negativen Assays im Vergleich der verschiedenen Vektorsysteme.

Als wichtigen nächsten Schritt haben wir die Wirksamkeit der alpharetroviralen Vektoren in humanen Zellpopulationen gezeigt, die routinemässig klinisch für Transplantationszwecke verwendet werden (Abb. 3). Zunächst haben wir humane CD34-positive Zellen transduziert, welche als hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen für Stammzelltransplantationen genutzt werden. Abb. 3B zeigt eine sehr effiziente Transduktion schon unter Verwendung niedriger Vektordosen. Desweiteren haben wir gute Transduktionsraten in humanen T Lymphozyten erzielt.

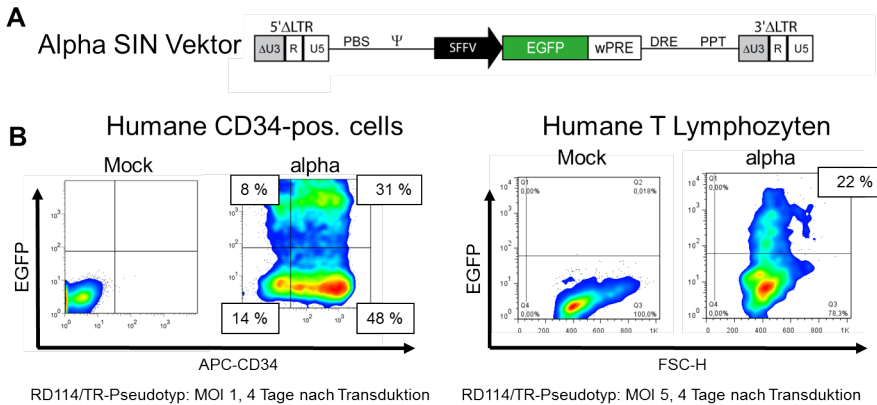


Abb. 4: Transduktion klinisch verwendeter Zelltypen mit Transplantationsrelevanz. (A) Schema des verwendeten alpharetroviralen SIN Vektors. Dieser enthält eine SFFV (Spleen Focus Forming Virus) U3-getriebene EGFP Expressionskassette. (B) Humane CD34+ Vorläuferzellen und T- Zellen wurden mit dem angegebenen Vektor transduziert. Die EGFP-positiven Zellen finden sich in den oberen Quadranten.

Zusammenfassung und Perspektive

Alpharetrovirale Vektoren stellen eine interessante, neue Alternative für die genetische Modifikation von Stammzellen und reifen Effektorzellen dar. Schon mit niedriger Virusdosis konnten wir effizient humane und murine Zellen des hämatopoetischen Systems transduzieren. Gepaart mit der möglicherweise reduzierten Genotoxizität stellen alpharetrovirale Vektoren vielversprechende Gentransfervehikel zur genetischen Modifikation von transplantierbaren Zellen dar. In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass es möglich sein wird, stabile Verpackungszellen für die alpharetrovirale Vektorproduktion zu etablieren. Perspektivisch ergeben sich dadurch zahlreiche Applikationsformen für translationale Anwendungen von genetisch modifizierten blutbildenden Stammzellen (z.B. zur Gen- und Zelltherapie) und T Lymphozyten (z.B. Chimäre Antigenrezeptoren und Graft vs. Host Disease Prophylaxe) an der MHH innerhalb von REBIRTH, dem IFB-Tx und dem SFB738.

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Sürth, Julia (Dr. rer. nat.); Förderung: DFG Exzellenzcluster REBIRTH, BMBF, DAAD

Weitere Forschungsprojekte

Zellprogrammierung und kontrollierte Differenzierung durch gezielte Genmodifikation

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Bode, Jürgen (Prof. Dr. rer. nat.), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Cathomen, Toni (Prof. Dr. phil.); Kooperationspartner: Internationales Konsortium; Förderung: BMBF (ReGene)

Regenerative Gene Therapy

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Kooperationspartner: Nationales Konsortium; Förderung: DFG (Exzellenzcluster REBIRTH)

Zellulare Reprogrammierungsplattform für vererbte Immundefekte

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Internationales Konsortium - Pädiatisches Immundefizienz-Netzwerk; Förderung: BMBF (PidNet)

Alpharetrovirales Verpackungssystem

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Förderung: Rentschler Biotech

Neue Methoden der Gentherapie für angeborene und erworbene Erkrankungen

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Duanqing Pei (Prof. Dr.); Kooperationspartner: deutsch-chinesische Juniorforschergruppen; Förderung: DAAD und BMBF

Zellbasierte Verfahren für seltene Lungenerkrankungen CarpuD 2. Subprojekt 1: "Alpha1-Antitrypsin-Defizienz"

■ Projektleitung: Bals, Robert (Prof. Dr. med.), Ott, Michael (Prof. Dr. med.), Cantz, Tobias (PD Dr. med.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: BMBF (CARPuD 2)

Reversible Zellmodifikation mittels pseudoretroviraler und epi-retroviraler Transduktion

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Bode Jürgen (Prof. Dr. rer. nat.); Kooperationspartner: Sonderforschungsbereich 738, C4; Förderung: DFG (SFB 738)

Herstellung von therapeutischen Stammzelltransplantaten durch gezielte Genmodifikation

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Cathomen, Toni (Prof. Dr. phil.); Kooperationspartner: Sonderforschungsbereich 738, C9; Förderung: DFG (SFB 738)

Enhanced and Synthetic Cells for Regeneration

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Kooperationspartner: Nationales Konsortium; Förderung: DFG (Exzellenzcluster REBIRTH)

iPSC based Hematopoietic Regeneration

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med. PhD); Kooperationspartner: Nationales Konsortium; Förderung: DFG (Exzellenzcluster REBIRTH)

iPSCs for Disease Modelling, Drug Screening and Cell Therapy

■ Projektleitung: Martin, Ulrich (Prof. Dr. med.), Bode, Jürgen (Prof. Dr. rer. nat.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Cantz, Tobias (PD Dr. med.), Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Nationales Konsortium; Förderung: DFG (Exzellenzcluster REBIRTH)

Bedeutung der Aktivierung multipler Rezeptor-Proteintyrosinkinasen für die Leukämogenese

■ Projektleitung: Li, Zhixiong (Prof. Dr. med.), Meyer, Johann (Dr. rer. nat.), Krauter, Jürgen (PD Dr. med.); Förderung: DFG

Zielzellen insertioneller Transformation in der Hämatopoese

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Li, Zhixiong (Prof. Dr. med.), Kustikova, Olga (PhD); Förderung: DFG- Schwerpunktprogramm (SPP 1230)

Synergismus genetischer und epigenetischer Dysregulation als Mechanismus in der Leukämogenese

■ Projektleitung: Rudolf, Cornelia (Dr. rer. nat.), Modlich, Ute (Prof. Dr. med. vet.); Förderung: DFG

Humanized models to assess the genotoxicity of viral vectors in the context of hematopoietic stem cell expansion and in vivo selection

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.), Modlich, Ute (Prof. Dr. med. vet.); Förderung: DFG- Schwerpunktprogramm (SPP 1230)

Integrated Project: Persisting transgenesis (Acronym: PERSIST)

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Europäisches Konsortium; Förderung: EU 7. Rahmenprogramm

Cell-based Therapies for Treatment of Primary ImmunoDeficiency (CELL-PID)

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Kooperationspartner: Europäisches Konsortium; Förderung: EU 7. Rahmenprogramm

mTOR-Abhängigkeit und mTOR-Inhibitorresistenz bei akuten Leukämien

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Förderung: José Carreras Stiftung (Stipendium Adrian Schwarzer)

Development of HSC gene therapy for the treatment of HAX1-deficient severe congenital neutropenia

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: BMBF IFB-Tx

Erfassung AML-assoziiierter Leukämieantigene für den gerichteten adoptiven Transfer von T-Vorläuferzellen nach allogener Blutstammzelltransplantation

■ Projektleitung: Sauer, Martin (Prof. Dr. med.), Heuser, Michael (PD Dr. med.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: BMBF IFB-Tx

Intratracheale Transplantation gentherapeutisch korrigierter Monozyten als innovativer Therapieansatz bei der pulmonalen Alveolarproteinose

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.), Hansen, Gesine (Prof. Dr. med.); Förderung: Else Kröner-Fresenius-Stiftung

Cytidin-Deaminase als Selektionsmarker im Rahmen hämatologischer Erkrankungen

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG

Verbesserte Transgenexpression in pluripotenten Stammzellen und aus ihnen abgeleiteten Geweben durch den Einsatz von Ubiquitous Chromatin Opening Elements (UCOE)

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.); Förderung: DFG

ANRS HIV-GT: Entwicklung eines Protokolls für die Gentherapie HIV-positiver Patienten mit hämatologischen Malignomen

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: ANRS - French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis

"RAG 1" Gene-corrected stem cells for curative treatment of SCID

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: ZonMw - Netherlands Organisation for Health Research and Development

Combining ex vivo gene therapy with stem cell transplanation for junctional epidermolysis

■ Projektleitung: Baum, Christopher (Prof. Dr. med.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: Debra International, Austria

e-Rare: Splicing Therapies for Dystrophic Epidermolysis Bullosa, kurz "SpliceEB"

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: EU

RNA-programmierbare Cas9 Technologie für gezielte gentechnische Ansätze in den Bereichen regenerative Medizin und Infektionskrankheiten

■ Projektleitung: Charpentier, Emmanuelle (Prof. PhD), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Förderung: HZI Braunschweig, Humboldt Professur

Preclinical genotoxicity assessment of lentiviral vectors

■ Projektleitung: Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Rothe, Michael (Dr. rer. nat.), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Förderung: Leidos Biomedical Research, Inc., USA

Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells for cell and gene therapeutic applications using Resveratrol

■ Projektleitung: Heinz, Niels (Dr. rer. nat.); Förderung: HiLF, MHH

Hematopoietic Gene Therapy of CSF2RA-Deficient Pulmonary Alveolar Proteinosis (PAP) utilizing patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs)

■ Projektleitung: Lachman, Nico (Dr. rer. nat.); Förderung: HiLF, MHH

MicroRNAs modulating hematopoietic differentiation from pluripotent stem cells

■ Projektleitung: Pfaff, Nils (Dr. rer. nat.); Förderung: HiLF, MHH

Hämatopoetische Differenzierung pluripotenter humaner iPS- und ES-Zellen zu terminal differenzierten myeloischen Zellen

■ Projektleitung: Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.)

Risikoanalyse von gentherapeutischen Vektoren mittels eines in vitro Assays

■ Projektleitung: Rothe, Michael (Dr. rer. nat.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.)

Entwicklung alpharetroviraler Vektoren für die T-Zell-basierte Immuntherapie

■ Projektleitung: Sürth, Julia (Dr. rer. nat.), Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD), Baum, Christopher (Prof. Dr. med.)

Charakterisierung des durch retrovirale Partikel vermittelten Transfers von Membranproteinen (REMPT)

■ Projektleitung: Galla, Melanie (Dr. rer. nat.), Meyer, Johann (Dr. rer. nat.)

Quantifizierung des dosisabhängigen transformierenden Potentials von Onkogenen

■ Projektleitung: Morgan, Michael (PD Dr. rer. nat.), Kustikova, Olga (PhD)

Originalpublikationen

Ackermann M, Lachmann N, Hartung S, Eggenschwiler R, Pfaff N, Happle C, Mucci A, Göhring G, Niemann H, Hansen G, Schambach A, Cantz T, Zweigerdt R, Moritz T. Promoter and lineage independent anti-silencing activity of the A2 ubiquitous chromatin opening element for optimized human pluripotent stem cell-based gene therapy. *Biomaterials* 2014;35(5):1531-1542

Brugman MH, Suerth JD, Rothe M, Suerbaum S, Schambach A, Modlich U, Kustikova O, Baum C. Evaluating a Ligation-Mediated PCR and Pyrosequencing Method for the Detection of Clonal Contribution in Polyclonal Retrovirally Transduced Samples. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24(2):68-79

Chaturvedi A, Araujo Cruz MM, Jyotsana N, Sharma A, Yun H, Görlich K, Wichmann M, Schwarzer A, Preller M, Thol F, Meyer J, Haemmerle R, Struys EA, Jansen EE, Modlich U, Li Z, Sly LM, Geffers R, Lindner R, Manstein DJ, Lehmann U, Krauter J, Ganser A, Heuser M. Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML. *Blood* 2013;122(16):2877-2887

Eggenschwiler R, Loya K, Wu G, Sharma AD, Sgodda M, Zychlinski D, Herr C, Steinemann D, Teckman J, Bals R, Ott M, Schambach A,

Schöler HR, Cantz T. Sustained Knockdown of a Disease-Causing Gene in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Using Lentiviral Vector-Based Gene Therapy. *Stem Cells Transl Med* 2013;2(9):641-654

Gross B, Sgodda M, Rasche M, Schambach A, Göhring G, Schlegelberger B, Greber B, Linden T, Reinhardt D, Cantz T, Klusmann JH. Improved generation of patient-specific induced pluripotent stem cells using a chemically-defined and matrigel-based approach. *Curr Mol Med* 2013;13(5):765-776

Gupta K, Kuznetsova I, Klimenkova O, Klimiankou M, Meyer J, Moore MA, Zeidler C, Welte K, Skokowa J. Bortezomib induces granulocytic differentiation of CD34+ cells from congenital neutropenia patients by reversing hyperactivate-STAT5a-dependent downregulation of LEF-1. *Blood* 2014;DOI: 10.1182/blood-2012-09-456889

Gupta SS, Maetzig T, Maertens GN, Sharif A, Rothe M, Weidner-Glunde M, Galla M, Schambach A, Cherepanov P, Schulz TF. Bromo- and extraterminal domain chromatin regulators serve as cofactors for murine leukemia virus integration. *J Virol* 2013;87(23):12721-12736

- Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, Armbrecht N, Longerich T, Woller N, Kloos A, Hoffmann D, Schambach A, Wirth TC, Manns MP, Zender L, Kubicka S, Kühnel F. Adjuvant gemcitabine therapy improves survival in a locally induced, R0-resectable model of metastatic intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2013;58(3):1031-1041
- Hauber I, Hofmann-Sieber H, Chemnitz J, Dubrau D, Chusainow J, Stucka R, Hartjen P, Schambach A, Ziegler P, Hackmann K, Schrock E, Schumacher U, Lindner C, Grundhoff A, Baum C, Manz MG, Buchholz F, Hauber J. Highly significant antiviral activity of HIV-1 LTR-specific tre-recombinase in humanized mice. *PLoS Pathog* 2013;9(9):e1003587
- Heinz N, Hennig K, Loew R. Graded or threshold response of the tet-controlled gene expression: all depends on the concentration of the transactivator. *BMC Biotechnol* 2013;13:5-6750-13-5
- Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, Krawitz PM, Robinson PN, Hecht J, Puchalka J, Gertz EM, Schäffer AA, Lawrence MG, Kardava L, Pfeifer D, Baumann U, Pfister ED, Hanson EP, Schambach A, Jacobs R, Kreipe H, Moir S, Milner JD, Schwillke P, Mundlos S, Klein C. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* 2013;210(3):433-443
- Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science* 2014;343(6168):301-305
- Lachmann N, Happle C, Ackermann M, Lüttge D, Wetzke M, Merkert S, Hetzel M, Kensah G, Jara-Avaca M, Mucci A, Skuljec J, Dittrich AM, Pfaff N, Brenning S, Schambach A, Steinemann D, Göhring G, Cantz T, Martin U, Schwerk N, Hansen G, Moritz T. Gene Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells Repairs the Cellular Phenotype in Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189(2):167-182
- Mandel K, Yang Y, Schambach A, Glage S, Otte A, Hass R. Mesenchymal stem cells (MSC) directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev* 2013;22(23):3114-3127
- Moiani A, Miccio A, Rizzi E, Severgnini M, Pellin D, Suerth JD, Baum C, De Bellis G, Mavilio F. Deletion of the LTR enhancer/promoter has no impact on the integration profile of MLV vectors in human hematopoietic progenitors. *PLoS One* 2013;8(1):e55721
- Pfaff N, Lachmann N, Ackermann M, Kohlscheen S, Brendel C, Maetzig T, Niemann H, Antoniou MN, Grez M, Schambach A, Cantz T, Moritz T. A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) prevents transgene silencing in pluripotent stem cells and their differentiated progeny. *Stem Cells* 2013;31(3):488-499
- Phaltane R, Haemmerle R, Rothe M, Modlich U, Moritz T. Efficiency and safety of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT-P140K) mediated in vivo selection in a humanized mouse model. *Hum Gene Ther* 2014;25(2):144-155
- Reuss S, Sebestyen Z, Heinz N, Loew R, Baum C, Debets R, Uckert W. TCR-engineered T cells: A model of inducible TCR expression to dissect the interrelationship between two TCRs. *Eur J Immunol* 2014;44(1):265-274
- Sgodda M, Mobus S, Hoepfner J, Sharma AD, Schambach A, Greber B, Ott M, Cantz T. Improved hepatic differentiation strategies for human induced pluripotent stem cells. *Curr Mol Med* 2013;13(5):842-855
- Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014;343(6166):84-87
- Stein S, Scholz S, Schwäble J, Sadat MA, Modlich U, Schultze-Strasser S, Diaz M, Chen-Wichmann L, Müller-Kuller U, Brendel C, Fronza R, Kaufmann KB, Naundorf S, Pech NK, Travers JB, Matute JD, Presson RG Jr, Sandusky GE, Kunkel H, Rudolf E, Dillmann A, von Kalle C, Kühlcke K, Baum C, Schambach A, Dinauer MC, Schmidt M, Grez M. From Bench to Bedside: Preclinical Evaluation of a Self-Inactivating Gammaretroviral Vector for the Gene Therapy of X-linked Chronic Granulomatous Disease. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2013;24(2):86-98
- Sundarasetty BS, Singh VK, Salguero G, Geffers R, Rickmann M, Macke L, Borchers S, Figueiredo C, Schambach A, Gullberg U, Provasi E, Bonini C, Ganser A, Woelfel T, Stripecte R. Lentivirus-induced dendritic cells for immunization against high-risk WT1+ acute myeloid leukemia. *Hum Gene Ther* 2013;24(2):220-237
- Thomay K, Schienke A, Vajen B, Modlich U, Schambach A, Hofmann W, Schlegelberger B, Göhring G. Chromosomal Instability and Telomere Shortening in Long-Term Culture of Hematopoietic Stem Cells: Insights from a Cell Culture Model of RPS14 Haploinsufficiency. *Cytogenet Genome Res* 2014;142(1):14-20
- Vajen B, Modlich U, Schienke A, Wolf S, Skawran B, Hofmann W, Büsche G, Kreipe H, Baum C, Santos-Bariopedro I, Vaquero A, Schlegelberger B, Rudolph C. Histone methyltransferase Suv39h1 deficiency prevents Myc-induced chromosomal instability in murine myeloid leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 2013;52(4):423-430
- Volkman I, Kumarswamy R, Pfaff N, Fiedler J, Dangwal S, Holzmann A, Batkai S, Geffers R, Lothar A, Hein L, Thum T. MicroRNA-mediated epigenetic silencing of sirtuin1 contributes to impaired angiogenic responses. *Circ Res* 2013;113(8):997-1003
- Yang M, Büsche G, Ganser A, Li Z. Cytological characterization of murine bone marrow and spleen hematopoietic compartments for improved assessment of toxicity in preclinical gene marking models. *Ann Hematol* 2013;92(5):595-604 Yang M, Büsche G, Ganser A, Li Z. Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. *Ann Hematol* 2013;92(5):587-594
- Zwingerberger S, Yao Z, Jacobi A, Vater C, Valladares RD, Li C, Nich C, Rao AJ, Christman JE, Antonios JK, Gibon E, Schambach A, Maetzig T, Goodman SB, Stiehler M. Enhancement of BMP-2

Induced Bone Regeneration by SDF-1alpha Mediated Stem Cell Recruitment. *Tissue Eng Part A* 2014;20(3-4):810-818

Übersichtsarbeiten

Glauche I, Bystrykh L, Eaves C, Roeder I, other participants. Stem cell clonality - theoretical concepts, experimental techniques, and clinical challenges. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50(4):232-240

Kaufmann KB, Buning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 2013;5(11):1642-1661

Lachmann N, Brenning S, Phaltane R, Flasshove M, Dilloo D, Moritz T. Myeloprotection by cytidine deaminase gene transfer in antileukemic therapy. *Neoplasia* 2013;15(3):239-248

Rothe M, Modlich U, Schambach A. Biosafety Challenges for Use of Lentiviral Vectors in Gene Therapy. *Curr Gene Ther* 2013;13(6):453-468

Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstrom B, Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2013;24(2):132-142

Buchbeiträge, Monografien

Baum C. Medizinisch-naturwissenschaftliche Aspekte. In: Baum C, Duttge G, Fuchs M [Hrsg.]: *Gentherapie: medizinisch-naturwissenschaftliche, rechtliche und ethische Aspekte*. Freiburg im Breisgau: Verl. Karl Alber, 2013. S. 9-40 (Ethik in den Biowissenschaften; 15)

Lachmann L, Brenning S, Moritz T. Cytidine Deaminase in Myeloprotective Gene Therapy. In: Lattime EC, Gerson SL [Hrsg.]: *Gene Therapy of Cancer*. 3. Aufl. Amsterdam: Elsevier Science & Technology, 2013. S. 423-441

Nehlsen K, Broll S, Kandimalla R, Heinz N, Heine M, Binius S, Schambach A, Bode J. Replicating Minicircles: Overcoming the limitations of transient and of stable expression systems. In: Schlee M [Hrsg.]: *Minicircle and miniplasmid DNA vectors: the future of nonviral and viral gene transfer*. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2013. S. 115-164

Abstracts

2013 wurden 71 Abstracts publiziert.

Promotionen

Godinho, Tamaryin (Dr. rer. nat.): Retroviral envelope mediated transfer of membrane proteins.

Hämmerle, Reinhard (Dr. rer. nat., Mag. rer. nat.): A humanized transplantation model for the assessment of viral vectors in human hematopoietic cells.

Phaltane, Ruhi (PhD M.Sc.Biotechnology): Assessment of MGMT P140k-mediated chemoselection strategies for hematopoietic gene therapy.

Warlich, Eva Susanne Julia (Dr. rer. nat.): Characterization of cellular reprogramming and development of selective enrichment strategies for induced pluripotent stem cells.

Master

Schauerte, Celina (M.Sc.): Inhibition der eIF4E-eIF4G-Wechselwirkung: Auswirkungen auf die Translation in vitro und in vivo in einem Tumormodell der Maus.

Bachelor

Schröder, Simon (B.Sc.): Etablierung einer Methode zur Detektion und Quantifizierung transduzierter Zellen mittels retroviraler Tag-Sequenzen.

Stipendien

Schwarzer, Adrian: Deutsche José-Carreras Stiftung.

Geis, Franziska: PhD Program Regenerative Sciences.

Ackermann, Mania: Exzellenzcluster REBIRTH im PhD Programm Regenerative Sciences.

Brenning, Sebastian: HBRS im PhD Program Molecular Medicine.

Fritsch, Jessica: HBRS im PhD Programm Regenerative Sciences.

Kuhn, Alexandra: Reisestipendium für die 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT), Hamburg, "Tightly regulated Doxycycline (Dox)-inducible lentiviral vectors for human myeloprotective gene therapy: in vitro and CD34+ xenotransplant studies".

Lachmann, Nico (Dr. rer. nat.): Reisestipendium für die 11. Jahrestagung der "International Society for Stem Cell Research" (ISSCR), Boston, USA, "Generation of Functional Monocyte/Macrophages by Genetical Correction of Patient-Specific iPSC in Congenital Pulmonary Alveolar Proteinosis".

Pfaff, Niels (Dr. rer. nat.): Reisestipendium für die 11. Jahrestagung der "International Society for Stem Cell Research" (ISSCR), Boston, USA, "MicroRNA-mediated Epigenetic Regulation Represents a Roadblock for the Generation of iPSCs".

Wissenschaftspreise

Hoffmann, Dirk (Dr. rer. nat.): Reisestipendium für der 19. Jahrestagung der "Deutschen Gesellschaft für Gentherapie" (DG-GT), Hamburg.

Lachmann, Nico (Dr. rer. nat.); Moritz, Thomas (Prof. Dr. med.): Eva Luise Köhler Forschungspreis für Seltene Erkrankungen an Prof. Gesine Hansen, Dr. Christine Happel, Dr. Nico Lachmann und Prof. Thomas Moritz, für das Projekt "Innovative Gentherapie bei seltenen monogenen Erkrankungen der Lunge".

Nils Pfaff (Dr. rer. nat.): "The Berrie Hesp Scholarship" an Dr. Nils Pfaff für das Keystone Symposium in Vancouver, "Noncoding RNAs in Development and Cancer".

Auszeichnung

Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Kustikova, Olga (PhD): Diploma of Excellence awarded by *Leukemia Journal* for a selection of worthy articles in 2012/2013. Awarded to Prof. Dr. Christopher Baum with the co-authorship of O. Kustikova, M. Stahlhut, A. Schwarzer, M. Brugman, T. Neumann et al for the paper entitled:

Activation of Evi1 inhibits cell cycle progression and differentiation of hematopoietic progenitor cells. (Kustikova O. et al; Leukemia).

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Baum, Christopher (Prof. Dr. med.): Deputy Editor von Molecular Therapy; Editorial Board von Human Gene Therapy; Gutachter für Journals: Annals of the New York Academy of Sciences, Blood, Cancer Cell, Cancer Gene Therapy, Cell Stem Cells, Current Gene Therapy, Gene Therapy, Human Gene Therapy, Molecular Therapy, Nature Methods, PLoS One, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Science. Gutachter für Drittmittelgeber: ATIP-Avenir, Deutsche Krebshilfe, DFG, EU, Deutsche Studienstiftung, University of Modena, Wilhelm Sander Stiftung; Vizekoordinator des Exzellenzclusters REBIRTH; Koordinator des PhD Programms Regenerative Sciences; Forschungsdekan der MHH.

Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD): Gutachter bei J Biotechnology, Biotechniques, Blood, BMC Biotechnology, Exp Hematol, Gene, Gene Ther, Hum Gene Ther, Hum Gene Ther Methods, J Gen Med, J Gene Virol; Virology, Current Gene Therapy, Cellular Therapy and Transplantation, Haematologica, Applied Microbiology and Biotechnology, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Molecular Therapy, Molecular Therapy - Nucleic Acids, Molecular Pharmaceutics, Expert Opinion for Biological Therapy, Molecular Pharmaceutics, Expert Opinion for Biological Therapy, Molecular Biology Reports, Annals of Hematology, Nature Protocols, Cell Regeneration und als Gutachter in der Auswahlkommission der Studienstiftung des deutschen Volkes. Mitwirkung in Auswahlkommissionen der PhD Programme und Prüfungskommissionen der HBRS. Associate Editor bei Current Gene Therapy. Editor bei Current Gene Therapy und Editor bei Cell Regeneration.

Bode, Jürgen (Prof. Dr. rer. nat.): Mitglied in den Advisory Boards von Reulon Inc. (seit 1997) und CellCA (seit 2008). Reviewer für Förderungen der DFG und des BARD (Israel Binational Agricultural Research and Development Fund). Gutachter für Gene Therapy, Journal of Biotechnology, Journal of Molecular Biology, Journal of Microbiology and Biotechnology, Molecular and Cellular Biology, Nucleic Acids Research, PLoS Biology, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Vorlesung und Tutorial im Rahmen des PhD-Programms 'Regenerative Sciences' (REBIRTH/HBRS). Masterarbeiten und Promotionen an der MHH und extern (TU Braunschweig, Universität Lausanne).

Modlich, Ute (Prof. Dr. med. vet.): Gutachter bei den Fachjournals Genes, Chromosomes and Cancer, Gene Therapy, Haematologica, Molecular Therapy, Molecular Therapy Nucleic Acid, Neoplasia,

Platelets; Gutachter für die DFG; Gutachter für Abstracts der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie; Betreuerin und Co-Betreuerin für Studenten im HBRS PhD Programm.

Schiedlmeier, Bernd (Dr. rer. nat.): Gutachter im Subkomitee "Stem Cell Modification" für Forschungsprojekte des IFB-Tx; Managementmitglied der COST-Action BM0805 "HOX & TALE Proteins in Development and Disease"; Betreuung FWJ-ler.

Meyer, Johann (Dr. rer. nat.): Co-Betreuer in den PhD-Programmen "Molecular Medicine" und "Regenerative Sciences".

Morgan, Michael (PD Dr. rer. nat.): Editorial Review Board von Journal of Hematological Malignancies; Gutachter bei Fachjournals Molecular Cancer Therapeutics, Stem Cells Translational Medicine and Cancer Research; Betreuung von Masterstudenten und FWJ-ler.

Schwarzer, Adrian (Dr. med. PhD): Etablierung einer mR30 basierten shRNA Plattform; bioinformatische Plattform für die Analyse von Microarray Daten, Betreuung FWJ-ler.

Sürth, Julia (Dr. rer. nat.): Betreuung FWJ-ler.

Galla, Melanie (Dr. rer. nat.): Betreuung FWJ-ler.

Rothe, Michael (Dr. rer. nat.): Betreuung FWJ-ler.

Hoffmann, Dirk (Dr. rer. nat.): Betreuung FWJ-ler.

Li, Zhixiong (Prof. Dr. med.): Editorial Board von Annals Hematology und World Journal of Hematology; Gutachter bei Fachjournals Eur J Hematol, Expert Review of Hematology, Hematological Oncology, International Journal of Biomedical Science; Gutachter für Verleihung eines Forschungspreises der Chinesischen Regierung.

Lachmann, Nico (Dr. rer. nat.): Teach the teacher - Lehrerfortbildung im Rahmen der Förderung Zellux.net des Stammzellnetzwerkes Nordrhein-Westfalen in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin in Münster; Rebirth goes back to school - Aktuelle biomedizinische Forschung leicht verständlich für Schüler. Initiiert von Dr. Nico Lachman und durchgeführt gemeinsam mit Mania Ackermann an Gymnasien in Burgdorf, Clausthal-Zellerfeld und Wolfsburg.

Patente

Schambach, Axel (Prof. Dr. med. PhD); Baum, Christopher (Prof. Dr. med.); Sürth, Julia (Dr. rer. nat.): Patent Alpharetrovirale Vektoren (USA, EU, Russland).