

## Unterrichtung

### durch die Bundesregierung

#### Vierter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes (Vierter Stammzellbericht)

##### Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Genehmigungsteil</b> .....	3
1.1 Berichtsauftrag und Berichtszeitraum .....	3
1.2 Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren .....	3
1.2.1 Überblick über die im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben .....	3
1.2.2 Angaben zu den im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben .....	3
1.3 Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG .....	10
1.4 Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES) .....	12
<b>2 Stand der Forschung mit pluripotenten menschlichen Stammzellen</b> .....	13
2.1 Einleitung .....	13
2.2 Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien .....	13
2.3 Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen .....	14
2.3.1 Unterschiede zwischen hES-Zelllinien .....	14
2.3.2 Erkenntnisse aus dem Vergleich von humanen ES- und Maus-ES-Zellen .....	14
2.3.3 Bestimmende Merkmale pluripotenter Stammzellen .....	15
2.3.4 Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen .....	15
2.4 Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen .....	16

	Seite
2.4.1 Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus Blastomer-Biopsien .....	16
2.4.2 Kerntransfer-Verfahren .....	16
2.4.3 Gewinnung von Stammzellen ausgehend von Keimzellen und deren Vorläuferzellen .....	17
2.4.4 Fötale Stammzellen .....	18
2.4.5 Reprogrammierung von Körperzellen .....	18
2.4.6 Transdifferenzierung .....	20
2.5 Entwicklung von Therapien und Testmethoden mit hES- und hiPS-Zellen .....	20
2.5.1 Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen .....	20
2.5.2 Pharmakologische/Toxikologische Substanztestung und Wirkstoffscreening .....	22
2.5.3 Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen .....	23
2.5.4 Entwicklung möglicher Stammzell-Therapien in präklinischen Tiermodellen .....	23
<b>3 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>24</b>
<b>Glossar .....</b>	<b>25</b>
<b>Ausgewählte Internetadressen .....</b>	<b>27</b>
<b>Zitierte Literatur .....</b>	<b>28</b>

## 1 Genehmigungsteil

### 1.1 Berichtsauftrag und Berichtszeitraum

Dieser Erfahrungsbericht erfolgt aufgrund von § 15 des Gesetzes zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG) vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), zuletzt geändert durch das Gesetz zur Änderung des StZG vom 14. August 2008 (BGBl. I S. 1708). Er umfasst den Zeitraum vom 1. Januar 2008 bis zum 31. Dezember 2009 (vierter Berichtszeitraum).

### 1.2 Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren

#### 1.2.1 Überblick über die im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Im vorangegangenen Berichtszeitraum (1. Januar 2006 bis 31. Dezember 2007; dritter Berichtszeitraum) waren neun Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und/oder Verwendung humaner ES-Zellen genehmigt worden. Für vier weitere Anträge, die in diesem Zeitraum gestellt worden waren, war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2007 noch nicht abgeschlossen.

Im aktuellen Berichtszeitraum wurden im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten 25 Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und Verwendung bzw. Genehmigung der Verwendung humaner embryonaler Stammzellen gemäß § 6 StZG an das Robert Koch-Institut (RKI) als zuständige Genehmigungsbehörde gestellt. Ferner waren vier Anträge aus dem 3. Berichtszeitraum anhängig. 26 dieser insgesamt 29 Anträge wurden im Berichtszeitraum genehmigt. Zu drei Anträgen war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2009 noch nicht abgeschlossen; einer dieser drei Anträge war bereits 2008 gestellt, die Bearbeitung jedoch auf Wunsch des Antragstellers vorläufig ausgesetzt worden. Die im Berichtszeitraum erteilten Genehmigungen für neue, eigenständige Vorhaben ergingen an 23 Institutionen, von denen fünf bereits im Besitz wenigstens einer zuvor erteilten Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen waren; an einigen Institutionen ist mittlerweile mehr als eine Forschergruppe mit hES-Zell-Forschung befasst. Insgesamt wurden somit bis zum Ende des Berichtszeitraumes Genehmigungen für die Verwendung von hES-Zellen in insgesamt 49 Forschungsvorhaben erteilt, die an 34 Institutionen durchgeführt werden.

Für mehrere bereits genehmigte Vorhaben wurden die Genehmigungen im Berichtszeitraum erweitert. In einem Fall wurden zusätzliche experimentelle Arbeiten an hES-Zellen beantragt, die thematisch zwar nahe an den bislang genehmigten Verwendungen von hES-Zellen lagen, jedoch über die genehmigten Forschungsarbeiten deutlich hinausgingen, so dass es einer erneuten Prüfung des Vorliegens der Kriterien des § 5 StZG und damit auch einer erneuten Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES) bedurfte (siehe 1.2.2. am Ende). Für 16 genehmigte Projekte wurde die Einfuhr weiterer humaner ES-Zellen beantragt

und genehmigt, die zusätzlich zu schon importierten hES-Zellen für bereits genehmigte Zwecke verwendet werden sollen. Die Einträge im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des Robert Koch-Instituts wurden für die entsprechenden Genehmigungen jeweils angepasst.

Seit dem Inkrafttreten des Gesetzes zur Änderung des Stammzellgesetzes vom 14. August 2008 (BGBl. I S. 1708) besteht die Möglichkeit der Einfuhr und Verwendung auch solcher hES-Zellen, die nach dem 1. Januar 2002, aber vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden. Bis zum 31. Dezember 2009 wurden die Einfuhr von 23 solcher „neuer“ hES-Zelllinien und ihre Verwendung in insgesamt 19 Forschungsvorhaben entweder im Zusammenhang mit der Genehmigung eines neuen Antrags oder im Rahmen der Erweiterung bereits bestehender Genehmigungen nach dem StZG genehmigt.

Detaillierte Angaben darüber, welche humanen embryonalen Stammzelllinien im jeweiligen Forschungsvorhaben verwendet werden dürfen, finden sich im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des RKI.

([http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register\\_\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register__node.html))

#### 1.2.2 Angaben zu den im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Die insgesamt 24. Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen erging am 16. Januar 2008 an Herrn Professor M. Leist, Universität Freiburg. Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten sollen hES-Zellen in verschiedene Typen humaner neuraler Zellen (Neuronen und Astrozyten) differenziert werden. Im Prozess der Differenzierung sollen auch stabile neurale Stamm- und Vorläuferzell-Kulturen etabliert und deren molekulare Eigenschaften im Vergleich mit hES-Zellen analysiert werden. Ferner sollen aus hES-Zellen gewonnene neurale Zellen genutzt werden, um Parameter zur Bestimmung der Neurotoxizität von (potentiell) neurotoxischen Substanzen zu erarbeiten und zu überprüfen. Aus dem Vorhaben sind einerseits Erkenntnisse über molekulare Prozesse während der neuralen Entwicklung sowie gegebenenfalls verbesserte Protokolle für die neurale Differenzierung zu erwarten, die zu stabilen neuralen Vorläuferzellen führen könnten. Andererseits dienen die Arbeiten der Aufklärung von molekularen Mechanismen der Wirkung toxischer Substanzen auf neurale Zellen des Menschen sowie der Klärung der Fragestellung, ob auf der Basis von aus hES-Zellen differenzierten neuralen Zellen bessere als die derzeit verfügbaren Testsysteme zur Bestimmung neurotoxischer Eigenschaften, beispielsweise von Arzneimitteln, möglich sind.

Die 25. Genehmigung wurde am 31. Januar 2008 dem Max-Planck-Institut für Biomedizinische Forschung, Münster, erteilt. Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen vornehmlich auf die Identifizierung von Molekülen, die in hES-Zellen spezifische Differenzierungsprozesse auslösen können. Schwerpunkt ist hierbei die Analyse der diesen frühen Differenzierungsprozessen zugrunde liegenden molekularen Vorgänge auf den Ebe-

nen des Transkriptoms, des Proteoms und des Epigenoms der Zellen. Ferner soll untersucht werden, durch welche Faktoren sich aus hES-Zellen differenzierte Zellen in einen pluripotenten Zustand zurückversetzen lassen (Reprogrammierung). Das Vorhaben dient insgesamt der Erlangung eines besseren Verständnisses der molekularen Vorgänge, die beim Übergang vom pluripotenten Zustand von hES-Zellen in differenzierte Zellen eine Rolle spielen. Aus den genehmigten Untersuchungen an hES-Zellen können voraussichtlich auch Schlüsse auf entsprechende molekulare Vorgänge während der frühen Embryonalentwicklung des Menschen gezogen werden. Ferner sind neue Erkenntnisse über die Prozesse der Reprogrammierung somatischer in pluripotente Stammzellen des Menschen zu erwarten.

Die 26. Genehmigung erging am 11. März 2008 an die Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach. Ziel des Vorhabens ist die Bereitstellung hochaufgereinigter Populationen von hES-Zellen durch Anwendung eines spezifischen immunomagnetischen Verfahrens bei der Sortierung von hES-Zellen bzw. von aus ihnen differenzierten Zellen. Schwerpunkt ist die Identifizierung geeigneter Oberflächenmoleküle auf hES-Zellen, die Herstellung entsprechender Antikörper sowie die Klärung der Frage, ob die Anreicherung von hES-Zellen durch ein immunomagnetisches Verfahren reproduzierbar zu Populationen von hES-Zellen führt, die alle wesentlichen Eigenschaften von hES-Zellen beibehalten. Im Ergebnis einer erfolgreichen Durchführung des Vorhabens können verbesserte Methoden für die Kultivierung von hES-Zellen zur Verfügung stehen. Ferner könnte mit den hier entwickelten Verfahren eine Unterscheidung und Trennung von verschiedenen Sub-Populationen innerhalb der hES-Zellen, die teils verschiedene Eigenschaften aufweisen, möglich werden. Schließlich könnten solche immunomagnetischen Verfahren auch genutzt werden, um aus hES-Zellen differenzierte Zellen und im Zellgemisch verbliebene undifferenzierte Zellen abzutrennen. Letzteres ist auch im Hinblick auf das Potential undifferenzierter Zellen zur Bildung von Teratomen von Bedeutung.

Die 27. Genehmigung wurde am 19. März 2008 Frau Professor E. Tanaka, Technische Universität Dresden, erteilt. Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Etablierung eines dreidimensionalen Kultursystems für frühe neuronale Vorläuferzellen, die aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleitet werden. Unter den in diesem Modellsystem herrschenden dreidimensionalen Bedingungen können Prozesse der frühen menschlichen Embryonalentwicklung, insbesondere die Entwicklung des Neuralrohrs, in einem der natürlichen Situation deutlich näheren Kontext als bislang untersucht werden. Dies kann zu einem besseren Verständnis molekularer und zellbiologischer Vorgänge der frühen Embryonalentwicklung des Menschen beitragen, insbesondere der Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS). Zudem kann ein solches Neuralrohr-Modell auch Grundlagenerkenntnisse für ein Testsystem schaffen helfen, das in der Perspektive beispielsweise zur Aufklärung toxischer Wirkungen von Substanzen während früherer Stadien der menschlichen

Embryonalentwicklung verwendet werden könnte. Schließlich könnten neuralrohrartige Strukturen auf lange Sicht auch als Ausgangspunkt für Zellmaterial dienen, das künftig als Gewebeersatz im ZNS Anwendung finden soll.

Die 28. Genehmigung erging am 3. April 2008 an Frau Professor M. Wartenberg, Universitätsklinikum Jena. Im Rahmen der genehmigten Arbeiten soll hier die Frage untersucht werden, ob und inwieweit hES-Zellen und humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS-Zellen) ein vergleichbares Potential zur Herzzell-Differenzierung aufweisen und ob auf Grundlage beider Zelltypen potentiell transplantierbares menschliches Herzgewebe hergestellt werden kann. Ein Schwerpunkt ist hierbei auch das tissue engineering mit dem Ziel der Gewinnung von vaskularisiertem Herzgewebe, also die Kultivierung und kardiale Differenzierung der Zellen in Verbindung mit synthetischen oder natürlichen Stütz- und Trägermaterialien. Die in vitro differenzierten Zell- bzw. Gewebeverbände sollen schließlich in Infarktmodell der (immundefizienten) Ratte transplantiert und bezüglich ihrer Funktionalität überprüft werden. Neben Erkenntnissen über die Herzentwicklung und verbesserten kardialen Differenzierungsprotokollen wird aus dem Projekt ein Beitrag zur Klärung der Frage erwartet, ob sich aus pluripotenten Zellen im Rahmen eines tissue engineering transplantierbares Herzgewebe herstellen lässt und ob sich hES-Zellen und menschliche iPS-Zellen gleichermaßen als Ausgangspunkt zur Herstellung solchen Gewebes eignen. Ferner sind Erkenntnisse über die Wechselwirkungen verschiedener Zelltypen und den Einfluss dreidimensionaler Bedingungen auf die Herzzell-Differenzierung zu erwarten.

Die 29. Genehmigung wurde am 11. April 2009 Herrn Privatdozent Dr. M. Dihné, Universitätsklinikum Düsseldorf, erteilt. Die Forschungsarbeiten zielen auf die Schaffung und Analyse funktionaler neuronaler Netzwerke in vitro. Dabei soll ein Modellsystem geschaffen werden, das Eigenschaften humaner neuronaler Netzwerke aufweist und das für Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie menschlicher Nervenzellen, für die Testung neuroaktiver Substanzen sowie für die Aufklärung von neurodegenerativen Mechanismen genutzt werden kann. Außerdem sollen solche neuronalen Netzwerke auch als Ausgangspunkt für Modelle neurodegenerativer Erkrankungen dienen, an denen die Transplantation von aus verschiedenen Stammzelltypen abgeleiteten neuronalen Zellen untersucht werden kann. Im Zuge der Entwicklung der neuronalen Netzwerke werden u. a. Erkenntnisse darüber erwartet, welche Beiträge bestimmte Nervenzellpopulationen in verschiedenen Phasen der Ausreifung eines humanen neuronalen Netzwerkes zu dessen Funktionalität leisten; dies kann wiederum zu einem verbesserten Verständnis der zellbiologischen Vorgänge führen, die sich beim Menschen während der Ausreifung von neuronalen Vorläuferzellen zu funktionellen Neuronen abspielen. Im Falle einer erfolgreichen Etablierung der neuronalen Netzwerke sollen diese dann zur Untersuchung weiterer Fragestellungen genutzt werden, deren Beantwortung von großer wissenschaftlicher Relevanz ist. Dies betrifft zum

Beispiel die Frage, ob und mit welchem Resultat sich die Netzwerkaktivität durch neuroaktive Substanzen beeinflussen lässt, ob sich die etablierten neuronalen Netzwerke als Modelle für degenerative Vorgänge im ZNS nutzen lassen und ob die Applikation neuroprotektiver Substanzen oder die Transplantation nicht-geschädigter Neuronen in ein geschädigtes neuronales Netzwerk dazu beitragen können, degenerative Prozesse im Rahmen eines humanen neuronalen Zellverbandes rückgängig zu machen. Dies kann von hohem Wert für die Beurteilung der Erfolgsaussichten innovativer therapeutischer Strategien sein.

Die 30. Genehmigung erging am 23. April 2008 an Frau Dr. K. Guan, Universität Göttingen. Frau Dr. Guan hatte bereits die Etablierung multipotenter Keimbahn-Stammzellzelllinien in Mäusen beschrieben, die teilweise Eigenschaften pluripotenter Stammzellen aufwiesen. Die entsprechenden experimentellen Ansätze sollen nun auf humane Zellen übertragen werden, wozu zu Vergleichszwecken pluripotente humane ES-Zellen benötigt werden. So soll im genehmigten Projekt u. a. die Expression bestimmter Gene, die in hES-Zellen mit Pluripotenz assoziiert ist, vergleichend zwischen hES-Zellen und spermatogonialen Stammzellen (SSCs) des Menschen untersucht werden. Durch Vergleich der Expressionsdaten sollen Gene identifiziert werden, deren Expression nach ihrem Transfer in SSCs in diesen gegebenenfalls Pluripotenz induzieren können. Ziel dieser Forschungsarbeiten ist die Etablierung und Charakterisierung eines neuen Typs humaner pluripotenter Stammzellen. In einem unabhängigen Projektteil soll zudem untersucht werden, nach welchen Verfahren sich hES-Zellen zu multipotenten Vorläuferzellen des Herzens differenzieren lassen, die eine Weiterentwicklung in verschiedene kardiovaskuläre Zelltypen erlauben. Dieser Projektteil soll zur Klärung der Frage beitragen, ob aus hES-Zellen kardiale Vorläuferzellen gewonnen werden können, die ähnliche Eigenschaften wie die entsprechenden Mauszellen aufweisen, insbesondere ein vergleichbar breites Differenzierungspotential. Die Untersuchungen sollen auch dazu beitragen, das Verständnis für grundlegende Prozesse und Methoden der Differenzierung von hES-Zellen in multipotente kardiale Vorläuferzellen mit einem breiten Differenzierungspotential zu vertiefen und auf dieser Grundlage verbesserte Protokolle für die kardiale Differenzierung von hES-Zellen zu entwickeln.

Die 31. Genehmigung, die am 30. April 2008 an Herrn Professor J. Hescheler, Universität Köln, erging, wurde für ein Projekt erteilt, das im Rahmen des EU-Projektes ESTNAT durchgeführt wird und sich in zwei Teile gliedert. Im ersten Projektteil sollen die Auswirkungen verschiedener Noxen auf sich differenzierende hES-Zellen untersucht werden. Dazu sollen molekulare Veränderungen insbesondere im Genexpressionsmuster sich differenzierender hES-Zellen unter dem Einfluss bestimmter Noxen analysiert und auf dieser Grundlage sog. Toxizitäts-Signaturen erstellt werden. Diese Untersuchungen lassen unter anderem Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der schädigenden Wirkung von bestimmten Noxen auf sich differenzierende menschliche Zellen erwar-

ten, woraus voraussichtlich auch Rückschlüsse auf ihre Wirkung in der menschlichen Entwicklung gezogen werden können. Auf Grundlage der hier erzielten Ergebnisse könnten gegebenenfalls neue zellbasierte Testsysteme, beispielsweise für die Beurteilung potentieller toxischer oder entwicklungstoxischer Wirkungen von Arzneimitteln, entwickelt werden. Im zweiten Projektteil sollen hES-Zellen zu Hepatozyten differenziert und diese dann hinsichtlich molekularbiologischer, biochemischer und physiologischer Parameter umfassend charakterisiert werden. Insbesondere durch Variation und Optimierung der für die Differenzierung verwendeten Protokolle sollen Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge erzielt werden, die bei der Differenzierung von hES-Zellen zu Leberzellen ablaufen. Bei erfolgreicher Durchführung könnte das Projekt auch dazu beitragen, Grundlagen für verbesserte, auf humanen Leberzellen beruhende Testsysteme für Anwendungen in der Pharmakologie/Toxikologie zu schaffen.

Die 32. Genehmigung erging am 8. Mai 2008 an Herrn Professor J. Hengstler, Universität Dortmund. Auch hier ist die Differenzierung von hES-Zellen zu Hepatozyten bzw. Zellen mit weitgehenden Eigenschaften humaner Hepatozyten Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten. Das Projekt wird ebenfalls im Rahmen des durch die Europäische Gemeinschaft geförderten Projektes ES-NATS durchgeführt. Ein Schwerpunkt ist hier – neben der Entwicklung und Optimierung geeigneter Protokolle für die Differenzierung von hES-Zellen in hepatische Zellen – der Vergleich von Eigenschaften der aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen mit denen von entsprechenden Zellen, die aus somatischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen abgeleitet wurden. Ferner sollen die Hepatozyten mit anderen aus hES-Zellen differenzierten Zellen (z. B. Neuronen) in einem Distanz-Kokultursystem kultiviert werden. Dies dient der Überprüfung ihrer Fähigkeit, solche Substanzen zu verstoffwechseln, die erst nach Metabolisierung durch humane Leberzellen eine toxische Wirkung, beispielsweise auf menschliche Neuronen, entfalten. Da unerwünschte toxische Nebenwirkungen häufig erst nach ihrer Metabolisierung durch Leberzellen auftreten, ist die Bestimmung humanspezifischer toxischer Effekte in solchen Systemen von hoher Relevanz. Das Projekt zielt somit einerseits auf neue Erkenntnisse über molekulare und zellbiologische Vorgänge bei der hepatischen Differenzierung sowie über das hepatische In-vitro-Differenzierungspotential verschiedener Zelltypen. Andererseits kann es bei erfolgreicher Durchführung zur Schaffung von Grundlagen für verbesserte, humanspezifische In-vitro-Testsysteme für pharmakologisch-toxikologische Prüfungen beitragen.

Die 33. Genehmigung wurde am 19. Juni 2008 Herrn Professor H. v. Melchner, Universität Frankfurt, erteilt. Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen auf die Etablierung einer Bibliothek von mutierten hES-Zell-Linien, wozu spezifische Genfallen-Vektoren genutzt werden sollen. Im Ergebnis mehrstufiger Selektionsverfahren könnten dann Zelllinien vorliegen, die sowohl Funktionsverlust-Mutanten als auch regulierbare Funktionsaktivierungs-Mutanten menschlicher Gene darstel-

len. Solche Zellen wären von erheblicher Bedeutung für die Klärung wesentlicher Fragestellungen der Grundlagenforschung. So könnten Zelllinien, in denen spezifische Gene ausgeschaltet sind und bei Bedarf wieder eingeschaltet werden können, in Anschlussprojekten u. a. zur Untersuchung zellulärer Prozesse von Signalübertragung, Differenzierung oder Krankheitsentstehung verwendet werden. Sie könnten beispielsweise auch genutzt werden, um durch vergleichende Genexpressions- und Proteomanalysen mit entsprechend mutierten murinen ES-Zellen spezies-spezifische Prozesse der Gewebe- oder Organbildung zu untersuchen. Schließlich könnten mit ihnen auch Gendosis-Effekte simuliert werden, was von großem Nutzen für die Untersuchung des Einflusses von Expressionsraten einzelner Gene für Entwicklungsprozesse oder pathologische Vorgänge ist.

Die 34. Genehmigung erging am 21. August 2008 an Frau Dr. Anja Moldenhauer, Charité Berlin. Gegenstand der Forschungsarbeiten ist die gezielte Differenzierung von hES-Zellen zu Zellen des Blutes, insbesondere zu Erythrozyten und Thrombozyten. Die Differenzierung soll über definierte hämatopoetische Vorläuferzellstadien erfolgen, die charakterisiert, angereichert und dann weiter in reife Blutzellen differenziert werden sollen. Die Eigenschaften der differenzierten Blutzellen sollen in vitro untersucht und ihre Funktionalität in verschiedenen Tiermodellen getestet werden. Ferner ist geplant, die Transkriptome verschieden weit differenzierter hämatopoetischer Zellen zu untersuchen, woraus gegebenenfalls Rückschlüsse auf Faktoren gezogen werden können, die bei der Reifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen eine Rolle spielen. Insgesamt besteht das Ziel des Vorhabens darin, ein verbessertes Verständnis für jene Vorgänge zu erlangen, die bei den genannten Differenzierungsprozessen ablaufen, und auf dieser Grundlage zuverlässige und reproduzierbare Protokolle für die In-vitro-Differenzierung von hES-Zellen in Zellen der erythroiden und thrombozytären Linie zu erarbeiten. Die Untersuchungen sollen im Vergleich mit aus Stammzellen des Nabelschnurblutes gewonnenen hämatopoetischen Zellen erfolgen, woraus voraussichtlich Erkenntnisse über die Eignung des jeweiligen Zelltyps für die hämatopoetische In-vitro-Differenzierung abgeleitet werden können.

Die 35. Genehmigung wurde am 18. Dezember 2009 Herrn Professor T. Skutella, Universität Tübingen, erteilt. Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten sollen neuartige Stammzellen aus humanem Hodengewebe (human adult germline stem cells, haGSCs) bezüglich einer Vielzahl von Eigenschaften, insbesondere zur weiteren Abklärung ihrer vermuteten Pluripotenz, untersucht und mit hES-Zellen verglichen werden. Erste Charakteristika dieser neuartigen Zellen waren zuvor bereits publiziert worden. Die genehmigten vergleichenden Untersuchungen unter Verwendung von hES-Zellen dienen vor allem der Beantwortung der Frage, ob und inwieweit haGSCs und hES-Zellen identische Eigenschaften haben, in welchen Charakteristika sie sich unterscheiden und was die Ursachen für mögliche Unterschiede sein könnten, beispielsweise hinsichtlich der molekularen Grundlagen der Pluripotenz dieser Zellen oder ihres Differenzierungsver-

haltens. Das Vorhaben kann dazu beitragen, das Potential dieser neuen Zellen für die Forschung und für künftig denkbare Therapieansätze besser als bislang einschätzen zu können.

Die 36. Genehmigung erhielt am 20. Januar 2009 Herr Professor T. Eschenhagen, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Die geplanten Forschungsarbeiten zielen hier auf die Optimierung der Entwicklung dreidimensionalen künstlichen Herzgewebes (engineered heart tissue, EHT), dessen Gewinnung aus hES-Zellen bereits zuvor genehmigt worden war. Dabei sollen nun – neben der Verwendung verbesserter Protokolle für die kardiale Differenzierung sowie der Entwicklung neuer Strategien zur Anreicherung kardial differenzierter Zellen – vor allem eine Miniaturisierung und eine bessere Standardisierbarkeit der EHTs erreicht werden. Weiterer Schwerpunkt des Projektes ist die Untersuchung einer spezifischen Gruppe von Proteinen, der sog. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, in hES-Zellen mit dem Ziel, deren Rolle bei der mesodermalen Differenzierung menschlicher Zellen im Allgemeinen und bei ihrer kardialen Differenzierung im Besonderen aufzuklären. Neben Grundlagenerkenntnissen zur Herzzelldifferenzierung wird aus dem Projekt auch ein Beitrag zur Schaffung von Grundlagen für neue In-vitro-Testsysteme erwartet, die der menschlichen In-vivo-Situation im Herzen möglichst nahekommen und eine hohe Aussagekraft bezüglich der Wirkung von Substanzen am menschlichen Herzen haben sollen. Derartige In-vitro-Testsysteme würden es gegebenenfalls ermöglichen, Effekte von Arzneimitteln am menschlichen Herzen zuverlässiger als bislang vorhersagen zu können.

Die 37. Genehmigung erging am 20. Januar 2009 an das Max-Planck-Institut für Biomedizinische Forschung, Münster. Gegenstand der Forschungsarbeiten ist die Erarbeitung neuer Strategien für die Induktion von Pluripotenz in somatischen Zellen sowie die Untersuchung jener Vorgänge, die auf molekularer Ebene zur Induktion von Pluripotenz in somatischen Zellen führen. hES-Zellen sollen dabei einerseits zum Vergleich mit hiPS-Zellen genutzt werden. Zum anderen sollen aus hES-Zellen verschieden weit differenzierte Zellen unterschiedlichen Typs selbst Gegenstand der Reprogrammierung sein. Zudem soll untersucht werden, welche Gene im Prozess der Reprogrammierung aktiviert bzw. inaktiviert werden und welche epigenetischen Veränderungen im Verlauf der Reprogrammierung auftreten. Das Projekt dient dem hochrangigen Ziel, ein verbessertes Verständnis der bei der Reprogrammierung ablaufenden zellbiologischen Vorgänge zu erlangen, neue an der Reprogrammierung beteiligte Moleküle und Signalwege zu identifizieren und menschliche Zelltypen zu identifizieren, die einer Reprogrammierung in besonders hohem Maße zugänglich sind.

Inhaber der 38. Genehmigung, die am 12. Februar 2009 erteilt wurde, ist die Medizinische Hochschule Hannover (MHH). Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen in erster Linie auf die Charakterisierung von aus hiPS-Zellen gewonnenen differenzierten Zellen im Vergleich mit hES-Zellen. Dazu sollen hiPS-Zellen verschiedener Herkunft mit hES-Zellen bezüglich ihrer molekularen Eigen-

schaften, hinsichtlich ihrer genetischen Modifizierbarkeit sowie in Bezug auf ihre Differenzierungsfähigkeit in Zellen des Blutes, des Herzens, der Leber und der Lunge verglichen werden. Entsprechende Differenzierungsprotokolle sollen für beide Zelltypen optimiert und insbesondere für kardiale Zellen dann auf Kulturmethode übertragen werden, die die Kultivierung dieser Zellen in größeren als im Labormaßstab üblichen Mengen ermöglichen. Die Arbeiten sollen im Ergebnis zum Verständnis darüber beitragen, ob und inwieweit hiPS-Zellen mit hES-Zellen vergleichbare bzw. identische Eigenschaften haben. Durch die Untersuchung von Möglichkeiten zur Kultivierung größerer Zellmengen sollen zudem Voraussetzungen für eine mögliche Anwendung pluripotenter Zellen und ihrer differenzierten Derivate in der pharmakologischen Forschung geschaffen werden, da hier voraussichtlich erhebliche Mengen standardisiert herstellbarer Zellen benötigt würden.

Die 39. Genehmigung wurde am 2. April 2009 dem Zentrum für Integrative Psychiatrie gGmbH, Kiel, erteilt. Inhalt der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Untersuchung der Fragestellung, welche spezifische Ausprägung ein allgemeiner, für pluripotente Zellen charakteristischer Phänotyp in humanen ES-Zellen sowie in hiPS-Zellen hat. Auf der Basis einer umfangreichen Erhebung experimenteller Daten über menschliche pluripotente Zellen und ihre differenzierten Derivate sollen Parameter identifiziert bzw. verifiziert werden, die zuverlässige Aussagen über die Pluripotenz dieser Zellen ermöglichen. Durch vergleichende Analyse der im Projekt erhobenen Datensätze sollen dann die Charakteristika eines „allgemeinen“ pluripotenten Phänotyps definiert bzw. präziser als bislang beschrieben werden. Dieser allgemeine Phänotyp soll dann als Grundlage für die Entwicklung eines Algorithmus dienen, der zur Bewertung verschiedener Zellen, insbesondere neuer hiPS-Zell-Linien, in Hinblick auf deren vermutete Pluripotenz genutzt werden kann. Gegenwärtig ist nur unzureichend bekannt, ob und inwieweit hES-Zellen und hiPS-Zellen in ihrer Gesamtheit auf verschiedenen molekularen Ebenen zelltypspezifische Unterschiede aufweisen. Daher könnte eine Bewertung der Eigenschaften von hiPS-Zellen auf der Grundlage eines auf einer breiten experimentellen Basis beruhenden Algorithmus die Bestimmung der Eigenschaften neuer, gegebenenfalls patientenspezifischer, hiPS-Zellen deutlich vereinfachen und zuverlässigere Ergebnisse liefern als bisher. Dies ist angesichts der sich ständig verändernden Methodik zur Herstellung von hiPS-Zellen sowie der Heterogenität des zur Herstellung dieser Zellen benutzten Materials von erheblicher Bedeutung.

Die 40. Genehmigung erging ebenfalls am 2. April 2009 an das Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin. Die genehmigten Forschungsarbeiten knüpfen zum großen Teil an die 9. Genehmigung nach dem StZG vom 14. Februar 2005 an. Die dort benannten, auf die Untersuchung der molekularen Grundlagen von zellulärer Pluripotenz zielenden Forschungsarbeiten werden nun auch mit dem ergänzenden Ziel durchgeführt, zu klären, inwieweit sich hiPS-Zellen und hES-Zellen gleichen bzw. voneinander unterscheiden. Der Vergleich bezieht sich insbe-

sondere auf molekulare Prozesse der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Auslösung von Differenzierung sowie auf die Effekte einer Langzeitkultivierung dieser Zellen. Ferner soll die Differenzierbarkeit beider Typen pluripotenter Stammzellen des Menschen in neurale, hepatische, pankreatische und kardiale Zellen vergleichend bestimmt werden. Das Projekt verspricht bei erfolgreicher Durchführung einen wesentlichen Erkenntnisgewinn insbesondere zur Frage der Gemeinsamkeiten und Unterschiede von hES- und hiPS-Zellen bezüglich ihres Transkriptoms und ihres Epigenoms, hinsichtlich ihrer Stabilität bei Langzeitkultivierung sowie in Bezug auf ihre funktionellen Eigenschaften und ihre Differenzierbarkeit in Zellen aller Keimblätter.

Inhaberin der 41. Genehmigung ist Frau Privatdozentin Dr. S. Schrepfer, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Die genehmigten Forschungsarbeiten haben eine detaillierte Untersuchung der immunologischen Eigenschaften von hES-Zellen und von aus diesen abgeleiteten differenzierten Zellen zum Inhalt. So sollen u. a. die Expression von Genen, deren Produkte immunologisch relevant sind, in hES-Zellen analysiert und eine mögliche Veränderung dieser Expression insbesondere im Laufe der kardialen Differenzierung bestimmt werden. Ferner soll die nach allogener Transplantation von hES-Zellen ausgelöste Immunantwort im Tiermodell umfassend analysiert und Möglichkeiten erarbeitet werden, durch Modifikation von hES-Zellen die Immunantwort auf aus ihnen abgeleitete Zellen zu unterdrücken oder zu vermindern. Das Projekt kann zu neuen Erkenntnissen über grundlegende immunologische Eigenschaften von hES-Zellen führen, beispielsweise zur Klärung der Frage, welche konkreten Ursachen die teils beobachtete Abstoßung von hES-Zellen und aus ihnen abgeleiteten Zellen nach Transplantation in immunkompetente Tiere hat und in welchem Maße sich die immunologischen Eigenschaften von hES-Zellen im Laufe ihrer Differenzierung zu stärker spezialisierten Zellen verändern. Im Hinblick auf die Tatsache, dass die erwartete Abstoßung von allogenen Material durch das Immunsystem eines Transplantatempfängers ein wesentliches Problem bei der Nutzung von aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen in künftig denkbaren Gewebersatztherapien darstellen würde, können die Forschungsarbeiten auch zur Schaffung von Grundlagen für die klinische Anwendung von aus hES-Zellen differenzierten Zellen beitragen.

Gegenstand der 42. Genehmigung, die am 27. Mai 2009 Herrn Professor A. Sachinidis, Universität Köln, erteilt wurde, ist die Optimierung von Protokollen für die Kultivierung und kardiale Differenzierung von hES-Zellen. Dabei soll u. a. die Frage untersucht werden, ob und in welchem Umfang spezifische Wachstumsfaktoren und sog. kleine Moleküle (small molecules) in der Lage sind, die kardiale Differenzierung von hES-Zellen in verschiedenen Kultursystemen zu beeinflussen. Die differenzierten Zellen sollen dann in Bezug auf ihre molekularen Eigenschaften, beispielsweise hinsichtlich ihres Transkriptoms und Proteoms, analysiert werden. Es ist zudem geplant, die kardiale Differenzierung von hES-Zellen auch im Rahmen miniaturisierter Bioreaktoren zu etablie-

ren und zu optimieren, so dass small molecules auch im Mittel- bis Hochdurchsatzverfahren bezüglich ihrer kardiomyogenen Wirkungen untersucht werden können. Die geplanten Untersuchungen sollen im Verlaufe des Projektes auch auf hiPS-Zellen ausgedehnt werden. Die aus dem Projekt zu erwartenden Erkenntnisse können insgesamt zu einem besseren Verständnis von kardialen Differenzierungsmechanismen im Menschen beitragen. Dies und die geplante Erarbeitung von Methoden für eine Kultivierung in größeren als bislang üblichen Maßstäben können ferner zu verbesserten Protokollen für die kardiale In-vitro-Differenzierung von hES-Zellen und damit zu stärker angereicherten und besser charakterisierten Herzzell-Populationen führen, wie sie gegebenenfalls für eine denkbare klinische Anwendung dieser Zellen oder für in In-vitro-Zellkultursystemen, beispielsweise zur Testung der Herzzell-Toxizität von Pharmaka, nötig sein können.

Die 43. Genehmigung erging am 27. Mai 2009 an das Paul-Ehrlich-Institut, Langen. Die genehmigten Forschungsarbeiten sind im wesentlichen auf die Untersuchung der Fragestellung gerichtet, ob hES-Zellen die Mobilisierung bestimmter transponierbarer Elemente (insbesondere des sog. long interspersed nuclear element-1, Line-1, L1) unterstützen, die bei der Mutagenese des menschlichen Genoms eine Rolle spielen können. Es soll geklärt werden, ob und in welchem Maße hES-Zellen die für die Retrotransposition notwendigen Genprodukte der L1-Elemente produzieren und ob sich die Retrotranspositionsrate von L1-Elementen in hES-Zellen im Laufe ihrer Langzeitkultivierung sowie bei Differenzierung in Leber-, Lungen- Herz- und Blutzellen ändert. Die Untersuchungen sollen auch vergleichend zwischen hES-Zellen und hiPS-Zellen durchgeführt werden und sollen im Ergebnis dazu beitragen, die biologischen Eigenschaften von menschlichen pluripotenten Zellen besser zu verstehen. So könnte beispielsweise die Frage geklärt werden, ob und inwieweit L1-Retrotransposons an der genetischen Destabilisierung von hES-Zellen beteiligt sind, die insbesondere bei deren Langzeitkultivierung beobachtet worden ist. Auch Fragen nach möglichen genetischen Veränderungen dieser Zellen im Rahmen ihrer Differenzierung könnten hier geklärt werden. Neben dem erwarteten Gewinn an Erkenntnissen für die Grundlagenforschung könnte dies auch zur Schaffung von Voraussetzungen für eine künftig denkbare klinische Nutzung von aus pluripotenten Zellen abgeleiteten Zellen beitragen.

Die 44. Genehmigung erhielt am 26. Juni 2009 die Fraunhofer Gesellschaft, Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), St. Ingbert. Im Mittelpunkt der genehmigten Forschungsarbeiten steht die Anwendung und Optimierung neuartiger Techniken für die Kultivierung und Differenzierung von hES-Zellen. Dies umfasst neuartige Kultivierungsverfahren (beispielsweise Nutzung verschiedener Trägermaterialien, neuer Medien, miniaturisierter Bioreaktoren und Pipettier-Roboter), wobei auch sog. kleine Moleküle (small molecules) verwendet und hinsichtlich ihres Einflusses auf das Wachstum von hES-Zellen und deren Differenzierung in kardiale und hepatische Zellen untersucht werden sollen. Hochrangiges Ziel der Forschungsarbeiten ist es, reproduzierbare, standardisierbare

und gegebenenfalls xenogenfreie Kultivierungs- und Differenzierungsverfahren für hES-Zellen zu entwickeln. Dieses Ziel ist sowohl hinsichtlich der Bereitstellung eines besser charakterisierten und einheitlichen Ausgangsmaterials hoher Qualität für die Forschung als auch in Bezug auf eine künftig denkbare therapeutische oder biotechnologische Nutzung von aus hES-Zellen differenzierten Zellen von erheblicher wissenschaftlicher Relevanz. Die neu entwickelten Verfahren sollen auch auf hiPS-Zellen angewandt werden.

Inhaber der 45. Genehmigung nach dem Stammzellgesetz ist das Universitätsklinikum Essen. Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten ist die die Entwicklung neuer Vorgehensweise bei der Ableitung hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) aus hES-Zellen. Zunächst sollen neue In-vitro-Differenzierungsprotokolle für die Gewinnung reifer HSCs aus hES-Zellen etabliert und optimiert werden. Ein Schwerpunkt der Arbeiten liegt hierbei in der Identifizierung stromaler Zell-Linien, die eine geeignete Nische für die In-vitro-Reifung der aus hES-Zellen gewonnenen HSCs darstellen können. Im Projekt sollen auch Faktoren mit Relevanz für die hämatopoetische Differenzierung identifiziert und diese charakterisiert sowie die Eigenschaften und die Funktionalität der in vitro hergestellten HSCs in Zellkultur und nach Transplantation in geeignete Mausmodelle detailliert untersucht werden. Ferner sollen neue Methoden entwickelt werden, um die Immunogenität von aus hES-Zellen hergestellten HSCs zu vermindern. Alle Untersuchungen sollen auch im Vergleich mit aus Patienten gewonnenen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) erfolgen. Insgesamt zielen die Arbeiten auf ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse bei der hämatopoetischen Differenzierung, auf die Etablierung verbesserter Protokolle für die In-vitro-Differenzierung pluripotenter Zellen zu HSCs sowie auf die Klärung der Frage, ob und auf welche Art und Weise eine Verminderung der menschlichen Immunantwort auf hES-Zellen und auf die aus diesen differenzierten Zellen erreicht werden kann. Letztere Forschungsziele sind auch im Hinblick auf eine künftig denkbare therapeutische Nutzung von aus pluripotenten Zellen abgeleiteten Zellen von hoher Relevanz.

Die Forschungsarbeiten, deren Durchführung Frau Dr. I. Schroeder, Universität Halle, mit der 46. Genehmigung vom 9. Oktober 2009 bewilligt wurde, zielen auf die Entwicklung von Protokollen für die Differenzierung humaner ES-Zellen zu endokrinen pankreatischen Zellen. Die Differenzierungsprotokolle sollen auch auf 3D-Kultursysteme übertragen und auf diesem Wege Insel-artige Cluster (ICCs) hergestellt werden, die die Ausreifung pankreatischer Vorläuferzellen zu funktionsfähigen Inselzellen voraussichtlich besser ermöglichen als herkömmliche Zellkultursysteme. Die Funktionalität der ICCs soll nach Transplantation in diabetische Mäuse untersucht und der erwartete therapeutische Effekt analysiert und bewertet werden. Ferner ist vorgesehen, anhand von in vitro hergestellten ICCs Fragen der Biologie von menschlichen Beta-Zellen sowie der Pathobiologie des Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen. Schließlich sollen die ICCs

auch genutzt werden, um pharmakotoxikologische Untersuchungen an bekannten antidiabetischen Wirkstoffen durchzuführen und insbesondere der Frage nachzugehen, welche molekularen Mechanismen den teils schwerwiegenden Nebenwirkungen dieser Medikamente zugrunde liegen. Die Untersuchungen sollen teils im Vergleich mit hiPS-Zellen durchgeführt werden. Die Arbeiten zielen insgesamt auf ein verbessertes Verständnis der entodermalen und pankreatischen Differenzierung beim Menschen sowie auf die Etablierung von effektiven Protokollen für die Bereitstellung menschlicher Beta-Zellen in vitro, was bislang nicht oder nur unzureichend gelungen ist. Die Arbeiten könnten – zusätzlich zum erwarteten Gewinn für die Grundlagenforschung – auch zur Schaffung von Grundlagen für neue klinische Verfahren beitragen sowie die Entwicklung neuartiger In-vitro-Zellkultursysteme ermöglichen, an denen die molekulare Pathogenese des Diabetes mellitus sowie neuartige antidiabetisch wirksame Arzneimittel untersucht werden könnten.

Die 47. Genehmigung erging am 3. November 2009 an Herrn Professor J. Hescheler, Universität Köln. Gegenstand der genehmigten Arbeiten ist die Untersuchung der Rolle des humanen T-Zell-Leukämie-1a-Onkogens (Tcl1a) bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz humaner embryonaler Stammzellen. Zunächst soll dabei die Frage geklärt werden, zu welchen Veränderungen von hES-Zellen die Unterdrückung der Expression von Tcl1a in hES-Zellen führt. Ferner sollen die zellbiologischen Konsequenzen der Expressionshemmung, aber auch einer artifiziellen Überexpression des Tcl1a-Gens untersucht und mögliche Wechselwirkungen von Tcl1a mit anderen Proteinen in undifferenzierten ES-Zellen analysiert werden. Die hier genehmigten Untersuchungen sollen vor allem dazu beitragen, die Mechanismen der Wirkung eines spezifischen Proteins in pluripotenten Zellen des Menschen aufzuklären. Dies kann gegebenenfalls zu einem verbesserten Verständnis über jene Moleküle und Signalwege führen, die an der Aufrechterhaltung von Pluripotenz sowie der Induktion von Differenzierung in menschlichen ES-Zellen beteiligt sind. Unter Umständen ließen sich aus den Forschungsergebnissen auch Rückschlüsse auf zellbiologische Prozesse ziehen, die bei der frühen Embryonalentwicklung des Menschen eine Rolle spielen.

Die 48. Genehmigung, die ebenfalls am 3. November 2009 erging, wurde dem Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin (MDC), Berlin, für die Durchführung von Forschungsarbeiten erteilt, die die Entwicklung und Optimierung von Protokollen für die Gewinnung somatosensorischer Nervenzellen aus hES-Zellen zum Gegenstand haben. Dabei sollen hES-Zellen zunächst in Zellen der Neuralleiste (neural crest cells, NC-Zellen) differenziert und diese charakterisiert sowie gegebenenfalls angereichert werden. Von NC-Zellen ausgehend sollen im Anschluss Protokolle für die Gewinnung verschiedener Subtypen somatosensorischer Nervenzellen entwickelt und die entstehenden Zellen umfassend analysiert und bezüglich ihrer Funktionalität in vitro überprüft werden. Die im Laufe des Projektes entwickelten und optimierten Metho-

den sollen auch auf hiPS-Zellen übertragen werden. Die Vorgänge, die sich bei der Entwicklung und Diversifizierung sensorischer Neuronen aus den Zellen des Wurzelganglions beim Menschen abspielen, sind derzeit nur unvollständig verstanden. Ziel der Arbeiten ist daher vor allem die Erlangung eines besseren Verständnisses dieser neuronalen Differenzierungsprozesse, woraus wiederum Rückschlüsse auf während der menschlichen Embryonalentwicklung ablaufende molekulare und zellbiologische Prozesse gezogen werden können. Ferner zielen die Arbeiten auf die Schaffung von Grundlagen für neue, auf humanen Zellen basierende In-vitro-Zellkulturmodelle, mit deren Hilfe physiologische Prozesse bei der Schmerztransduktion untersucht, die Wirkung analgetischer Substanzen auf neuronale Zellen analysiert und gegebenenfalls neue analgetisch wirksame Substanzen identifiziert werden können.

Die 49. Genehmigung erging am 6. November 2009 an Frau Professor E. Tanaka, Technische Universität Dresden. Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Gewinnung von Netzhautzellen aus hES-Zellen. Dazu sollen sowohl Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) als auch Photorezeptorzellen unter Nutzung dreidimensionaler Kultursysteme zunächst in getrennten Kulturen gewonnen und charakterisiert werden. Durch Kombination der Kultur- und Differenzierungsbedingungen sollen dann mögliche Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zelltypen bei der Differenzierung von hES-Zellen zu Zellen der Netzhaut untersucht werden. Nach umfassender Charakterisierung in vitro sollen die Zellen schließlich in Mäuse, insbesondere in Mausmodelle für die Netzhautdegeneration, transplantiert und hinsichtlich ihres Überlebens, ihrer Integration in das Wirtsgewebe und ihrer Funktionalität untersucht werden. Die Untersuchungen sollen teils auch unter vergleichender Nutzung von hiPS-Zellen erfolgen. Die experimentellen Bedingungen, unter denen die Differenzierung durchgeführt werden soll, ermöglichen es voraussichtlich, Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zelltypen der sich entwickelnden menschlichen Retina zu untersuchen und auf diesem Wege zu einem besseren Verständnis dieser Entwicklungsprozesse zu gelangen. Die Arbeiten können ferner zu einem tieferen Verständnis von gegebenenfalls für die Entwicklung notwendigen Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen sowie vom Einfluss instruierender Signale aus der Umgebung auf die Retinaentwicklung führen. Zudem besteht die Aussicht, ein geeignetes und reproduzierbares Zellkulturmodell für die menschliche Retina und deren Entwicklung bereitzustellen, an dem weitere wesentliche Fragestellungen der Grundlagenforschung beantwortet werden können. Schließlich können die genehmigten Arbeiten bei erfolgreicher Durchführung dazu beitragen, Grundlagen für eine künftig denkbare Gewebeersatztherapie für die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) zu schaffen, die in den Industriestaaten die häufigste Ursache für Erblindung im Alter ist.

Für das folgende bereits genehmigte Forschungsvorhaben wurde die Genehmigung auf Antrag inhaltlich erweitert und der Registereintrag entsprechend modifiziert:

Erweiterung der 1. Genehmigung nach dem StZG (erteilt am 21. Dezember 2002, Erweiterung der Genehmigung am 17. Juni 2008). Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen auf die Etablierung und Optimierung von Protokollen für die Gewinnung stabiler Populationen neuraler Vorläuferzellen und daraus abgeleiteter neuronaler und glialer Zellen. Es soll untersucht werden, ob und inwieweit sich aus hES-Zellen abgeleitete neurale Zellen langfristig zur Behandlung der Epilepsie eignen könnten. Dazu sollen hES-Zellen oder aus ihnen abgeleitete neurale Vorläuferzellen genetisch so modifiziert werden, dass sie antiepileptisch wirkende Faktoren produzieren. Ein möglicher therapeutischer Effekt derart veränderter Zellen soll durch Transplantation in verschiedene Nagermodele der Epilepsie untersucht werden. Weiterer Gegenstand der Forschungsarbeiten ist die Entwicklung eines neuartigen molekularen Marker-Systems, mit dessen Hilfe die funktionelle Integration der transplantierten Neuronen in das Nervengewebe des Empfängertiers untersucht werden kann. Aus dem Vorhaben sind vor allem Erkenntnisse darüber zu erwarten, ob die Transplantation von aus hES-Zellen differenzierten neuralen Vorläuferzellen in Mäusen zu einer deutlichen Verminderung der Tendenz führt, nach entsprechender Stimulation generalisierte epileptische Anfälle zu entwickeln. Entsprechende Beobachtungen waren bereits unter Nutzung muriner ES-Zellen gemacht worden. Im Erfolgsfall wäre dies ein Schritt auf dem Wege zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die Epilepsie. Ferner sind Grundlagenerkenntnisse darüber zu erwarten, unter welchen Bedingungen sich transplantierte humane neurale Vorläuferzellen funktionell in bestimmte Regionen des Hippocampus integrieren können. Es können voraussichtlich neue Daten über das in vivo -Verhalten von transplantierten neuralen Vorläuferzellen des Menschen gewonnen werden, insbesondere über ihre Differenzierung, ihre Vitalität und ihre Ankopplung an das Nervensystem des Transplantatempfängers.

Weitere Angaben zum Inhalt der erteilten Genehmigungen sowie zu den jeweils maßgeblichen Gründen, die jeweils zu einer Bejahung der Frage nach dem Vorliegen der Bedingungen des § 5 StZG geführt haben, sind im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des Robert Koch-Instituts veröffentlicht.

([http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register_node.html) oder über den Pfad [www.rki.de](http://www.rki.de) > Gesundheit A-Z > Stammzellen > Genehmigungsverfahren nach dem Stammzellgesetz > Register genehmigter Anträge nach § 11 Stammzellgesetz).

### 1.3 Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG

Die Mehrzahl der genehmigten Anträge betrifft Forschungsvorhaben, die hochrangige Forschungsziele für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung verfolgen. Der angestrebte Erkenntnisgewinn bezieht sich in einem Teil dieser Forschungsvorhaben auf ES-Zellen selbst oder auf damit in Zusammenhang stehende Fragen zu frühen Entwick-

lungsvorgängen beim Menschen. In einem anderen Teil der auf einen Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung gerichteten Vorhaben sollen vorwiegend oder teilweise Erkenntnisse über andere Typen pluripotenter Stammzellen des Menschen gewonnen werden, wobei hES-Zellen auch zu Vergleichszwecken verwendet werden. In der Mehrzahl handelt es sich dabei um Forschungsvorhaben zu humanen induzierten pluripotenten Stammzellen; in zwei Vorhaben sollen potentiell pluripotente Stammzellen aus dem menschlichen Hoden im Vergleich mit hES-Zellen untersucht werden. In einem nicht unerheblichen Teil der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben werden auch Zielsetzungen zur Erweiterung medizinischer Kenntnisse bei der Entwicklung diagnostischer, präventiver oder therapeutischer Verfahren zur Anwendung bei Menschen verfolgt.

Für den Bereich der Grundlagenforschung lassen sich die Forschungsziele der im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben im Wesentlichen in vier Gruppen wissenschaftlicher Fragestellungen unterteilen, wobei Überschneidungen auftreten können.

Erstens sollen die Bedingungen für die Kultivierung, Aufreinigung und für die genetische Modifizierbarkeit von hES-Zellen näher untersucht und optimiert werden, wobei auch Fragen der Kultivierung von hES-Zellen in größeren als bislang üblichen Maßstäben (beispielsweise in Bioreaktoren) von Interesse sind. Diese Untersuchungen dienen der Entwicklung verbesserter Protokolle und Verfahren zur Bereitstellung möglichst reiner Populationen von hES-Zellen, beispielsweise nach ihrer Langzeitkultivierung, und sollen im Ergebnis zu stärker vereinheitlichten Verfahren beim Umgang mit hES-Zellen und somit zu einer stärkeren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Forschungsergebnissen führen.

Zweitens sind mehrere Vorhaben auf die Untersuchung der molekularen Grundlagen von Pluripotenz und Auslösung früher Differenzierungsvorgänge in hES-Zellen gerichtet. Dabei geht es beispielsweise um die Identifizierung bzw. Charakterisierung von Molekülen und Signalwegen, die an der Aufrechterhaltung von Pluripotenz beteiligt sind. Diese Vorgänge sollen teils im Vergleich zwischen verschiedenen Typen pluripotenter Stammzellen des Menschen untersucht werden, wobei hES-Zellen sowohl Untersuchungsgegenstand für die Gewinnung neuer Erkenntnisse über diesen Prozess als auch als Referenz für die Untersuchung derselben Prozesse an Zellen sind, deren Eigenschaften in Hinblick auf Pluripotenz noch nicht abschließend geklärt sind. Solche Untersuchungen dienen dem wesentlichen Ziel, die molekularen Mechanismen von Pluripotenz und früher Differenzierung besser zu verstehen, daraus Rückschlüsse auf Entwicklungsprozesse im Menschen ziehen zu können und Schlussfolgerungen mit Blick auf verbesserte Protokolle für die Kultivierung und Differenzierung von hES-Zellen abzuleiten.

Drittens ist nach wie vor die Differenzierung von hES-Zellen zu spezifischen Zelltypen, die sich nicht oder nur in begrenztem Maße aus anderen Zellen gewinnen lassen, wesentlicher Gegenstand der genehmigten Forschungsar-

beiten. Die Forschung hat sich hier weiter diversifiziert: Neben der Differenzierung zu neuronalen Zellen des Zentralnervensystems, zu Herz-, Leber- und Knochenzellen sowie zu pankreatischen Zellen, die Gegenstand bereits früher genehmigter Forschungsvorhaben waren, sollen im Rahmen der im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben auch Vorgänge der Differenzierung zu spezifischen Zellen des peripheren Nervensystems, zu Lungenzellen oder zu spezialisierten Zelltypen des Blutes untersucht werden. Dabei werden sowohl an Mauszellen etablierte Protokolle auf hES-Zellen übertragen und bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf diesen Zelltyp evaluiert als auch bereits von anderen an hES-Zellen erarbeitete Vorgehensweisen zusammengeführt, verglichen und optimiert. Zum einen soll durch diese Art der Forschung ein Erkenntnisgewinn über Faktoren und Signalwege erlangt werden, die für die Auslösung und das Voranschreiten bestimmter Differenzierungsprozesse in hES-Zellen wesentlich sind, was gegebenenfalls Rückschlüsse auf entsprechende Prozesse während der Embryonalentwicklung des Menschen, aber auch Aussagen über Mechanismen bei der postnatalen Regeneration dieser Zelltypen ermöglichen kann. Zum anderen zielen die Forschungen verstärkt auf die Schaffung möglichst reiner Populationen differenzierter Zellen, die wiederum zur Klärung wichtiger Forschungsfragen genutzt werden können, beispielsweise für die Untersuchung zellulärer Wechselwirkungen in neuronalen Netzwerken, des Einflusses toxischer Substanzen auf bestimmte Zelltypen oder der immunologischen Eigenschaften von bestimmten differenzierten Zelltypen. In diesem Zusammenhang wird in verstärktem Maße auch der Frage nachgegangen, unter welchen Bedingungen sich aus hES-Zellen genügend große Mengen differenzierter Zellen hoher Reinheit ableiten lassen, wie sie für die Beantwortung wesentlicher Anschlussfragen benötigt werden.

Viertens schließlich wurden mehrere Vorhaben genehmigt, in denen hES-Zellen vorrangig zu Vergleichszwecken für die Untersuchung anderer (potentiell) pluripotenter Zelltypen des Menschen genutzt werden sollen. Diese Vorhaben lassen teils zwar auch einen Erkenntnisgewinn über spezifische Eigenschaften von hES-Zellen erwarten; das Interesse richtet sich hier jedoch jeweils auf die Fragestellung, ob und inwieweit andere pluripotente Zelltypen, insbesondere hiPS-Zellen aber auch aus menschlichem Hoden gewonnene (sog. spermatogoniale) Zelllinien bestimmte, für pluripotente Zellen typische Eigenschaften aufweisen. Unabhängig davon, ob die jeweils interessierende Eigenschaft für hES-Zellen bereits bekannt oder noch nicht untersucht worden ist, dienen hES-Zellen hier vorrangig zu Vergleichszwecken. Inhaltlich hiervon abzugrenzen sind jene Projekte, in denen eine Fragestellung zunächst explizit an hES-Zellen untersucht werden soll und – erst im Anschluss an die (an hES-Zellen als originärem pluripotenten Zelltyp) erfolgte prinzipielle Klärung der Fragestellung – auch auf hiPS-Zellen übertragen werden soll.

Ein nicht unbeachtlicher Teil der im Berichtszeitraum genehmigten Projekte zielt bereits auf die Schaffung von Grundlagen für die Entwicklung neuer therapeutischer

und präventiver Verfahren – i. allg. zusätzlich zur Beantwortung von Fragestellungen der Grundlagenforschung. Im Mittelpunkt steht dabei die Schaffung neuartiger Testsysteme zur Überprüfung der Toxizität von Substanzen auf einen bestimmten Zelltyp bzw. zur Identifizierung neuartiger Substanzen mit einer spezifischen Wirkung auf einen aus hES-Zellen gewonnenen Zelltyp. Eine entsprechende Zielstellung war in acht der genehmigten Vorhaben formuliert und bei der Bewertung der Hochrangigkeit jeweils berücksichtigt worden. Einerseits stehen nämlich für pharmakologisch-toxikologische Forschungen häufig nur primäre Zellkulturen nicht-menschlichen Ursprungs zur Verfügung, an denen für den Menschen typische Wirkungen von Substanzen nicht oder nicht ausreichend überprüft werden können. Andererseits weisen derzeit verfügbare menschliche, beispielsweise auf immortalisierten Zellen beruhende Zellkulturen häufig nicht mehr die physiologischen Eigenschaften primärer Zellen auf, wie sie für die zuverlässige Testung beispielsweise toxischer Nebenwirkungen von Arzneimitteln wünschenswert sind. Die Entwicklung von auf menschlichen Zellen beruhenden In-vitro-Testsystemen, die eine zuverlässigere toxikologische Prüfung von Wirkstoffen als bislang möglich zulassen, ist daher von erheblicher Bedeutung. Dasselbe gilt für die Entwicklung entsprechender Zellkultursysteme für die Identifizierung neuer Wirkungen pharmakologisch wirksamer Substanzen bzw. für deren vertiefte Untersuchung. Ferner wurden in einigen Antragsverfahren auch längerfristige Zielstellungen mit Blick auf eine künftig ggf. mögliche therapeutische Nutzung von aus hES-Zellen differenzierten Zellen formuliert. Dies betrifft beispielsweise Zellen des Herzens, die – selbst bei einer künftig denkbaren Verfügbarkeit von aus hiPS-Zellen herstellbaren patientenspezifischen Zellen – beispielsweise aufgrund der Dringlichkeit ihrer Verfügbarkeit nicht jeweils gesondert im Zuge der Reprogrammierung hergestellt werden könnten. Zusätzlich wurde in verschiedenen Anträgen die begründete Aussicht formuliert, dass die für hES-Zellen etablierten Vorgehensweisen (z. B. bei der Gewinnung größerer Mengen an differenzierten Zellen, Etablierung verbesserter Differenzierungsprotokolle) auch von erheblicher Bedeutung für eine künftig vorstellbare klinische Nutzung von hiPS-Zellen sein können.

Auch im vergangenen Berichtszeitraum wurden in den Antragsverfahren von den Antragstellern die erforderlichen Darlegungen darüber erbracht, dass die von Ihnen geplanten Vorhaben an tierischen Zellen oder in Tiermodellen vorgeklärt worden sind. Dazu wurde sowohl auf Ergebnisse eigener Arbeiten als auch auf von anderen Gruppen in der wissenschaftlichen Literatur publizierte Ergebnisse verwiesen. Die jeweiligen Darlegungen haben nach Auffassung der Genehmigungsbehörde den gesetzlichen Voraussetzungen des § 5 Nummer 2 Buchstabe a StZG entsprochen und konnten den Übergang zur Nutzung humaner embryonaler Stammzellen rechtfertigen. In großem Umfang wurden in Antragsverfahren des Berichtszeitraumes Darlegungen zu bereits erfolgten Untersuchungen an humanen embryonalen Stammzellen des Menschen erbracht, die zur jeweiligen Thematik bereits

außerhalb Deutschlands durchgeführt worden waren. Sinn des Vorklärungserfordernisses des StZG ist es, durch Darlegungen zu bereits erfolgten Untersuchungen an tierischen Materialien vor Genehmigung sicherzustellen, dass die im Vorhaben zu klärenden Fragestellungen den Einsatz von hES-Zellen rechtfertigen. So könnten bereits durch Untersuchungen an tierischem Material erhebliche Schwächen des jeweiligen Versuchsansatzes erkannt und somit ein unnötiger Einsatz von hES-Zellen vermieden werden. Sofern ein experimenteller Ansatz infolge entsprechender internationaler Forschung an hES-Zellen bereits als wissenschaftlich fundiert betrachtet werden kann, kann sich eine zusätzliche Voruntersuchung der Fragestellung an tierischen Zellen oder im Tierversuch gegebenenfalls erübrigen. Dies betrifft beispielsweise Projekte, in denen bereits publizierte Protokolle für eine gerichtete Differenzierung von hES-Zellen zu einem bestimmten Zelltyp modifiziert und über das bereits Bekannte hinaus optimiert werden soll. In solchen Fällen sind weitere Darlegungen zur Vorklärung der entsprechenden Vorhabensaspekte an tierischen Zellen aus dem oben genannten Grunde nicht in jedem Fall erforderlich. Hinzu kommt, dass eine vertiefte Untersuchung der Fragestellung, beispielsweise an murinen ES-Zellen, nicht in allen Fällen zu einem für die formulierten Forschungsziele wesentlichen Erkenntnisgewinn führen würde. Dies betrifft beispielsweise Projekte, in denen Grundlagen der Pluripotenz menschlicher ES-Zellen untersucht werden sollen und von denen bekannt ist, dass sie sich erheblich von denen tierischer ES-Zellen unterscheiden. Ähnliches gilt für Projekte zu den immunologischen Eigenschaften von ES-Zellen und deren Derivaten. Auch für die Differenzierung in bestimmte Zelltypen, beispielsweise des Blutes, ist mittlerweile gut bekannt, dass sich an murinen Zellen etablierte Protokolle nicht auf humane Zellen übertragen lassen und folglich weiterführende Voruntersuchungen mit diesen Zellen zur Vorklärung der jeweiligen experimentellen Fragestellung nicht sinnvoll sind.

Entsprechend § 5 Nummer 2 Buchstabe b StZG wurde jeweils überprüft, ob der mit dem Forschungsvorhaben angestrebte wissenschaftliche Erkenntnisgewinn voraussichtlich nur mit humanen embryonalen Stammzellen erreichbar ist. Die Eignung und Verfügbarkeit möglicher Alternativen zu humanen embryonalen Stammzellen wurde jeweils einzelfallbezogen geprüft und bewertet. Anhand der vom Antragsteller eingereichten Unterlagen wurde überprüft, ob die jeweils für das Vorhaben formulierten Forschungsziele voraussichtlich weder unter Nutzung pluripotenter Stammzellen anderer Spezies (beispielsweise der Maus) noch unter Verwendung anderer menschlicher Zellen (z. B. von Zellen des Nabelschnurblutes) erreichbar sind. Im Mittelpunkt der Prüfung stand dabei häufig die Frage, ob induzierte pluripotente Stammzellen des Menschen geeignet sind, anstelle von hES-Zellen zur Klärung der wissenschaftlichen Fragestellung genutzt zu werden. Im November 2007 war erstmals über die erfolgreiche Reprogrammierung humaner somatischer Zellen berichtet worden. Allerdings sind die Eigenschaften von hiPS-Zellen bis heute erst wenig untersucht, die Methoden zu ihrer Herstellung variieren, die Zellen zei-

gen eine hohe Variabilität in ihrem Differenzierungsverhalten und es ist nach wie vor nicht endgültig geklärt, in welchem Maße hiPS-Zellen und hES-Zellen identische oder nur ähnliche Eigenschaften aufweisen. Angesichts des noch lückenhaften Kenntnisstandes über diese Zellen ist es nach Auffassung des RKI derzeit nicht gerechtfertigt, einem Antragsteller, der eine spezifische Fragestellung anhand von hES-Zellen klären möchte, die Nutzung von hES-Zellen zu versagen, solange für die Fragestellung nicht mit ausreichender Sicherheit geklärt ist, dass sich hES- und hiPS-Zellen tatsächlich identisch verhalten. Zudem soll in mehreren Forschungsvorhaben überprüft werden, ob die an hES-Zellen gewonnenen Erkenntnisse auch für hiPS-Zellen Gültigkeit haben. Dadurch soll erst geklärt werden, ob sich hES- und hiPS-Zellen bezüglich der jeweils untersuchten Eigenschaft tatsächlich gleichen oder aber voneinander unterscheiden. Dies erfordert, zusätzlich zu den oben angeführten Gründen, die Verwendung von hES-Zellen.

Im Rahmen der Prüfung der Genehmigungsvoraussetzungen nach § 6 Absatz 4 Nummer 2 StZG hat die Genehmigungsbehörde bei allen genehmigten Anträgen in Übereinstimmung mit den jeweiligen Stellungnahmen der ZES die ethische Vertretbarkeit der betreffenden Forschungsvorhaben im Sinne der Erfüllung der gesetzlichen Voraussetzungen nach § 5 StZG bejaht.

#### **1.4 Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES)**

Die unabhängige, interdisziplinär zusammengesetzte Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES) nach § 8 StZG, die von der Bundesregierung zum 1. Juli 2008 zum dritten mal berufen wurde, hat die gesetzliche Aufgabe, Anträge auf Einfuhr und Verwendung humaner embryonaler Stammzellen zu Forschungszwecken anhand der eingereichten Unterlagen hinsichtlich der Frage zu prüfen und zu bewerten, ob die betreffenden Forschungsvorhaben die gesetzlichen Voraussetzungen nach § 5 StZG erfüllen und in diesem Sinne ethisch vertretbar sind. Sie hat hierzu gegenüber der Genehmigungsbehörde eine schriftliche Stellungnahme abzugeben. Das Vorliegen einer Stellungnahme der ZES ist nach § 6 Absatz 4 Nummer 3 StZG eine Voraussetzung für die Entscheidung über einen Antrag auf Einfuhr und Verwendung humaner embryonaler Stammzellen zu Forschungszwecken.

Die ZES hat in ihren begründeten Stellungnahmen zu den Forschungsvorhaben, die Gegenstand der 26 genehmigten Anträge sowie der Genehmigungserweiterung für ein bereits in der Vergangenheit befürwortetes Forschungsvorhabens sind, die gesetzlichen Voraussetzungen nach § 5 StZG als erfüllt und die Forschungsvorhaben in diesem Sinne als ethisch vertretbar bewertet. Sie hat die Wahrnehmung ihrer Aufgaben in ihren Tätigkeitsberichten nach § 14 der ZES-Verordnung (ZESV) vom 18. Juli 2002 (BGBl. I S. 2663) für den Zeitraum vom 1. Dezember 2007 bis 30. November 2008 (6. Tätigkeitsbericht der ZES) und für den Zeitraum vom 1. Dezember 2008 bis

30. November 2009 (7. Tätigkeitsbericht der ZES) dargestellt. Die Tätigkeitsberichte sind unter anderem auf den Internetseiten des Bundesministeriums für Gesundheit veröffentlicht (<http://www.bmg.bund.de/SharedDocs/Standardartikel/DE/AZ/S/Glossarbereich-Stammzellgesetz.html>).

## **2 Stand der Forschung mit pluripotenten menschlichen Stammzellen**

### **2.1 Einleitung**

Im hier vorliegenden vierten Erfahrungsbericht der Bundesregierung zur Durchführung des Stammzellgesetzes werden aufbauend auf den vorherigen Berichten die wesentlichen neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse und Entwicklungen der Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen und anderen Stammzellen zusammengestellt. Nicht alle fachlichen Grundlagen werden erneut dargestellt, hierzu wird vielmehr auf die drei vorangegangenen Berichte verwiesen.

Im ersten Erfahrungsbericht der Bundesregierung zur Durchführung des Stammzellgesetzes (Drucksache 15/3639 der 15. Wahlperiode vom 3. August 2004) wurden die Rahmenbedingungen, Ergebnisse und Ausblicke der Grundlagenforschung und mögliche zukünftige Einsatzgebiete von embryonalen und adulten Stammzellen in der modernen Medizin bis einschließlich 2003 dargestellt. Der folgende zweite Erfahrungsbericht (Drucksache 16/4050 der 16. Wahlperiode vom 11. Januar 2007) beschreibt wichtige seit dem ersten Bericht erzielte Fortschritte, Beispiele noch offener Fragen im Bereich der Forschung bis einschließlich 2005 sowie Perspektiven eines möglichen therapeutischen Einsatzes von embryonalen und adulten Stammzellen. Im dritten Erfahrungsbericht wurden die weiteren wissenschaftlichen Erkenntnisse bis einschließlich 2007 zusammengefasst. Hinsichtlich humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) standen dabei die Charakterisierung, Standardisierung und der experimentelle Einsatz im Vordergrund. Darüber hinaus wurden alternative Verfahren und Techniken zur Generierung pluripotenter Zellen dargestellt, die zwischenzeitlich breiten Raum in der Forschungslandschaft einnehmen und gegenwärtig intensiv vergleichend mit humanen embryonalen Stammzellen erforscht werden.

Die hohe Bedeutung der Erforschung alternativer Quellen pluripotenter Stammzellen bildet sich auch in den im Berichtszeitraum 2008 bis 2009 erteilten 26 weiteren Genehmigungen zum Import von humanen ES-Zellen ab. Eine kursorische Durchsicht der bislang erteilten Genehmigungen ergibt, dass bis einschließlich 2009 in etwa 35 deutschen Laboren mit humanen embryonalen Stammzellen gearbeitet wurde.

### **2.2 Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien**

Seit der erstmaligen Beschreibung der erfolgreichen Generierung humaner embryonaler Stammzelllinien (hES-Zelllinien) durch James Thomson (Universität von Wis-

consin, USA) im Jahr 1998 sind nach Schätzungen von Experten bis Ende 2009 weltweit über 1 000 hES-Zelllinien generiert worden, von denen knapp 700 in englischsprachigen Fachzeitschriften publiziert wurden [Löser et al., 2010]. Im Vergleich zum vorherigen Berichtszeitraum hat sich die Anzahl an humanen ES Zelllinien während der zwei Jahre 2008 und 2009 annähernd verdoppelt.

Prinzipiell wird der Ableitung vollständig xeno-freier hES-Linien – also Zellen, die ohne jegliche Kontamination mit Produkten anderer Spezies hergestellt wurden – eine wichtige Bedeutung beigemessen, da Stammzellen durch Kontakt mit tierischen Bestandteilen (Xenogenen) beziehungsweise mit tierischen Krankheitserregern kontaminiert sein können, was ihre Eignung für einen möglichen Einsatz am Menschen reduziert. Dennoch sind nur wenige Linien beschrieben, die diese Kriterien erfüllen, was möglicherweise darauf zurück zu führen ist, dass wissenschaftlich unstrittig gezeigt wurde, wie solche Linien hergestellt werden können. Damit ist die Verfeinerung der Methodik für die akademische Forschung nur noch wenig interessant. Die Industriegetriebenen Forschungsaktivitäten hingegen werden kaum publiziert und stehen der Öffentlichkeit somit nicht zur Verfügung. Wie im 3. Stammzellbericht bereits dargestellt wurde, sind manche der xeno-freien Zelllinien zwischenzeitlich im hES-Zell-Register der Europäischen Union ([www.hESCreg.eu](http://www.hESCreg.eu)) oder anderen Stammzellbanken als „verfügbar“ gelistet, so dass beispielsweise die im Oktober 2006 publizierte Linie SA611 der schwedischen Firma Cellartis grundsätzlich auch deutschen Forschern zur Verfügung stünde.

Eine sehr bemerkenswerte Zunahme an publizierten hES-Zelllinien gibt es bei krankheitsspezifischen hES-Zelllinien, die von im Rahmen einer Prä-Implantations-Diagnostik identifizierten Embryonen abgeleitet wurden. Hier sind zwischenzeitlich 116 Linien für 33 Erkrankungen beschrieben. Einige dieser Linien sind in bei Stemride International Ltd. ([http://stemride.com/Stem\\_Cell\\_Bank.htm](http://stemride.com/Stem_Cell_Bank.htm)) katalogisiert, wobei die aktuell einsehbare Liste (Stand vom August 2009) mittlerweile mehr als 80 Linien für 23 verschiedene Erkrankungen umfasst. Die Einfuhr und Verwendung dieser Zellen ist in Deutschland nach dem Stammzellgesetz verboten.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Mehrzahl neuerer hES-Zelllinien wohl generiert wurde, um hES-Zelllinien mit geringerer Anzahl an vorherigen Zellteilungen (Passagen) unter verbesserten Zellkulturbedingungen zur Verfügung zu stellen. Denn ein Vergleich der mit verschiedenen hES-Zelllinien gewonnenen Forschungsergebnisse zeigt, dass die jüngeren Zelllinien deutlich stabilere und reproduzierbarere Versuchsergebnisse ermöglichen (siehe 2.3.1).

Bisher scheint sich eine gewisse regionale Präferenz für hES-Zell-Anbieter entwickelt zu haben [Löser et al., 2010], die im Wesentlichen wohl auf Kooperationen und direkten Interaktionen beruht. So verwenden neben den USA auch das Vereinigte Königreich, Israel und sogar China präferentiell hES-Zelllinien von WiCell (Wisconsin, USA), während Australien eher Linien von ES-International (Singapur) und Schweden die meisten Linien

von Cellartis (Göteborg, Schweden) beziehen. Auch in Deutschland scheint eine Präferenz für amerikanische hES-Zellen vorzuliegen. So wurden in beinahe jedem der bis Ende 2009 gestellten Importanträge Zellen von WiCell beantragt (in 47 der 49 genehmigten Projektanträge). Zellen von ES-International (Singapur) wurden hingegen nur für 17 Projekte beantragt. Die erst 2004 publizierten hES-Zelllinien der Harvard Universität wurden zwischenzeitlich 13-mal beantragt, und sind damit die am häufigsten beantragten Zellen, die nach dem ursprünglichen Stichtag (1. Januar 2002) generiert wurden und erst nach der StZG-Novellierung mit neuem Stichtag (1. Mai 2007) zum Import beantragt werden konnten. hES-Zelllinien aus Haifa (Israel) wurden 9-mal beantragt, die Linien der Karolinska-Universität (Schweden) ebenfalls 9-mal und die der schwedischen Firma Cellartis 7-mal. Neuere Linien aus Sheffield und New Castle (UK), die ebenfalls erst nach der StZG-Novellierung Stichtags-konform waren, wurden in 4 beziehungsweise 3 Projekten beantragt.

Die vorhandenen Zelllinien bzw. Informationen darüber werden in verschiedenen internationalen Stammzellbanken bzw. -registern gesammelt. Zusätzlich zu den im 3. Erfahrungsbericht der Bundesregierung aufgeführten Stammzellregistern und Stammzellbanken ist das hESC-Register ([www.hescereg.eu](http://www.hescereg.eu)) der Europäischen Union zu nennen. Gegenwärtig stellt es für deutsche Wissenschaftler eine hilfreiche Ressource dar, um Charakteristika verschiedener Stammzelllinien in einer einfach zu bedienenden Datenbank zu vergleichen. Insbesondere zur Auswahl derjenigen hES-Zelllinien, die für die geplanten Experimente besonders sinnvoll eingesetzt werden können, stellen diese Informationen eine wichtige Grundlage dar. Darüber hinaus beinhaltet das Register Informationen zu verschiedenen humanen induzierten pluripotenten Stammzelllinien (iPS-Zellen) wichtiger internationaler Zentren. Informationen zu verfügbaren iPS-Zellen sind in den etablierten Registern des NIH, der britischen UK Stem Cell Bank oder der ISCF (International Stem Cell Foundation) gegenwärtig nicht zu finden.

### **2.3 Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen**

Einleitend ist festzustellen, dass humane embryonale Stammzellen derzeit für zwei unterschiedliche Zwecke eingesetzt werden. Zum einen finden hES-Zellen zunehmend in vergleichenden Studien mit pluripotenten Zellen aus alternativen Quellen Verwendung, da sie den „Goldstandard“ für Fragen der Selbsterneuerung, Pluripotenz und Differenzierbarkeit darstellen (siehe auch 2.3.3). Zum anderen ist die Forschung an hES-Zellen jedoch weiterhin ein eigenständiges Forschungsgebiet. So werden hES-Zellen eingesetzt, um die menschliche Embryonalentwicklung und die frühesten Differenzierungsschritte während der Anlage der unterschiedlichen Gewebearten weiter zu erforschen. Auch für die Untersuchung der bestimmenden Merkmale pluripotenter Zellen, die derzeit nur in Ansätzen verstanden sind, ist die Verwendung von hES-Zellen unabdingbar (siehe 2.3.3). Darüber hinaus sind hES-Zellen auch zur Etablierung neuer Methoden häufig am besten geeignet, weil die Kultur- und Differen-

zierungseigenschaften von induzierten pluripotenten Stammzellen zusätzlich von den eingebrachten gentechnischen Veränderungen beeinflusst werden, was diesbezügliche Analysen und Optimierungsbemühungen erschwert. So werden die meisten methodischen Entwicklungen zum Gentransfer (siehe 2.3.4) oder zur Optimierung von Differenzierungsprotokollen gegenwärtig überwiegend an hES-Zellen erarbeitet und sollen dann teils auf andere Formen pluripotenter Stammzellen übertragen werden.

Im Folgenden sind einige wichtige Bereiche der Forschung an hES-Zellen dargestellt.

#### **2.3.1 Unterschiede zwischen hES-Zelllinien**

Wie im vorangegangenen dritten Stammzellbericht bereits dargestellt wurde, scheinen sich verschiedene hES-Zelllinien in ihren Differenzierungseigenschaften deutlich zu unterscheiden. In einer Studie mit 17 hES-Zelllinien (HUES1-17), die 2004 unter Verwendung des gleichen Verfahrens an der Harvard-Universität generiert wurden, ließen sich große Unterschiede hinsichtlich des jeweiligen Differenzierungspotentials beobachten [Osafune et al., 2008]. Die Untersuchung der Frage, welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich gemacht werden können, wird gegenwärtig ausgeweitet. Bereits im Vorfeld gab es Hinweise, dass hier vor allem Unterschiede in der Steuerung der Aktivität von Genen eine Rolle spielen, die entweder durch Unterschiede in der genetischen Information (DNA-Sequenz) selbst zustande kommen oder durch andere Modifikationen der DNA-Moleküle, welche die Stärke der Gen-Aktivität beeinflussen (epigenetische Regulation): Unter Federführung der International Stem Cell Initiative (ISCI) wurden Daten zu 46 verschiedenen Linien erhoben, die zum Teil in unterschiedlichen Laboren kultiviert wurden, und es ließen sich, wie im 3. Stammzellbericht bereits dargestellt, hinsichtlich des Musters der Genaktivität (Genexpressionsprofile) aber auch der epigenetischen Regulation deutliche Unterschiede feststellen [Andrews et al., 2007]. Dies trifft insbesondere auf die Gene zu, die normalerweise nur vom mütterlichen beziehungsweise nur vom väterlichen Chromosom (Allel) abgelesen werden. Illustrativ ist die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in weiblichen hES-Zellen. Erwartungsgemäß sollten in weiblichen hES-Zellen beide X-Chromosomen „aktiv“ sein. Dies ist allerdings nur in 18 von 31 in den von Andrews et al. untersuchten Proben der Fall und in den verbleibenden 13 hES-Zelllinien zeigt sich eine Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen, wie sie für weiter differenzierte Zellen typisch wäre. Interessanterweise scheinen diese Diskrepanzen auch innerhalb vermeintlich „gleicher“ hES-Zelllinien aufzutreten, die in unterschiedlichen Laboren mit unterschiedlichen Bedingungen kultiviert wurden.

#### **2.3.2 Erkenntnisse aus dem Vergleich von humanen ES- und Maus-ES-Zellen**

Bereits vor dem Berichtszeitraum legten vergleichende Untersuchungen mit murinen Stammzelllinien – also

Stammzelllinien von Mäusen – nahe, dass humane ES-Zellen sich von murinen ES-Zellen deutlich unterscheiden und in einigen Merkmalen eher murinen Stammzellen ähneln, die aus einem späteren entwicklungsbiologischen Stadium, dem Epiblasten, abgeleitet wurden [Brons et al., 2007]. Dies gilt zum Beispiel für die oben beschriebene Inaktivierung eines X-Chromosoms in vielen weiblichen hES-Zellen, wie sie auch in murinen Epiblast-Zellen, nicht aber in murinen ES-Zellen beobachtet wird. Die initiale Schlussfolgerung, dass humane ES-Zelllinien also eher murinen Epiblaststammzellen gleichzusetzen wären, ist heute der Erkenntnis gewichen, dass es zwar mehr Gemeinsamkeiten zwischen humanen ES-Zellen und murinen Epiblaststammzellen als zwischen humanen ES- und murinen ES-Zellen gibt, sich dennoch deutliche Unterschiede festmachen lassen, unter anderem in den für die Selbsterneuerung relevanten Signalwegen [Greber et al., 2010]. Da zwischenzeitlich aber gezeigt werden konnte, dass murine Epiblaststammzellen durch veränderte Zellkulturbedingungen wieder auf das Niveau – entwicklungsbiologisch früherer – embryonaler Stammzellen zurück gebracht werden können [Bao et al., 2009] bekommt die Forschung hinsichtlich optimierter Zellkulturbedingungen auch für humane ES-Zellen neue Bedeutung. Wegweisend sind zum Einen die Erkenntnisse von Austin Smith (Cambridge, UK) zur Definition von Zellkulturbedingungen, die mittels Hemmung zweier Signalkaskaden die Pluripotenz von Stammzellen stabilisieren [Ying et al., 2008]. Zum Anderen scheint auch die Kultivierung unter reduziertem Luft-Sauerstoffgehalt, wie er physiologischerweise in den Geweben des Körpers wäre, die Pluripotenz und Stabilität von hES-Zellen zu unterstützen [Forsyth et al., 2008].

### 2.3.3 Bestimmende Merkmale pluripotenter Stammzellen

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Erkenntnisse führen dazu, dass Epigenetik und Expressionsmuster von hES-Zellen intensiv mit anderen Stammzellen wie den induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) verglichen werden. Gegenwärtig sind lediglich in Bezug auf die Aktivität bestimmter Gene Unterschiede zwischen humanen iPS- und ES-Zellen beschrieben [Chin et al., 2009; Doi et al., 2009]. Eine Aussage welche dieser Unterschiede in Hinblick auf die molekularen Mechanismen für die Pluripotenz und das Differenzierungspotential relevant sind, lässt sich jedoch mit dem gegenwärtigen Wissen noch nicht treffen. Die Aufklärung dieser Fragen hat aber besondere Bedeutung, weil im Gegensatz zu murinen ES-Zellen das volle entwicklungsbiologische Potential (die Pluripotenz) von hES-Zellen nicht durch Injektion in Blastozysten (Chimären-Modelle) untersucht werden kann. Somit ist eine Weiterentwicklung der molekularen Charakterisierung von humanen Stammzelllinien essentiell, um geeignete Marker zu definieren, die vollständig pluripotente Stammzellen von nur teilweise reprogrammierten Zellen oder bereits differenzierten Zelllinien unterscheiden können. Dieses Wissen wiederum ist von entscheidender Bedeutung für eine Standardisierung von Differenzierungs-Protokollen, um mit verschiedenen

Ausgangszellen vergleichbare Differenzierungsstadien zu erhalten. Dies ist letztlich eine der Grundvoraussetzungen, um aussagekräftige Resultate im Bereich der stammzellbasierten Medikamententestung zu ermöglichen oder sichere stammzellbasierte Zell- bzw. Gewebeersatztherapien zu entwickeln. Letztlich sind entsprechende Kenntnisse zudem eine entscheidende Voraussetzung, um die Güte alternativer Quellen pluripotenter Stammzellen charakterisieren zu können.

### 2.3.4 Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen

Das Einbringen fremder Gensequenzen in humane embryonale Stammzellen ist für unterschiedliche Fragestellungen und Anwendungen von Bedeutung. So ist die stabile Integration von Reporter-Konstrukten in das Stammzellgenom entscheidend für die Klärung grundlegender entwicklungsbiologischer Fragestellungen. Zum Beispiel können durch gezieltes An- und Ausschalten bestimmter zu testender Gene („gain of function“, „loss of function“) das Zusammenspiel dieser Gene und deren Regulationsmechanismen während früher Phasen der Embryonalentwicklung analysiert werden. Konkret lässt sich somit beispielsweise die Notwendigkeit eines bestimmten Faktors für die Bildung gemeinsamer Vorläuferzellen aller Nervenzellen untersuchen. Darüber hinaus sind humane ES-Zellen mit integrierten Reporter- und Selektionsmarkern auch wichtige Hilfsmittel für die Entwicklung pharm/toxikologischer Testsysteme sowie für die Optimierung von verbesserten Kultur- und Differenzierungstechniken oder die Identifikation z. B. neuer Differenzierungsfaktoren. Weiterhin könnten gezielte genetische Modifikationen zukünftig auch für potentielle klinische Anwendungen von Stammzellderivaten von sicherheitsrelevantem Nutzen sein. So werden gegenwärtig Verfahren entwickelt, um einmal transplantierte Zellen durch Aktivierung eines künstlichen Stoffwechselsystems absterben zu lassen. Dies könnte beispielsweise zum Einsatz kommen, falls eine unerwünschte Entstehung von Teratomen (Mischtumoren, die aus verschiedenen Gewebetypen bestehen) beobachtet wird oder transplantierte Zellen bei einer späteren Fehlfunktion wieder entfernt werden sollen.

Seit der erstmaligen Beschreibung humaner ES-Zellen in 1998 gilt es als schwierig, diese Zellen gentechnisch zu verändern. Anders als in ES-Zellen der Maus waren nicht-virale-Methoden zur Einbringung fremden genetischen Materials in Zellen (Transfektionsmethoden) in diesen Zellen bislang ausgesprochen ineffizient und einzig der Einsatz verschiedener Viren als Transportvehikel (Vektor) erlaubte eine effiziente genetische Manipulation [Ma et al., 2003]. Leider zeigte sich in den vergangenen Jahren jedoch, dass der Nutzen stabil gentechnisch veränderter ES-Zelllinien (insbesondere nach Verwendung von so genannten Lentiviren als Vektoren) durch die Inaktivierung (so genanntes „Silencing“) der übertragenen fremden Gensequenz (Transgen) in ES-Zellen beträchtlich eingeschränkt wird [Xia et al., 2007]. Dies ist wohl darauf zurück zu führen, dass menschliche Zellen evolutionär Mechanismen entwickelt haben, um von Viren einge-

brachte DNA-Sequenzen recht effizient auszuschalten. Während des Berichtszeitraums wurden allerdings neue Transfektionsprotokolle etabliert, welche nun auch eine effiziente, nicht-virale genetische Manipulation humaner ES-Zellen mit Transfektionsraten von ca. 50 Prozent (statt der bislang üblichen ca. 5 Prozent) erlauben [Schwanke et al., 2010]. Damit ist nun die dauerhafte gentechnische Veränderung humaner ES-Zelllinien in der Zellkultur effizient und stabil möglich.

Allerdings führen all diese klassischen Gentransfer-Methoden zu einer zufälligen Integration des Transgens in das genetische Material (Genom) der Wirtszelle. Dies hat zum einen den Nachteil, dass die Aktivität des Transgens stark abhängig vom Integrationsort ist. Zum anderen besteht das Risiko, dass das eingefügte Transgen zur Aktivierung benachbarter Krebsgene (Onkogene) und damit zur Entstehung von Tumorzellen führen kann. Zumindest im Hinblick auf die klinische Verwendung von Stammzellderivaten ist dies problematisch. In jüngerer Vergangenheit konnten nun auch diesbezüglich Lösungsansätze entwickelt und in hES-Zellen umgesetzt werden. So konnte eine gezielte Transgen-Insertion an bestimmten Orten des humanen Genoms erreicht werden, welche als unbedenklich bekannt sind (so genannte „safe harbor sites“) [Irion et al., 2007]. Basierend auf zelleigenen Mechanismen zur DNA-Modifikation lassen sich durch einen spontanen Austausch annähernd gleicher DNA-Sequenzen (homologe Rekombination) gezielt einzelne Modifikationen in die DNA einfügen. In hES-Zellen ist diese Technik allein relativ ineffizient [Ruby and Zheng, 2009], kann aber durch eine weitere molekularbiologische Technik zur absichtlichen Erzeugung von DNA-Brüchen (Zinkfinger-Nuklease-Technologie, [Cathomen and Jung, 2008]) effizient gesteigert werden, so dass kürzlich die gezielte Modifikation von humanen pluripotenten Stammzellen mit dieser Technik beschrieben wurde [Hockemeyer et al., 2009; Zou et al., 2009]. Zukünftig sollte es mit dieser Methode erreichbar sein, Gendefekte in pluripotenten Stammzellen ganz gezielt zu korrigieren, um beispielsweise den Effekt eines Gens auf eine bestimmte Krankheits-Ursache in vitro (also in Zellkultur-Tests) untersuchen zu können.

Gegenwärtig kommen vorrangig hES-Zellen als Ausgangsmaterial für Untersuchungen dieser Art in Frage. Ihre Eigenschaften sind weit genug erforscht. An ihnen können deshalb schädigende Effekte erkannt oder sicher ausgeschlossen werden, die durch gentechnische Manipulation entstehen könnten. Bis zum Beispiel humane iPS-Zellen als Ersatz in Frage kommen, muss erst festgestellt werden, ob diese tatsächlich hES Zellen ähnlich genug sind (siehe 2.4.5). Sollte sich dies bestätigen, werden sicherlich mittelfristig auch iPS-Zellen genutzt werden können, z. B. um krankheitsspezifische Gendefekte zu korrigieren (siehe auch hierzu 2.4.5).

## 2.4 Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen

Die in den vorangegangenen Erfahrungsberichten bereits beschriebenen weltweiten Anstrengungen, alternative

Quellen zur Gewinnung pluripotenter humaner Stammzellen zu erschließen, wurden im Berichtszeitraum ausgeweitet. Ziel ist es, die Verwendung lebensfähiger menschlicher Embryonen oder totipotenter Zellen zu vermeiden, die sich unter geeigneten Bedingungen zu einem Individuum entwickeln können.

### 2.4.1 Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus Blastomer-Biopsien

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass aus einzelnen Blastomeren des 8-Zell-Embryos pluripotente Stammzelllinien generiert werden konnten. Allerdings wurde dabei nicht gezielt eine Blastomere entnommen, wie es technisch durchaus möglich ist und im Rahmen der Prä-Implantations-Diagnostik im Ausland eingesetzt wird, sondern es wurde der gesamte Embryo „des-integriert“ und für die Ableitung der Zellen eingesetzt [2. Stammzellbericht; Klimanskaya et al., 2006]. Ähnlich wurden in einer weiteren Arbeit alle vier Blastomere eines 4-Zell-Embryos verwendet, um embryonale Stammzellen abzuleiten [Geens et al., 2009]. Zwischenzeitlich scheint es aber dem Team um Robert Lanza in der kalifornischen Firma Advanced Cell Technology (Worcester, MA, USA) gelungen zu sein, aus humanen Embryonen im 8-Zellstadium einzelne Blastomere mittels Biopsie so zu entnehmen und embryonale Stammzellen abzuleiten [Chung et al., 2008], dass ca. 80 Prozent der biopsierten Ursprungsembryos sich bis zum Blastozystenstadium weiter entwickeln konnten. Diese Studie ließ allerdings einige für die Beurteilung des Verfahrens wichtige Fragen unbeantwortet; beispielsweise mit welchem Risiko eine Schädigung des Embryos zu befürchten ist oder ob alle Einzel-Blastomere das gleiche Potential besitzen bzw. mit welcher Wahrscheinlichkeit eine für die Stammzelleitung geeignete Blastomere zufällig Verwendung findet. Letztlich bleibt zusammen zu fassen, dass dieses Verfahren bisher keine nennenswerte Verbreitung gefunden hat und weitere neuere wissenschaftliche Daten nicht zur Verfügung stehen. Entsprechende Untersuchungen und Verfahren an menschlichen Zellen wären in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz verboten.

### 2.4.2 Kerntransfer-Verfahren

Eine Möglichkeit, passende Zellen für einen bestimmten Patienten herzustellen, die bei einer Transplantation von dessen Immunsystem nicht abgestoßen würden (autologe Zellen), ist die Erzeugung von Zellen mit gleichem Erbmaterial durch den gezielten Transfer eines Zellkerns aus einer Körperzelle (somatischen Zelle) in eine „entkernte“ Eizelle (somatic cell nuclear transfer, SCNT oder NT). Diese Technik wird seit einigen Jahren zur Erschaffung von tierischen ES-Zellen genutzt, die das gleiche Erbmaterial wie der Spenderorganismus haben („Klonen“). In Deutschland sind solche Arbeiten an humanen Zellen nach dem Embryonenschutzgesetz als nicht zulässig anzusehen.

Im November des Jahres 2007 konnte eine Gruppe aus Oregon (USA) erstmals zeigen, dass dieses Verfahren mit

Zellen von nichtmenschlichen Primaten (Makaken) erfolgreich durchführbar ist [Byrne et al., 2007].

Anfang des Jahres 2008 wurde erstmals gezeigt, dass Embryonalstadien bis zur Blastozyste nach Transfer der Kerne humaner Bindegewebszellen (Fibroblasten) in entkernte humane Eizellen generiert werden können [French et al., 2008]. Ein Jahr später veröffentlichte eine chinesische Arbeitsgruppe vom Shandong Research Center of Stem Cell Engineering eine effizientere Methode zur Entkernung von Zellen (Enukleation), mit deren Hilfe humane Kerntransfer-Embryonen bis zum Blastozystenstadium generiert werden konnten [Li et al., 2009]. Letztlich wurde aber in keiner der beiden Publikationen beschrieben, ob sich aus diesen „Klon“-Blastozysten tatsächlich embryonale Stammzellen ableiten lassen.

Eine wesentliche Limitation der Generierung patientenspezifischer Stammzellen mittels Kerntransfer stellt die Verfügbarkeit von Spendereizellen dar. Es gibt jedoch Überlegungen, nicht humane Eizellen, sondern Eizellen von Tieren für den Kerntransfer einzusetzen. Bereits im Jahre 2003 hatte eine chinesisch-amerikanische Arbeitsgruppe angeblich erfolgreiche Experimente mit Kaninchen-Eizellen publiziert. Diese Arbeiten konnten jedoch zwischenzeitlich nicht unabhängig reproduziert werden. Aufsehen erregte im Frühjahr 2007 der Antrag eines britischen Forscherteams, für den Kerntransfer humaner Spenderkerne auch Eizellen von Kühen einzusetzen (<http://www.hfea.gov.uk/474.html>). Dieser Antrag führte zu einer breiten öffentlichen Debatte in Großbritannien und im Ausland und mündete letztlich 2008 in der Erteilung einer Lizenz durch die HFEA (Human fertilisation and embryology authority), in welcher die Verwendung tierischer Eizellen für humane Kerntransferexperimente ermöglicht wurde.

Eine neuere Arbeit widerspricht sogar dem Konzept, dass eine normale Entwicklung nach einem Kerntransfer möglich ist, wenn Eizelle und Zellkern von unterschiedlichen Spezies stammen. Nach Transfer von Kernen menschlicher Körperzellen in entkernte humane Eizellen, sowie Rinder- und Kaninchen-Eizellen entstanden Entitäten, die auf den ersten Blick einem frühen Embryo ähneln. Genauere Untersuchungen ergaben aber, dass nur die Gen-Expressions-Profile derjenigen Entitäten denen normaler Embryonen ähnelten, die aus Kerntransfer in humane Eizellhüllen hervorgegangen waren. Nach Übertragung in Rinder- oder Kaninchen-Eizell-Hüllen wurden Embryoblasten-spezifische Gene nicht aktiviert, es fand also keine entsprechende Reprogrammierung des übertragenen Zellkerns statt. [Chung et al., 2009]. Deshalb und nicht zuletzt weil, wie unter 2.4.3 ausgeführt wird, zwischenzeitlich neuere Methoden zur Reprogrammierung somatischer Zellen zur Verfügung stehen, werden – nach Auskunft eines der beteiligten Forscher (Stephen Minger) – die ursprünglich von den britischen Arbeitsgruppen geplant und im 3. Stammzellbericht erwähnten Arbeiten in keinem Labor weiter verfolgt.

### 2.4.3 Gewinnung von Stammzellen ausgehend von Keimzellen und deren Vorläuferzellen

Während der normalen Embryonal- beziehungsweise Fötalentwicklung wandern die Vorläuferzellen der späteren Ei- bzw. Spermienzellen (Primordiale Keimzellen) aus einer Region des Dottersacks in die Keimleiste, wo sie später in den Gonaden (Eierstock bzw. Hoden) weiter ausreifen. Wenn diese Zellen jedoch während ihrer Wanderung durch unbekannte Faktoren aufgehalten werden, können sie sich zu einem späteren Zeitpunkt spontan vermehren und zu Teratomen führen. Primordiale Keimzellen scheinen demnach die Fähigkeit zu besitzen, sich spontan in pluripotente Stammzellen umzuwandeln. Werden fötale Primordiale Keimzellen gezielt isoliert und mit Hilfe geeigneter Zellkulturbedingungen kultiviert, lassen sich aus ihnen pluripotente Zelllinien etablieren, die im wissenschaftlichen Sprachgebrauch semantisch nicht ganz korrekt „embryonic germ cells“ (EG-Zellen) genannt werden. Diese Zellen ließen sich bisher allerdings nicht so stabil wie humane embryonale Stammzellen kultivieren [Turnpenny et al., 2006], so dass EG-Zellen gegenwärtig keine nennenswerte Verbreitung in der internationalen Forschung finden. Allerdings zeigt die prinzipielle Verfügbarkeit solcher Zellen, dass sich Keimzellen unter geeigneten Bedingungen ohne genetische Manipulationen zu pluripotenten Stammzellen umwandeln lassen. Wie bereits im dritten Stammzellbericht dargelegt, konnte gezeigt werden, dass sich auch aus dem Hodengewebe erwachsener Mäuse noch pluripotente Stammzelllinien generieren lassen. Dabei sind wohl die eigentlich „unipotenten“ spermatogonialen Stammzellen (Vorläuferzellen von Spermien) diejenigen Zellen, welche sich unter geeigneten Zellkultur-Bedingungen spontan in pluripotente Stammzellen umwandeln lassen [Ko et al., 2009]. Kürzlich wurden weitere Optimierungen zur Generierung dieser Zellen veröffentlicht [Guan et al., 2009]. Im Berichtszeitraum wurden diese Erkenntnisse auf menschliche Zellen übertragen und erstmals aus humanen Hoden abgeleitete Stammzellen als pluripotent beschrieben [Conrad et al., 2008; Gallicano et al., 2009; Golestaneh et al., 2009]. Diese Ergebnisse konnten allerdings in anderen Stammzelllaboren bisher nicht reproduziert werden und sind daher noch umstritten. Da sich weibliche Keimzellen vor allem dadurch von männlichen unterscheiden, dass sie bereits vor der Geburt reifen, lassen sich aus den Eierstöcken weiblicher Organismen keine Stammzelllinien ableiten. Wie im dritten Stammzellbericht bereits ausgeführt wurde, lassen sich allerdings reife Eizellen „parthenogenetisch“ aktivieren, so dass sich der bei der vorherigen Reifeteilung abgeschnürte Chromosomensatz (das Polkörperchen) wieder mit dem Eizell-Chromosomensatz vereint und eine Entität entsteht, die sich zunächst wie eine befruchtete Eizelle weiter entwickeln kann, jedoch nicht voll entwicklungsfähig ist. Im Berichtszeitraum hat die Gruppe um Jose Cibelli, der als Pionier der Forschung an parthenogenetischen embryonalen Stammzellen angesehen werden kann, humane pluripotente Stammzelllinien aus parthenogenetisch aktivierten humanen Eizellen beschrieben [de Fried et al., 2008] und erhärtete damit Daten einer chinesischen und einer russischen Arbeits-

gruppe, die Ähnliches zuvor weniger konklusiv publiziert hatten.

Für das Differenzierungsverhalten von aus Keimzellen abgeleiteten Stammzellen spielen ihre Keimzelspezifischen Besonderheiten nur eine untergeordnete Rolle, sodass sich die mit ES-Zellen etablierten Differenzierungsprotokolle auch auf diese Keimzellabgeleiteten pluripotenten Stammzellen übertragen lassen.

Obwohl die beschriebenen Verfahren zur Ableitung von Stammzelllinien aus menschlichen Eizellen die Möglichkeit bieten könnten, ohne Embryonenverbrauch immunkompatible Zellen für zukünftige Therapien zur Verfügung zu stellen, ist das Konzept aber bisher kaum weiter verfolgt worden. Gründe hierfür sind vor allem Erfolge mit induzierten pluripotenten Stammzellen und ethische und medizinische Probleme mit Eizell-Spenden.

Verschiedene Arbeitsgruppen in Deutschland beleuchten gegenwärtig das Differenzierungspotential aus Maus – Keimzellen abgeleiteter pluripotenter Stammzellen im Hinblick auf Differenzierung zu Nervenzellen [Dinger et al., 2008; Streckfuss-Bomeke et al., 2009], zu Herzmuskelzellen [Guan et al., 2007] und Leberzell-Differenzierung [Loya et al., 2009].

#### 2.4.4 Fötale Stammzellen

Fötale Stammzellen können entweder nach erfolgten Schwangerschaftsabbrüchen direkt aus Föten, oder im Rahmen einer Chorionbiopsie bzw. Amniozentese aus dem Amnion beziehungsweise Chorion (die den Fötus umgebenden Hüllen) gewonnen werden. Stammzellen aus Amnion oder Chorion scheinen sich in verschiedene Entwicklungsrichtungen differenzieren zu lassen und werden teilweise als Alternative zu embryonalen Stammzellen diskutiert. Berichte, welche die Pluripotenz solcher Zellen zu belegen scheinen sind, wie bereits im dritten Stammzellbericht dargelegt, jedoch nach wie vor wissenschaftlich sehr umstritten und konnten auch während dieser Berichtsperiode nicht erhärtet werden.

Aufgrund ihres frühen entwicklungsbiologischen Zustands besitzen fötale Zellen eine höhere Teilungsfähigkeit als reife, adulte Zellen und lassen sich zumeist effizienter in Gewebe transplantieren. Aus diesen Gründen ist in den letzten Jahren auch die Transplantation von (stammzellhaltigen) Zellpräparationen, die aus Föten isoliert werden können, in Erwägung gezogen und in wenigen Fällen auch klinisch durchgeführt worden.

Nachdem es in den letzten Jahren bereits erfolgreiche klinische Studien zur Transplantation fötaler Zellen für die Therapie der Parkinson-Erkrankung gegeben hatte [Mendez et al., 2008], wurden im Berichtszeitraum weltweit weitere klinische Studien genehmigt. So hat die US Firma „Neuralstem“ von der FDA die Erlaubnis erhalten, fötale Stammzellen des Nervensystems (neurale Stammzellen) in Patienten mit amyotropher Lateralsklerose zu testen. Die Firma ReNeuron bekam in Großbritannien die Zulassung für eine klinische Studie an Schlaganfall-Patienten mit genetisch modifizierten, fötalen neuralen Stammzellen. StemCells Inc. erhielt die Erlaubnis für eine Phase I

Studie mit neuralen fötalen Stammzellen bei Pelizaeus-Merzbacher Disease, einer neurodegenerativen Erkrankung bei Kindern. Außerdem sollen fötale Zellen auch (wieder) zur Therapie der Parkinsonschen Erkrankung eingesetzt werden [Isacson, 2009].

Solche Therapien eröffnen die Möglichkeit zur Therapie bisher unheilbarer Krankheiten, sind jedoch nicht ohne Risiken. Die möglichen Auswirkungen einer Behandlung (insbesondere unter schlecht validierten und kontrollierten Bedingungen) wurden kürzlich offenbar, als bei einem Patienten mit Louis-Bar-Syndrom nach Transplantation fötaler Zellen Hirntumoren auftraten [Amariglio et al., 2009].

#### 2.4.5 Reprogrammierung von Körperzellen

Die Reprogrammierung (Umwandlung) adulter humaner Körperzellen in pluripotente, ES-artige Stammzellen wurde erstmals 2006 und 2007 von S. Yamanaka an Hautzellen gezeigt. Anfangs war die zugrundeliegende Technologie ineffizient und auf Hautzellen beschränkt. Die ursprünglich verwendete Technologie wäre bei einer klinischen Anwendung mit dem Risiko behaftet, dass bei der Reprogrammierung Tumorzellen entstehen. Dies liegt zum einen daran, dass ins Genom integrierende Viren (so genannte  $\gamma$ -Retroviren oder Lentiviren) als Transportvehikel verwendet werden, um die notwendigen Faktoren in die Zelle einzubringen (siehe auch Kap. 2.3.4), wodurch unvorhersehbare Veränderungen der Genaktivität entstehen können. Zum anderen werden potentiell krebs erzeugende Faktoren wie cMYC oder KLF4 in die Zelle eingeschleust.

Im Berichtszeitraum konnten jedoch zum Teil erhebliche Fortschritte erzielt werden: Dies betrifft sowohl Erkenntnisse über die zu Grunde liegenden Mechanismen als auch technische Aspekte der Reprogrammierung. So ist unterdessen deutlich geworden, dass insbesondere in der initialen Phase der Reprogrammierung die Regulation des Zellzyklus eine entscheidende Rolle spielt [Utikal et al., 2009]. Eine zentrale Regulationsrolle wird hier anscheinend von einem aus der Krebsforschung bekannten Protein (dem Tumorsuppressor „p53“) wahrgenommen, was einmal mehr verdeutlicht wie eng verknüpft die Mechanismen von Krebsentstehung und Reprogrammierung sind [Kawamura et al., 2009]. Andererseits kristallisierte sich das Pluripotenz-Gen OCT4 als entscheidender Faktor der Reprogrammierung heraus. Dementsprechend konnte die Zahl der notwendigen Reprogrammierungsfaktoren abhängig vom verwendeten Zelltyp bis auf diesen einen Faktor reduziert werden [Kim et al., 2009b]. Neben der Verwendung besonders geeigneter Zelltypen gelang dies auch durch Einsatz definierter chemischer Substanzen [Shi et al., 2008a; Shi et al., 2008b]. Solche „niedermolekularen Substanzen“ (small molecules) ermöglichten darüber hinaus auch die Entwicklung eines 200-fach effizienteren Reprogrammierungsprotokolls [Lin et al., 2009]. Während anfangs 1 iPS-Zelle pro 10 000 Ausgangszellen reprogrammiert wurde, gelingt dies bei Standardbedingungen unter Verwendung dieser Substanzen nun bei bis zu 200 iPS-Zellen.

Mittlerweile stehen eine Reihe unterschiedlicher Technologien zu Verfügung, bei denen keine in das Genom inserierenden und damit potentiell Tumor-auslösenden (onkogenen) Vektoren für das Einbringen der Reprogrammierungsfaktoren mehr verwendet werden müssen [Fusaki et al., 2009; Jia et al., 2010; Kim et al., 2009a; Okita et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008; Yu et al., 2009; Zhou et al., 2009]. Zum Einen wurden verschiedene nicht-integrierende Vektoren verwendet, bei denen die neu eingebrachte genetische Information nach der Reprogrammierung verloren geht. Zum anderen wurden die Reprogrammierungsfaktoren direkt als Protein oder als fertige Boten-RNA-Sequenzen, die nur noch in die Proteine umgewandelt werden müssen, in die zu reprogrammierenden Zellen eingeschleust, womit nach der Reprogrammierung ebenfalls keine dauerhaften genetischen Änderungen in den Zellen verursacht werden. Außerdem wurden weitere Moleküle (Z. B. sog. Mikro-RNAs) identifiziert, welche die Reprogrammierungseffizienz deutlich erhöhen und in der Lage sind, einzelne Reprogrammierungsfaktoren zu ersetzen [Judson et al., 2009].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nicht nur humane Hautfibroblasten (Bindegewebszellen der Haut), sondern auch eine ganze Reihe verschiedener Zelltypen, darunter solche mit hoher klinischer Relevanz, wie Zellen des Nabelschnurblutes oder Haarzellen, reprogrammierbar sind [Aasen et al., 2008; Giorgetti et al.; Haase et al., 2009].

Interessant wird es in diesem Zusammenhang sein, zu untersuchen, ob iPS-Zellen aus Patienten fortgeschrittenen Alters die gleiche Qualität aufweisen wie iPS-Zellen, die aus jungen Zellquellen wie Nabelschnurblut generiert wurden. Basierend auf den Beobachtungen, dass sich während des Lebens Fehler (Mutationen) im Erbgut von Körperzellen anhäufen, gilt es als wahrscheinlich, dass eine erhöhte Zahl von Mutationen in iPS-Derivaten älterer Spender vorliegen dürfte. Diese Anhäufung von Mutationen gilt als einer der entscheidenden Gründe für altersbedingte Krebserkrankungen und Funktionsverlust von Organen und könnte zu einer erhöhten Entartungsfrequenz und zu einer verminderten Funktionalität von iPS-Derivaten führen.

Obwohl insbesondere die nicht-viralen Reprogrammierungs-Protokolle noch deutlich optimiert werden müssen, um Effizienzen von wenigstens 10 iPS-Zellen pro 10 000 Ausgangszellen zu liefern, hat sich die Induktion pluripotenter Stammzellen mittlerweile zu einer Standardtechnologie entwickelt, die in vielen Laboren weltweit durchgeführt wird. Im Gegensatz zur Kerntransfer-technologie scheint das Herstellen von iPS-Zellen prinzipiell automatisierbar, weswegen die Aspekte der Effizienzsteigerung für eine standardisierte automatisierte Herstellung von besonderem Interesse sind.

Während die Reprogrammierung muriner Zellen recht leicht zu etablieren und auch in relativ vielen deutschen Laboren verfügbar ist, ist die erfolgreiche Reprogrammierung humaner Zellen stark abhängig von einer ausgehenden Expertise in der Kultur humaner embryonaler Stammzellen. Da derartige Erfahrungen hierzulande nur

in einer sehr begrenzten Zahl von Arbeitsgruppen verfügbar ist, konnten im Berichtszeitraum auch nur von wenigen deutschen Laboren Arbeiten mit humanen iPS-Zellen publiziert werden [Haase et al., 2009; Kim et al., 2009b].

Unklar ist derzeit noch, ob humane iPS-Zellen tatsächlich wie erhofft nahezu identisch mit humanen, embryonalen Stammzellen sind. Für andere Spezies lässt sich dies relativ einfach testen. Beispielsweise für iPS-Zellen der Maus konnte durch einen Pluripotenztest (tetraploide Embryo-Komplementierung), zweifelsfrei gezeigt werden, dass sich bei einer Aggregation von murinen iPS-Zellen mit depotenzierten Mausembryonen ein kompletter Organismus mit dem Erbgut der murinen iPS-Zellen entwickeln kann, d. h., dass die murinen iPS-Zellen tatsächlich pluripotent sind [Boland et al., 2009; Zhao et al., 2009b]. Aufgrund von entwicklungsbiologischen Unterschieden lassen diese Ergebnisse jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf humane Zellen zu. Darüber hinaus sind die genannten Methoden für humane Zellen nicht anwendbar. Deshalb kann das Entwicklungspotential menschlicher Stammzellen nur indirekt mit weniger aussagekräftigen Tests untersucht werden. Da noch nicht vollständig verstanden ist, welche Faktoren für Selbsterneuerung und Entwicklungspotential einer Zelle entscheidend sind, sind weitere Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung verschiedener Typen von Stammzellen unabdingbar (siehe auch 2.3.3).

Während viele humane iPS-Zelllinien sowohl in Bezug auf ihre Genexpression als auch im Hinblick auf Kulturverhalten und Differenzierungscharakteristik kaum von humanen embryonalen Stammzellen zu unterscheiden sind, sind allerdings anscheinend nicht alle als induzierte pluripotente Stammzellen bezeichneten Zelllinien voll reprogrammieren. Zum einen scheint die vollständige Entfernung bzw. das Neuanlegen epigenetischer Modifikationen des genetischen Materials nicht immer ausreichend gut zu gelingen. Zum anderen müssen die Reprogrammierungsfaktoren auch wieder effizient abgeschaltet werden. Werden die Faktoren mittels Viren in die Zellen eingebracht, kann dies durch das oben beschriebene spontane „Silencing“ (siehe 2.3.2) geschehen, was in diesem Fall nach erfolgter Reprogrammierung ein gewünschter Effekt ist.

Klar ist jedenfalls, dass sich verschiedene iPS-Zelllinien genauso wie verschiedene ES-Zelllinien in Bezug auf Kultur- und Differenzierungsverhalten deutlich voneinander unterscheiden. Derzeit wird daran gearbeitet, Testmethoden zu entwickeln, die es erlauben, mit begrenztem Aufwand die für den gewünschten Einsatz geeigneten iPS-Zelllinien zu identifizieren.

Humane iPS-Zellen ermöglichen Forschungsansätze, welche unter Verwendung embryonaler Stammzellen kaum möglich gewesen wären. Zu nennen ist hier vor allem die Generierung und Verwendung von iPS-Zellen aus Patienten mit erblichen Erkrankungen. Es bestehen große Hoffnungen, dass patientenspezifische iPS-Zellen zukünftig die Darstellung komplexer Erkrankungen im Reagenzglas erlauben und damit wichtige Werkzeuge nicht nur bei der Aufklärung von Krankheitsmechanismen,

sondern auch bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und Wirkstoffe darstellen werden [Nishikawa et al., 2008]. So wurden bereits eine ganze Reihe von iPS-Linien von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wie z. B. amyotropher Lateralsklerose [Dimos et al., 2008], Typ 1 Diabetes, Parkinsonscher Erkrankung [Park et al., 2008] oder Spinaler Muskelatrophie [Ebert et al., 2009] generiert und charakterisiert. Derartige Linien werden nun untersucht, um neue Erkenntnisse zu den betreffenden Krankheiten zu gewinnen.

Ob iPS-Zellen tatsächlich generell genauso gut differenzieren wie ES-Zellen, muss erst noch in umfangreichen, vergleichenden Studien gezeigt werden. Auch aus diesem Grund sind in Zukunft weitere Arbeiten mit humanen ES-Zellen notwendig. Gerade durch die Erforschung alternativer Zellen wird es vorerst eher zu einer Zunahme an Forschungsprojekten, in denen hES-Zellen eingesetzt werden, kommen.

#### 2.4.6 Transdifferenzierung

Der Begriff Transdifferenzierung bezeichnet die Differenzierung von (Stamm-)Zellen, die bereits auf eine bestimmte Gewebeart festgelegt sind (Multipotenz) in andere Zelltypen davon verschiedener Gewebe, ohne das Zwischenstadium pluripotenter Zellen zu durchlaufen. Während der Embryonalentwicklung sind solche Transdifferenzierungsvorgänge natürlicherweise bekannt, und scheinen auch bei Erwachsenen bei der Bildung „ortsfremden“ Gewebes, z. B. – von Magen-Epithel in der Speiseröhre (Barret-Syndrom) als Antwort auf eine chronische Reflux-Krankheit, aufzutreten.

Versuche, das Phänomen der Transdifferenzierung klinisch zu nutzen, sind weitgehend verfrüht. Viele verheißungsvolle Berichte, die vor einigen Jahren beispielsweise zur spontanen Transdifferenzierung von Knochenmarkszellen in Herzmuskelzellen nach einer Transplantation publiziert worden waren, konnten molekular- und zellbiologisch nicht belegt werden [Gruh and Martin, 2009], so dass Protagonisten der Internationalen Gesellschaft für Stammzellforschung (ISSCR) die zukünftige Anwendung stammzellbasierter Therapien an einen wissenschaftlichen Anforderungskatalog knüpfen [Weissman, 2009].

In jüngster Zeit erschienen jedoch erste Arbeiten, in denen die Genregulation der Ausgangszellen gezielt durch das Einschleusen von Faktoren, welche spezifisch für den gewünschten Zelltyp sind, verändert wurde. So konnten das Programm und damit die Funktion der Ursprungszellen so umgewandelt werden, dass dabei der gewünschte Zelltyp entstand. Diese Arbeiten wurden insbesondere durch die Erkenntnisse zur Herstellung von iPS-Zellen inspiriert, bei denen ebenfalls die Genregulation durch spezifische Faktoren verändert wird. In vivo (also im lebenden Organismus) gelang es im Mausmodell, Zellen in schlagende Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) umzuwandeln, wenn während der fötalen Entwicklung zwei entscheidende Faktoren zusätzlich eingeschleust werden [Takeuchi and Bruneau, 2009]. Ähnliches wurde in adulten Mäusen für die Bauchspeicheldrüse gezeigt, indem

die Generierung von Insulin-produzierenden Zellen aus anderen Zelltypen der Bauchspeicheldrüse [Zhou et al., 2008] nach Zugabe dreier Faktoren induziert wurde.

In Ergänzung zu diesen in vivo-Experimenten gelang der Arbeitsgruppe von M. Wernig in Stanford darüber hinaus die effiziente In-vitro-Transdifferenzierung von Maus-Bindegewebszellen in Neuronen (publiziert 2010 in Nature, [Vierbuchen et al., 2010]).

Ob sich die gezielte Transdifferenzierung als Forschungsbereich etablieren wird, bleibt abzuwarten. Unklar ist zurzeit, inwieweit solche Arbeiten therapeutische Relevanz haben können, d. h. ob es sinnvoller ist, einen benötigten Zelltyp über Transdifferenzierung herzustellen, oder ob der Umweg über die Induktion pluripotenter Stammzellen und die anschließende gezielte Differenzierung am Ende zielführender ist. Im Hinblick auf die für die meisten Zelltherapien benötigten sehr großen Zellmengen (geschätzt mehr als eine Billion Herzmuskelzellen nach Herzinfarkt oder Insulin-produzierender Zellen bei Diabetes), wäre die Verwendung von Zellen, die aus gut vermehrbaren pluripotenten Stammzellen generiert wurden, die gegenwärtig genauer charakterisierte Option. In Analogie zu den Unterschieden, die bei der Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen in einzelnen Zelllinien gesehen werden, ist aller Voraussicht nach davon auszugehen, dass die direkte Transprogrammierung zu einer Mischung unterschiedlich weit transdifferenzierter Zellen führt. Andererseits wird die Tatsache, dass nach Transplantation transdifferenzierter Zellen keine Teratombildung zu erwarten ist, als Vorteil derartiger Methoden angeführt. Inwieweit in solchen Zellpräparationen allerdings Veränderungen der Chromosomen auftreten und entartete Zellen vorkommen, die zur Tumorbildung führen können, ist bisher nicht detailliert untersucht worden. [Takeuchi and Bruneau, 2009]

### 2.5 Entwicklung von Therapien und Testmethoden mit hES- und hiPS-Zellen

#### 2.5.1 Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen

Hinausgehend über den im letzten Bericht dargestellten Stand der Forschung gab es keine grundlegend neuen Erkenntnisse im Bereich der gezielten Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen. Allerdings gibt es in den unterschiedlichen Gebieten durchaus Detailfortschritte, welche zu einer spezifischeren und effizienteren Differenzierung führten. Hervorzuheben sind hier vor allem verschiedene chemische Substanzen, die für die gezielte Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen in verschiedene Zelltypen nützlich sind. Inspiriert durch die von S. Yamanaka 2006 eingeführte Änderung der Aktivität verschiedener Gene zu Reprogrammierungszwecken, wurden auch Kombinationen von verschiedenen Proteinen mit Einfluss auf die Genaktivität identifiziert, welche für die gezielte und effiziente Differenzierung in verschiedene Zelltypen genutzt werden können. Eingeteilt werden die unterschiedlichen Zelltypen dabei nach Keimblättern, also den Zellschichten des

Embryos, aus denen sich später die verschiedenen Gewebe entwickeln. Aus dem sogenannten Ektoderm entstehen dabei Haut und Nervensystem, aus dem Mesoderm werden z. B. Knochen, Muskulatur und Blutgefäße gebildet, und aus dem Entoderm entwickeln sich u. a. der Verdauungstrakt, die Leber und die Lunge.

#### **Differenzierung von hES-Zellen in neuroektodermale Zellen (Zellen des Nervensystems)**

Unverändert sind umfangreiche Forschungsaktivitäten im Bereich der neuroektodermalen Differenzierung embryonaler Stammzellen zu verzeichnen. Auch wenn embryonale Stammzellen meist vergleichsweise gut in Richtung neuroektodermaler Zelltypen differenzieren, müssen die bestehenden Differenzierungsprotokolle für Neuronen (Nervenzellen) und Begleitzellen kontinuierlich optimiert werden, damit die abgeleiteten Zellen als Ausgangsmaterial für mögliche Therapien in Betracht kommen. Wie bei Zellen anderer Keimblätter werden auch hier Verfahren zur spontanen Differenzierung mit Kulturbedingungen zur gerichteten Differenzierung kombiniert. Unterdessen wurden essentielle Signalwege identifiziert, welche eine hocheffiziente Differenzierung humaner ES-Zellen in neurale Zelltypen erlauben [Chambers et al., 2009]. Auch in Deutschland wurden in diesem Bereich Forschungsarbeiten durchgeführt [Koch et al., 2009].

#### **Differenzierung von hES-Zellen in mesodermale Zellen**

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeiten mit humanen embryonalen Stammzellen ist die Etablierung und Optimierung von Protokollen zur Generierung von mesodermalen Zellderivaten. Von klinischem Interesse sind hier vor allem Zellen der Blutgefäße, Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), welche unter anderem verwendet werden könnten, um z. B. nach einem Herzinfarkt die Funktionalität des Herzmuskels wieder herzustellen, sowie Knochen- und Knorpelzellen. Besonders im Bereich der Kardiomyozytendifferenzierung sind international bemerkenswerte Fortschritte erzielt worden. In Zellen der Maus wurden Faktoren identifiziert, welche derartige Differenzierungen auslösen bzw. verstärken, oder auch hemmen können [David et al., 2008; Takeuchi and Bruneau, 2009; Xu et al., 2008]. Basierend auf dem zeitlich abgestimmten Einsatz von Differenzierungsfaktoren konnten auch Zellkulturprotokolle entwickelt werden, welche eine effiziente kardiale Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen erlauben [Yang et al., 2008]. Allerdings sind derartige Protokolle alles andere als robust, d. h. sie müssen in jedem Labor und für jede Zelllinie neu etabliert bzw. adaptiert werden. Erwähnenswert sind auch Fortschritte, welche in Bezug auf gentechnische und nicht-genetische Methoden zur Anreicherung, bzw. Konzentrierung stammzellabgeleiteter Herzmuskelzellen, also Kardiomyozyten, erzielt worden sind [Hattori et al., 2010; Xu et al., 2009]. So können Kardiomyozyten z. B. über künstlich eingebrachte Antibiotikaresistenzen von weniger ausdifferenzierten Zellen unterschieden und selektiert werden, die von Herzmuskel-spezifischen Kontrollelementen ge-

steuert werden. Eine andere Methode nutzt die Tatsache, dass Mitochondrien, die „Kraftwerke der Zelle“, in Muskelzellen in besonders hoher Zahl vorkommen. Über Färbung der Zellen mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff lassen sich ausdifferenzierte Herzmuskelzellen aus Zellkulturen mit Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien aussortieren und damit anreichern.

#### **Differenzierung von hES-Zellen in entodermale Zellen**

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung von Lungenerkrankungen steht auch die Herstellung von Zelltypen der Lunge aus ES-Zellen zunehmend im Fokus der Forschung. Generell ist dieses Forschungsgebiet allerdings noch stark unterrepräsentiert, und die Differenzierung zu Zellen der Lunge gestaltet sich schwierig bzw. ist bisher noch relativ ineffizient [Mauritz and Martin, 2010]. Die Mehrzahl der bisher publizierten Studien beschäftigt sich noch mit Zellen der Maus. Erst wenige Publikationen sind zu humanen ES-Zellen erschienen [Samadikuchaksaraei et al., 2006; Wang et al., 2007; Wang et al., 2010], diese werden allerdings recht kontrovers diskutiert.

Im dritten Stammzellbericht wurde bereits ausführlich auf die Strategien zur Differenzierung von hES-Zellen in Leber- und Pankreaszellen eingegangen.

Neuere Ergebnisse haben die an der Differenzierung beteiligten Signalwege genauer beleuchtet [Hay et al., 2008], über die eine höhere Effizienz der Differenzierung erreicht werden kann. Einzelne Gruppen berichten von über 75 Prozent Zellen, die sich so in Leber-Vorläuferzellen prägen lassen; andere Gruppen erreichen schwächere Effizienzen im Bereich von ca. 30 Prozent. Basierend auf dem Konzept, während der In-vitro-Differenzierung möglichst viele Aspekte der Embryonalentwicklung zu imitieren, wird angestrebt, einen klar definierten Vorläufer-Zelltyp zu generieren, der sowohl Leber- als auch Gallengangszellen bilden kann [Zhao et al., 2009a]. Dieses Bestreben wird von Untersuchungen unterstützt, in denen niedermolekulare Substanzen (small molecules) zur Prägung sehr früher Keimblatt-spezifischer Stadien entdeckt wurden [Borowiak et al., 2009].

Auch zur Unterstützung der Differenzierung pankreatischer Zellen wurde ein solcher niedermolekularer Wirkstoff (Indolactam) beschrieben [Chen et al., 2009]. Diese beiden Arbeiten zeigen paradigmatisch, dass eine alleinige Modulation der Zellkulturbedingungen mit biologischen Wachstumsfaktoren zur gerichteten Differenzierung von hES-Zellen nur sehr ineffizient zu ausreichend spezialisierten Zellen führt und die Zugabe beispielsweise solcher niedermolekularer Substanzen spezifizierende Effekte hat. Darüber hinaus werden gegenwärtig weitere Konzepte zur direkten Modulation der gewebespezifischen Genaktivitäten entwickelt.

#### **Differenzierung von humanen, pluripotenten Stammzellen in Keimzellen**

Eine Herstellung befruchtungsfähiger Keimzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen ist bisher nicht gelun-

gen. Eine 2009 veröffentlichte Arbeit, die suggerierte, Spermien aus ES-Zellen generiert zu haben, wurde kurz nach ihrem Erscheinen unter anderem wegen Uneinigkeiten der beteiligten Wissenschaftler über die Dateninterpretation wieder zurückgezogen [Nayernia et al., 2009]. Immerhin konnten zwischenzeitlich die Kenntnisse über die initialen Differenzierungsschritte von einer anderen Arbeitsgruppe vertieft werden [Kee et al., 2009], so dass zumindest eine Vorstufe von Keimzellen (haploide Gameten) mittlerweile zuverlässig und reproduzierbar hergestellt werden kann. Auch mit murinen embryonalen Stammzellen konnten zwischenzeitlich verfeinerte Protokolle zur Generierung „primordialer Keimzellen“, also von spezifischen Vorläuferzellen von Keimzellen, erarbeitet werden [Eguizabal et al., 2009].

### 2.5.2 Pharmakologische/Toxikologische Substanztestung und Wirkstoffscreening

Die internationalen und nationalen Rechtsvorschriften für die toxikologische und pharmakologische Bewertung von Substanzen, Umweltchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen erfordern in erheblichem Umfang tierexperimentelle Studien. Sowohl Tierschutzgründe als auch die in der Regel hohen Kosten von Tierversuchen haben bereits zur Entwicklung von Alternativmethoden geführt, die in vielen Fällen auf tierischen oder menschlichen Zellkulturen basieren.

Als gute Beispiele können hier derzeit verfügbare In-vitro-Testmethoden zur toxikologischen und pharmakologischen Charakterisierung inhalativ verabreichter Substanzen oder die Substanztestung in Bezug auf unerwünschte Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem gelten (z. B. der hERG Fluorescence Polarisation Assay, ein kommerziell erhältlicher Test, ob bestimmte Substanzen Herzrhythmusstörungen auslösen können). Während in den letzten Jahren große Fortschritte im Hinblick auf die verwendete Messtechnik und Automatisierbarkeit von Zellkultur-basierten Tests für die Überprüfung von Substanzen erzielt werden konnten, ist die Datenqualität der entwickelten Hochdurchsatz-Testsysteme, insbesondere im Hinblick auf die Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, in vielen Fällen noch weit von tierexperimentellen Daten entfernt [van der Heyden et al., 2008].

Abgesehen von der Tatsache, dass In-vitro-Tests an Zellkulturmodellen keine systemischen Effekte erfassen können und daher nur für bestimmte Fragestellungen geeignet sind, liegt die begrenzte Datenqualität bzw. die mangelhafte Übertragbarkeit auf den Menschen häufig ursächlich im Fehlen geeigneter humaner Zellquellen begründet. Direkt von Patienten gewonnene („primäre“) Zellquellen sind, wenn überhaupt verfügbar, meist schwierig zu isolieren und zu kultivieren. Zudem sind sie oft kaum vermehrbar und nicht standardisiert erhältlich. Die häufig verwendeten transformierten oder von Tumoren abgeleiteten immortalisierten (unsterblich gemachten) humanen Zelllinien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Merkmale und funktionell meist deutlich von ihren Ursprungszellen und verändern sich darüber hinaus in der Regel mit der Kulturdauer. Mit der Isolierung tierischer

Primärzellen versucht man dieses Problem zu umgehen. Jedoch ist, in Abhängigkeit von der verwendeten Spezies, die Übertragbarkeit der erzielbaren Daten auf das humane System vielfach nur begrenzt möglich. Darüber hinaus ist die Isolierung dieser Primärzellen kostenintensiv und erfordert ebenso die Durchführung von Tierversuchen.

Man geht davon aus, dass mit pluripotenten humanen Stammzellen grundsätzlich geeignete Zellquellen zur Verfügung stehen, mit denen mittelfristig in großem Maßstab funktionelle Zellderivate wie z. B. Nerven- oder Herzmuskelzellen für pharmakologische/toxikologische In-vitro-Testung zu Verfügung gestellt werden können. In den nächsten Jahren werden noch beträchtliche Anstrengungen von Nöten sein, um pluripotente Stammzelltechnologien in großem Maßstab für Überprüfungen von Wirkstoffen einschließlich Tests in Bezug auf unerwünschte Nebenwirkungen und die von der EU vorgeschriebene Testung von Chemikalien (REACH) nutzbar zu machen. Entscheidende Hürden, die derzeit weltweit in vielen Arbeitsgruppen schon angegangen werden, betreffen die Vermehrung undifferenzierter Zellen in großem Maßstab, die Optimierung von Differenzierungsprotokollen und deren Anwendung im großen Maßstab, die Anreicherung des gewünschten Zelltyps (z. B. Leberzellen) sowie die Etablierung von Techniken zur Aufbewahrung der Zellen (in flüssigem Stickstoff tiefgefroren). Entscheidend ist es weiterhin zu zeigen, dass die hergestellten Stammzellderivate funktionell vergleichbar mit primären Zellen sind, dass sie in standardisierter Qualität hergestellt werden können, und dass sie im Hochdurchsatz-Verfahren gemessen werden können.

Generell scheinen für die Entwicklung von pharmakologischen oder toxikologischen Testsystemen sowohl embryonale Stammzellen als auch alternative pluripotente Zellquellen wie iPS-Zellen verwendbar zu sein. Im Einzelfall können Patienten-spezifische iPS-Zellen sogar Vorteile gegenüber embryonalen Stammzellen aufweisen. So geht man davon aus, dass Derivate von iPS-Zellen aus Patienten mit bestimmten Gendefekten sensitiver auf unerwünschte Substanznebenwirkungen reagieren als Zellen von gesunden Individuen. Als Beispiel können hier iPS-Zellen von Patienten mit Long-QT-Syndromen (Herzkrankheiten, die zum plötzlichen Herztod führen können) [Priori et al., 2003] gelten, bei denen man davon ausgeht, dass sie sensitiver auf einige die Herzkontraktion beeinträchtigende Substanzen reagieren. Bei der Medikamentenentwicklung könnte somit die Abschätzung der Wirksamkeit bzw. Risiken für Patienten mit spezifischen Erkrankungen verbessert werden.

Es ist davon auszugehen, dass derartige Stammzell-basierte Testsysteme eine wesentlich höhere Datenqualität und bessere Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus gegenüber existierenden In-vitro-Systemen bieten und für manche Fragestellungen in Bezug auf ihre Aussagekraft tierexperimentellen Studien überlegen sein können. Darüber hinaus könnte durch Etablierung von Hochdurchsatzverfahren ein Einsatz stammzellbasierter Testsysteme zur Testung einer großen Zahl verschiedener

Substanzen bereits in frühen Entwicklungsphasen möglich werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Entwicklung stammzellbasierter In-vitro-Testmethoden für Toxikologie und Arzneimittelentwicklung weltweit einen wichtigen Schwerpunkt der Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen darstellt.

### **2.5.3 Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen**

#### **Vorbereitung klinischer Studien**

Bislang existieren keine wissenschaftlich und regulatorisch anerkannten Routine-Therapien mit Derivaten aus humanen ES- oder iPS-Zellen. Gegenüber dem vorherigen 3. Erfahrungsbericht der Bundesregierung befinden sich jedoch deutlich mehr Therapien in der Entwicklung bzw. in der Vorbereitung für klinische Studien. Die Vorhaben einiger amerikanischer Firmen sind dabei bislang am weitesten gediehen.

Die kalifornische Firma Geron bereitet seit Jahren eine klinische Studie mit aus hES-Linien-abgeleiteten Nervenzellen zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen auf Höhe der Brustwirbelsäule vor. Nachdem im Januar 2009 die Zulassung zu einer Phase-I-Studie von der amerikanischen Zulassungsbehörde (FDA) erteilt wurde, zeigten neuerliche Sicherheitsstudien im Tiermodell eine erhöhte Häufigkeit von Zysten-Bildung an der Applikationsstelle. Aus diesem Grund wurde die Studienzulassung im August 2009 ausgesetzt, und Geron etabliert gegenwärtig verbesserte Aufreinigungsstrategien. Am 30. Juli 2010 berichtete Geron, dass die FDA nach erfolgreichen Sicherheits-Analysen die Aussetzung der Studie aufgehoben hat. Zudem waren die bisher verwendeten Zellen im Tierversuch so erfolgreich, dass Geron die für diese Studie entwickelten Zellen auch für Verletzungen der Halswirbel-assoziierten Rückenmarkssegmente ausweiten will. Rückenmarksverletzungen in diesem Bereich führen in der Regel zu wesentlich schwerwiegenderen Lähmungen, weil je nach exakter Höhe der Verletzung eine vollständige Lähmung auch der Arme resultiert.

Interessant ist, dass immer mehr anwendungsorientierte Forschung mit hES-Zellen in Firmen stattfindet. Geron hat neben den oben beschriebenen neuronalen Zellen unter anderem auch hES-Zellen-abgeleitete Kardiomyozyten, Insulin-produzierende Zellen, Knorpelzellen und Osteoblasten hergestellt. Nach dem Zusammenschluss mit GE Healthcare werden von Geron nun auch hES-Zell-basierte zelluläre Testsysteme für pharmako-toxikologische Untersuchungen mit entwickelt.

Die Firma Advanced Cell Technology, Inc. (ACT) bereitet ebenfalls eine Zulassung für die klinische Prüfung von hES-Zell-Derivaten bei der FDA vor. Geplant ist der Einsatz von aus hES-Zellen hergestellten Zellen der Netzhaut zur Behandlung der Makula-Degeneration, einer Augenerkrankung, die zur Erblindung führen kann. In einer 2008 publizierten Studie haben Wissenschaftler von ACT zudem aus hES-Zellen hergestellte rote Blutkörperchen

beschrieben, die allerdings noch zu unreif waren, um für Bluttransfusionen eingesetzt werden zu können [Lu et al., 2008].

Die Firma Novocell, welche die im dritten Stammzellbericht beschriebenen verbesserten Protokolle zur Generierung von Insulin-produzierenden Zellen aus hES-Zellen [Kroon et al., 2008] erarbeitet hat, firmiert zwischenzeitlich unter dem Namen ViaCyte, Inc. Deren Pro-IsletTM-Zellen sollen durch Verkapselung in ein Trägermaterial an der Ausbreitung aus dem Inselzell-Transplantat gehindert werden. Noch unter dem alten Namen Novocell hat die Firma kürzlich eine Phase I/II – Studie abgeschlossen, welche eine erfolgreiche Verwendung verkapselter Inselzellen aus Spenderorganen ohne Langzeit-Immunsuppression bei Typ 1-Diabetikern zeigte. Nach der Neuausrichtung der Firma ist unklar, in wie weit der Ansatz, die Verkapselung auch für Stammzell-abgeleitete Inselzellen einzusetzen, weiter verfolgt wird.

#### **2.5.4 Entwicklung möglicher Stammzell-Therapien in präklinischen Tiermodellen**

Einige weitere therapeutische Anwendungen befinden sich derzeit noch in der präklinischen Phase, wo sie vor dem ersten Einsatz am Menschen zunächst im Tiermodell getestet oder erst entwickelt werden. In einigen präklinischen „proof of concept“- , also Machbarkeits-Studien in Mausmodellen wurden humane embryonale Stammzellen erfolgreich eingesetzt. So differenzierte beispielsweise die Gruppe um Dan Kaufman (Minneapolis, USA) kürzlich bestimmte Zellen des Immunsystems („natural killer cells“, NK-Zellen) aus hES-Zellen und implantierte diese Zellen in ein Mausmodell mit humanen Leukämie-Zellen. Die NK-Zellen vermittelten dabei erfolgreich eine gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort [Woll et al., 2009]. Eine französische Arbeitsgruppe hat Hautzellen (Keratinocyten) aus hES-Zellen generiert, die nach Transplantation in geeignete Empfängermäuse voll funktionsfähige Hautabschnitte bilden konnten [Guenou et al., 2009].

Eine nordamerikanische, tierexperimentelle Studie zur Verhinderung kognitiver Defizite nach Bestrahlung von Hirnregionen verwendete undifferenzierte hES-Zellen. So wurden immundefizienten Ratten zwei Tage nach einer Schädel-Bestrahlung hES-Zellen in eine bestimmte Hirnregion injiziert, woraufhin diese Ratten weniger kognitive Defizite als Kontrolltiere entwickelten [Acharya et al., 2009]. Überraschenderweise konnten noch vier Monate nach der Behandlung hES-Zellen nachgewiesen werden, die sich in Nervenzellen differenziert haben, ohne dass es zur Entstehung von Teratomen oder anderen Tumoren gekommen ist. Dennoch bedarf es noch vielfältiger weiterer Sicherheitsanalysen, bevor an eine humanmedizinische Anwendung zu denken wäre.

Eine Arbeit aus der Gruppe von Lorenz Studer (New York, USA) konnte in einem Mausmodell für den Morbus Parkinson zeigen, dass mittels Kerntransfer generierte, murine nt-ES-Zellen (nuclear transfer ES-Zellen) in Dopamin-bildende Nervenzellen differenziert und ohne im-

munologische Reaktionen transplantiert werden konnten [Tabar et al., 2008].

Der erste „proof of concept“ dafür, dass iPS-Zellen therapeutisch eingesetzt werden können, wurde von Rudolf Jaenisch (Cambridge, USA) in einem Mausmodell der Sichelzellanämie erbracht (siehe auch 3. Stammzellbericht). Eine weitere Arbeit aus dem Labor von Jaenisch konnte zeigen, dass iPS-Zellen der Maus auch im Parkinsonmodell der Ratte eine funktionale Verbesserung bewirken konnten [Wernig et al., 2008]. Allerdings bildeten sich in einigen Tieren Teratome, die wohl auf nicht ausreichend aufgereinigte und mit undifferenzierten Zellen vermischte Zelltransplantate schließen lassen.

Sollen Derivate von iPS-Zellen für die Therapie genetisch bedingter Erkrankungen eingesetzt werden, ist eine effiziente und dauerhafte Korrektur des Gendefekts in den iPS-Zellen notwendig. Aus diesem Grund hat das Forschungsgebiet der iPS-Zellen zwischenzeitlich auch reges Interesse bei Forschern aus dem Bereich der Gentherapie geweckt. Paradigmatisch hierfür ist eine Arbeit, in der iPS-Zellen von Patienten mit Fanconi-Anämie generiert wurden [Raya et al., 2009]. Bei dieser Erkrankung liegt ein Defekt der DNA-Reparaturmechanismen zu Grunde, so dass eine Vielzahl von Zellen schwere genetische Schäden akquiriert, was sich unter anderem in einer massiv eingeschränkten Blutbildung manifestiert. Unter den Autoren der Arbeit waren sowohl Spezialisten für die Gentherapie dieser Erkrankung, als auch Stammzellbiologen (welche die iPS-Zellen generierten), sowie auf dem Gebiet der Blutbildung arbeitende Forscher (welche die genkorrigierten iPS-Zellen in funktionale Blutzellen differenzierten). Auch wenn diese Arbeit noch nicht die Transplantation der Zellen beinhaltet, zeigt sie die Vernetzung von Stammzellforschung und Gentherapie als wegweisend für zukünftige innovative Therapien auf.

### 3 Schlussfolgerungen

Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) ist weiterhin überwiegend eine Domäne der Grundlagenforschung, wenngleich sich zukünftige Anwendungen insbesondere zur Erprobung neuer Medikamente oder Therapieverfahren, sowie zu Zell- und Gewebeersatztherapien im Berichtszeitraum deutlich konkretisiert haben.

So ergeben sich im Bereich der Grundlagenforschung nach wie vor wichtige Fragestellungen zum Verständnis der menschlichen Embryonalentwicklung und der Mechanismen der frühen Differenzierungsschritte. Weiterhin ergeben sich Fragen zu den physiologischen Eigenschaften von hES-Zellen, zur Optimierung von hES-Zell-Kulturbedingungen, zur gezielten gentechnischen Veränderung und zu aussagekräftigen Pluripotenzmarkern bzw. Markern für eine vollständige „naive“ Pluripotenz von hES-Zellen. Zunehmende Bedeutung nehmen auch vergleichende Studien zu alternativen pluripotenten Stammzellen ein. Die hierbei erhofften Fortschritte sind nur parallel mit einem vertieften Verständnis von hES-Zellen zu erzielen. Insbesondere auch für Untersuchungen zur epigenetischen Regulation scheint der direkte Vergleich zwi-

schen vollständig pluripotenten hES-Zellen und nur partiell reprogrammierten Zellen von entscheidender Bedeutung zu sein.

Besonders im Dritten Stammzellbericht war erkennbar, dass sich das Gebiet der Stammzellforschung ausgehend von Erkenntnissen zu hES-Zellen zunehmend diversifiziert hat, insbesondere auch im Bereich der Erschließung neuer Quellen pluripotenter Zellen. Dieser Trend hat sich im Berichtszeitraum fortgesetzt. Die Dynamik des Gebietes zeigt sich jedoch auch darin, dass manche der erst vor einigen Jahren erschlossenen neuen Methoden zur Generierung pluripotenter Stammzellen mittlerweile als wenig vielversprechend bzw. anderen Methoden unterlegen angesehen und daher nicht weiter verfolgt werden. Welcher Zelltypus sich letztendlich als „Goldstandard“ für bestimmte Fragestellungen bzw. Anwendungsgebiete durchsetzen wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht absehbar. Daher wird es weiterhin essentiell sein, die sich gegenseitig ergänzenden Ansätze mit verschiedenen Typen pluripotenter Stammzellen weiterzuverfolgen und miteinander zu vergleichen, um eine maximale Ausnutzung und Weiterentwicklung der bisher generierten Ergebnisse zu gewährleisten.

Insgesamt ist somit die Forschung an hES-Zellen durch die neuen Entwicklungen im Bereich der alternativen Quellen für Stammzellen keinesfalls obsolet geworden. Dies zeigt sich nicht zuletzt auch am ungebrochenen internationalen Interesse an der Forschung mit hES-Zellen: Nach einer jüngst veröffentlichten Studie überstieg die Zahl der in 2009 veröffentlichten Primärpublikationen zu hES-Zellen (387) jene zu humanen iPS-Zellen (hiPS-Zellen, 85) um mehr als das Vierfache, wobei in der Mehrzahl der Publikationen zu hiPS-Zellen auch hES-Zellen verwendet wurden [Löser et al. 2010].

Kurz- und mittelfristig zielen anwendungsbezogene Forschungsvorhaben, in denen hES-Zellen verwendet werden, eher auf Wirkstoff-Screening und pharmakotoxikologische Tests ab, wofür zukünftig auch ggf. krankheitsspezifische iPS-Zellen eine wichtige Bedeutung bekommen könnten. Für Anwendungen als Zelltransplantat in der Regenerativen Medizin hat sich eine Zunahme der Industriegetriebenen Forschungsaktivitäten ergeben, die sich auch in einer gesteigerten Zahl an Studien-Ankündigungen bei der amerikanischen Aufsichtsbehörde FDA widerspiegeln.

Mit der Novellierung des Stammzellgesetzes während dieses Berichtszeitraums und der Einführung eines neuen Stichtags (1. Mai 2007) wurde die hES-Zellforschung in Deutschland auf eine tragfähige Basis gestellt und ist nunmehr international vernetzt möglich und damit international wettbewerbsfähig. Dies zeigt sich auch an der deutlichen Zunahme an Anträgen zum Import von hES-Zellen seit der Stichtagsnovellierung. Ebenfalls von großer Bedeutung ist, dass mit der Novellierung des Stammzellgesetzes Rechtssicherheit bezüglich des Anwendungsbereiches des Stammzellgesetzes allein im Inland hergestellt worden ist. Dies war ein wichtiges positives Signal für die wissenschaftliche Zusammenarbeit im Rahmen von internationalen Forschungskoperationen.

## Glossar

**Adulte (somatische) Stammzellen:** Stammzellen, die auch nach der Geburt (postnatales Stadium) in jedem Organismus vorkommen. Aus diesen Zellen werden neue spezialisierte Zellen gebildet. Sie kommen besonders im Knochenmark, in der Haut, aber auch im Fettgewebe, in der Nabelschnur und im Nabelschnurblut, im Gehirn, der Leber oder der Bauchspeicheldrüse vor. Adulte Stammzellen haben aber im Vergleich zu embryonalen SZ in Zellkulturen ein deutlich geringeres Selbsterneuerungsvermögen und Differenzierungspotential.

**Allogen:** Das zu transplantierende biologische Material wird von einem Spender (Donor) auf einen genetisch nicht identischen Empfänger übertragen, woraus immunologische Abwehrreaktionen resultieren.

**Autolog:** Das zu transplantierende biologische Material stammt vom Empfänger selbst, ist genetisch identisch, und ist daher immunologisch kompatibel.

**Blastozyste:** Frühes Embryonalstadium, das beim Menschen etwa den Zeitraum vom vierten bis siebten Tag nach der Befruchtung umfasst. Die Blastozyste ist bereits in eine innere Zellmasse (Embryoblast), aus der embryonale Stammzellen gewonnen werden können, und eine äußere Zellschicht (Trophoblast) differenziert.

**Chimäre:** Nicht einheitlich verwendeter Begriff für Lebewesen oder Gewebe aus Zellen verschiedener genetischer Abstammung. In der Stammzellforschung hauptsächlich für Mäuse verwendet, die im Embryonalstadium zusätzlich „fremde“ pluripotente Stammzellen injiziert bekommen, die anschließend zur weiteren Entwicklung beitragen.

**Differenzierung:** Prozess, bei dem durch Aktivierung genetischer Programme immer spezialisiertere Zellformen entstehen.

**Dopamin:** Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter und damit ein Signalstoff des Nervensystems, der Informationen von einer Nervenzelle zu anderen Zellen weiterleitet. Dopaminerge Zellen sind Nervenzellen, die Dopamin produzieren.

**Eifollikel:** Kugeliges Eibläschen bestehend aus einem zeitweise mehrschichtigen Epithel, das eine Eizelle umschließt. Dabei werden bei der Reifung von Eizellen spezifische Entwicklungsstadien durchlaufen.

**Embryoblast:** Die innere Zellmasse der Blastozyste.

**Epigenetik/Epigenese:** Die Epigenetik beschäftigt sich mit der Feinregulation der Genexpression. Unter epigenetischer Vererbung wird die Weitergabe von Eigenschaften auf die Nachkommen verstanden, die nicht auf Abweichungen in der DNA-Sequenz zurück gehen, sondern auf eine vererbare Änderung der Genregulation und Genexpression. Epigenetik unterscheidet sich von der Epigenese, welche den seit langem bekannten graduellen Prozess der embryonalen Morphogenese von Organen in all ihrer Komplexität beschreibt. Jedoch basieren die essentiellen zellulären Differenzierungsprozesse der Epigenese

vor allem auf epigenetischen Vererbungsmechanismen einer Zellgeneration zur nächsten.

**ES-Zellen:** Embryonale Stammzellen (ES) sind *in vivo* und *in vitro* in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) sowie in Zellen der Keimbahn auszudifferenzieren. Sie werden daher als pluripotent bezeichnet.

**Feederzellen:** Nähr- oder Helferzellen, die gemeinsam mit pluripotenten Stammzellen kultiviert werden. Bei hES-Zellen werden hierzu speziell behandelte embryonale Fibroblasten (Maus oder Mensch) eingesetzt.

**hESZ:** humane (menschliche) embryonale Stammzellen

**in vitro:** (lateinisch, im Glas) Vorgänge, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden, im Gegensatz zu solchen, die im lebenden Organismus (*in vivo*) ablaufen

**iPS, induzierte pluripotente Stammzellen:** Zellen, die durch Dedifferenzierung (Reprogrammierung) somatischer Zellen entstanden sind und Eigenschaften pluripotenter Stammzellen aufweisen. In differenzierte Körperzellen werden hierbei Gene eingeschleust, die das embryonale Programm in der Zelle wieder anschalten und so Stammzeleigenschaften induzieren.

**Keimblätter:** Dreidimensionale Zellkonglomerate (oder Zellschichten) in der frühen Embryonalentwicklung, die den Ursprung für definierte, in späteren Entwicklungsphasen gebildete Gewebe und Organsysteme darstellen, unterschieden nach:

**Entoderm** (auch: Endoderm): (Innenschicht) Zellen, aus denen neben dem Verdauungstrakt auch Leber und Bauchspeicheldrüse entstehen.

**Mesoderm:** (Mittelschicht) Aus dieser Zellschicht entstehen unter anderem Blut, Herz, Muskulatur und Skelett.

**Ektoderm:** (Außenschicht) Keimblatt, aus dem sich Haut und Nervensystem entwickeln.

**Plastizität:** Bezeichnet die Fähigkeit von Zellen sich auch in Zellen anderer Gewebe entwickeln zu können.

**Potenzial:** Entwicklungsmöglichkeiten einer Zelle, unterschieden nach:

totipotent (oder omnipotent): Aus der Zelle kann sich ein vollständiges Lebewesen entwickeln (bei menschlichen Embryonen nach derzeitigem Kenntnisstand jede Zelle bis längstens zum Achtzellstadium).

pluripotent: Aus der Zelle kann sich jeder Zelltyp des Organismus entwickeln, jedoch kein vollständiges Lebewesen. Embryonale Stammzellen können die dafür erforderliche Plazenta, die aus dem Trophoblast der Blastozyste entsteht, nicht bilden und sind daher pluripotent.

multipotent: Das Entwicklungspotenzial der Zelle beschränkt sich z. B. auf nur einige Zelltypen, die z. B. aus einem der Keimblätter hervorgehen.

**Proliferation:** Zellteilung zur Vermehrung von Geweben bei Wundheilung und Regeneration und zum Ersatz verbrauchter Zellen

**Reprogrammierung:** Oberbegriff für die Umwandlung einer Zelle in einen anderen Zelltypen durch Änderung der Genexpression. Als Reprogrammierung im Zusammenhang mit der Gewinnung von Stammzellen wird vor allem die Rückversetzung somatischer Zellen in einen frühembryonalen, pluripotenten bzw. pluripotenzähnlichen Zustand bezeichnet.

**SNCT (SNT), somatic cell nuclear transfer:** Ist der Transfer eines Zellkerns aus einer Körperzelle (somatische Zelle) in eine „entkernte“ Eizelle. Der entstandene Zellklon kann anschließend für wissenschaftliche Zwecke (z. B. Zellkulturen) oder in der regenerativen Medizin eingesetzt werden (therapeutisches Klonen). Dieser Klon kann jedoch auch der erste Schritt zum reproduktiven Klonen sein.

**Stammzelle (SZ):** Zelle, die sich vermehren und in mehrere Zelltypen ausdifferenzieren kann, unterschieden nach:

**embryonal:** Diese Stammzellen bilden die innere Zellmasse (Embryoblast) der Blastozyste. **somatisch/adult:** Stammzellen von fötalen (d. h. allen vorgeburtlichen Ent-

wicklungsstadien mit abgeschlossener Entwicklung von Organanlagen) und geborenen Lebewesen.

**Teratom** (von griech. teras, teratos „Schreckbild, Ungeheuer“ und -om „Geschwulst, Schwellung“): Durch Entwicklungsstörungen entstandener, oft organähnlicher Misch tumor, der aus verschiedenen Gewebearten besteht.

**Transdifferenzierung:** Entwicklung, bei der eine Zelle neue Funktionen übernimmt, die normalerweise einem anderen Zelltyp eigen sind, z. B. in Zellen, die von einem Keimblatt abstammen.

**Trophoblast:** Die äußere Zellschicht der Blastozyste.

**xenogen-freie Stammzellen:** Humane embryonale Stammzelllinien, die frei von tierischen Zellen, Seren, Enzymen und sonstigen tierischen Substanzen isoliert, abgeleitet und kultiviert wurden

#### **Ausgewählte Internetadressen**

[http://www.rki.de/cln\\_178/nn\\_196928/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register\\_\\_node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_178/nn_196928/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register__node.html?__nnn=true)

**Ausgewählte Internetadressen:**

Erster Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes vom 11. 01. 2004: <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/15/036/1503639.pdf>

Zweiter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes vom 11. 01. 2007: <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/16/040/1604050.pdf>

Dritter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes vom 07.05.2009: <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/16/129/1612956.pdf>

UK Stem Cell Bank: <http://www.ukstemcellbank.org.uk/> und <http://www.mrc.ac.uk/consumption/groups/public/documents/content/mrc003259.pdf>

Singapore Stem Cell Bank: <http://www.sccc.a-star.edu.sg/stemCellBank.php>

National Stem Cell Bank (NSCB): <http://nationalstemcellbank.com/>

NIH-Register: <http://stemcells.nih.gov/research/registry>

International Stem Cell Forum: [http://www.stemcellforum.org/isci\\_project/the\\_registry.cfm](http://www.stemcellforum.org/isci_project/the_registry.cfm)

Australian Stem Cell Centre (ASCC): <http://www.stemcellcentre.edu.au/default.aspx>

European Human Embryonic Stem Cell Registry: <http://hescreg.charite.de/typo3/>

**Zitierte Literatur**

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276–1284.
- Acharya, M. M., Christie, L. A., Lan, M. L., Donovan, P. J., Cotman, C. W., Fike, J. R., and Limoli, C. L. (2009). Rescue of radiation-induced cognitive impairment through cranial transplantation of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19150–19155.
- Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B. W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., et al. (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6, e1000029.
- Andrews, P. W., Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803–816.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M. A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461, 1292–1295.
- Boland, M. J., Hazen, J. L., Nazor, K. L., Rodriguez, A. R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., and Baldwin, K.K. (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461, 91–94.
- Borowiak, M., Maehr, R., Chen, S., Chen, A. E., Tang, W., Fox, J. L., Schreiber, S. L., and Melton, D. A. (2009). Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 348–358.
- Braam, S. R., Tertoolen, L., van de Stolpe, A., Meyer, T., Passier, R., and Mummery, C. L. (2010). Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 4, 107–116.
- Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195.
- Byrne, J. A., Pedersen, D. A., Clepper, L. L., Nelson, M., Sanger, W. G., Gokhale, S., Wolf, D. P., and Mitalipov, S. M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497–502.
- Cathomen, T., and Jung, J. K. (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* 16, 1200–1207.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275–280.
- Chen, S., Borowiak, M., Fox, J. L., Maehr, R., Osafune, K., Davidow, L., Lam, K., Peng, L. F., Schreiber, S. L., Rubin, L. L., et al. (2009). A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 5, 258–265.
- Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.
- Chung, Y., Bishop, C. E., Treff, N. R., Walker, S. J., Sandler, V. M., Becker, S., Klimanskaya, I., Wun, W. S., Dunn, R., Hall, R. M., et al. (2009). Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. *Cloning Stem Cells* 11, 213–223.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S. J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., et al. (2008). Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2, 113–117.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Buhning, H. J., Mattheus, U., Mack, A., et al. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344–349.
- David, R., Brenner, C., Stieber, J., Schwarz, F., Brunner, S., Vollmer, M., Mentele, E., Muller-Hocker, J., Kitajima, S., Lickert, H., et al. (2008). MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol* 10, 338–345.
- de Fried, E. P., Ross, P., Zang, G., Divita, A., Cunniff, K., Denaday, F., Salamone, D., Kiessling, A., and Cibelli, J. (2008). Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 89, 943–947.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221.
- Dinger, T. C., Eckardt, S., Choi, S. W., Camarero, G., Kurosaka, S., Hornich, V., McLaughlin, K. J., and Muller, A. M. (2008). Androgenetic embryonic stem cells form neural progenitor cells in vivo and in vitro. *Stem Cells* 26, 1474–1483.
- Doi, A., Park, I. H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M. J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., et al. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41, 1350–1353.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., and Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280.

- Editorial, N.N. (2009). Breakthrough of the year. Areas to watch. *Science* 326, 1606.
- Eguizabal, C., Shovlin, T.C., Durcova-Hills, G., Surani, A., and McLaren, A. (2009). Generation of primordial germ cells from pluripotent stem cells. *Differentiation* 78, 116–123.
- Forsyth, N. R., Kay, A., Hampson, K., Downing, A., Talbot, R., and McWhir, J. (2008). Transcriptome alterations due to physiological normoxic (2% O<sub>2</sub>) culture of human embryonic stem cells. *Regen Med* 3, 817–833.
- French, A. J., Adams, C. A., Anderson, L. S., Kitchen, J. R., Hughes, M. R., and Wood, S. H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 26, 485–493.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348–362.
- Gallicano, G. I., Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., Destefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rome, J. D., Haddad, B. R., and Dym, M. (2009). Pluripotent Stem Cells Derived from Adult Human Testes. *Stem Cells Dev.*
- Geens, M., Mateizel, I., Sermon, K., De Rycke, M., Spits, C., Cauffman, G., Devroey, P., Tournaye, H., Liebaers, I., and Van de Velde, H. (2009). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Hum Reprod* 24, 2709–2717.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodriguez-Piza, I., Vassena, R., Raya, A., Boue, S., Barrero, M. J., Corbella, B. A., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 5, 353–357.
- Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., DeStefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rone, J. D., Haddad, B. R., Gallicano, G. I., and Dym, M. (2009). Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev* 18, 1115–1126.
- Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J. Y., Han, D. W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sternecker, J., Tesar, P., et al. (2010). Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 215–226.
- Gruh, I., and Martin, U. (2009). Transdifferentiation of stem cells: a critical view. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114, 73–106.
- Guan, K., Wagner, S., Unsold, B., Maier, L. S., Kaiser, D., Hemmerlein, B., Nayernia, K., Engel, W., and Hasenfuss, G. (2007). Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 100, 1615–1625.
- Guan, K., Wolf, F., Becker, A., Engel, W., Nayernia, K., and Hasenfuss, G. (2009). Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat Protoc* 4, 143–154.
- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C. C., Bernard, F. X., Peschanski, M., et al. (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745–1753.
- Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R., Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5, 434–441.
- Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y. S., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., et al. (2010). Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 7, 61–66.
- Hay, D. C., Fletcher, J., Payne, C., Terrace, J. D., Gallagher, R. C., Snoeys, J., Black, J. R., Wojtacha, D., Samuel, K., Hannoun, Z., et al. (2008). Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12301–12306.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKelver, R. C., Katibah, G. E., Amora, R., Boydston, E. A., Zeitler, B., et al. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27, 851–857.
- Irion, S., Luche, H., Gadue, P., Fehling, H. J., Kennedy, M., and Keller, G. (2007). Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1477–1482.
- Isacson, O. (2009). Cell therapy ahead for Parkinson's disease. *Science* 326, 1060.
- Jia, F., Wilson, K. D., Sun, N., Gupta, D. M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N. J., Chen, Z. Y., Robbins, R. C., Kay, M. A., et al. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPSC cells. *Nat Methods* 7, 197–199.
- Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M., and Blelloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27, 459–461.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G.M., and Belmonte, J. C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144.
- Kee, K., Angeles, V. T., Flores, M., Nguyen, H. N., and Reijo Pera, R. A. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462, 222–225.
- Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., Ko, S., Yang, E., Cha, K. Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.

- Kim, J. B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M. J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H. R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–643.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481–485.
- Ko, K., Arauzo-Bravo, M. J., Tapia, N., Kim, J., Lin, Q., Bernemann, C., Han, D. W., Gentile, L., Reinhardt, P., Greber, B., et al. (2010). Human adult germline stem cells in question. *Nature* 465, E1; discussion E3.
- Ko, K., Tapia, N., Wu, G., Kim, J. B., Arauzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Glaser, T., Ruau, D., Han, D. W., Greber, B., et al. (2009). Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5, 87–96.
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J., and Brustle, O. (2009). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3225–3230.
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N. G., Cunningham, J., et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443–452.
- Li, J., Liu, X., Wang, H., Zhang, S., Liu, F., Wang, X., and Wang, Y. (2009). Human embryos derived by somatic cell nuclear transfer using an alternative enucleation approach. *Cloning Stem Cells* 11, 39–50.
- Lin, T., Ambasadhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H. S., Hao, E., Hayek, A., et al. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6, 805–808.
- Löser, P., Schirm, J., Guhr, A., Wobus, A. M., and Kurtz, A. (2010). Human embryonic stem cell lines and their use in international research. *Stem Cells* 28, 240–246.
- Loya, K., Eggenschwiler, R., Ko, K., Sgodda, M., Andre, F., Bleidissel, M., Scholer, H. R., and Cantz, T. (2009). Hepatic differentiation of pluripotent stem cells. *Biol Chem* 390, 1047–1055.
- Lu, S. J., Feng, Q., Park, J. S., Vida, L., Lee, B. S., Strausbauch, M., Wettstein, P. J., Honig, G. R., and Lanza, R. (2008). Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 112, 4475–4484.
- Ma, Y., Ramezani, A., Lewis, R., Hawley, R. G., and Thomson, J. A. (2003). High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 21, 111–117.
- Mauritz, C., and Martin, U. (2010). Embryonic Stem Cells: Differentiation into Respiratory Cell Derivatives. In *Stem cells: organogenesis and cancer*, in press, S. R. Singh, ed. (Research Signpost).
- Mendez, I., Vinuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q., et al. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* 14, 507–509.
- Nayernia, K., Lee, J. H., Lako, M., Armstrong, L., Herbert, M., Li, M., Engel, W., Elliott, D., Stojkovic, M., Parrington, J., et al. (2009). RETRACTION – In Vitro Derivation of Human Sperm from Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*.
- Nishikawa, S., Goldstein, R. A., and Nierras, C. R. (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 725–729.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- Olmer, R., Haase, A., Merkert, S., Cui, W., Palecek, J., Ran, C., Kirschning, A., Scheper, T., Glage, S., Miller, K., et al. (2010). Long term expansion of undifferentiated human iPSC and ES cells in suspension culture using a defined medium. *Stem Cell Res* 5, 51–64.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R. J., Fitz-Gerald, C. S., Sato, Y., Cowan, C. A., Chien, K. R., and Melton, D. A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26, 313–315.
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886.
- Priori, S. G., Schwartz, P. J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., et al. (2003). Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 348, 1866–1874.
- Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53–59.
- Ruby, K. M., and Zheng, B. (2009). Gene targeting in a HUES line of human embryonic stem cells via electroporation. *Stem Cells* 27, 1496–1506.
- Samadikuchaksaraei, A., Cohen, S., Isaac, K., Rippon, H. J., Polak, J. M., Bielby, R. C., and Bishop, A. E. (2006). Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 12, 867–875.
- Schwanke, K., Mueller, S., Merkert, S., Martin, U., and Zweigerdt, R. (2010). Efficient multi-genetic modification of human iPSC and ES cells for cardiomyocyte enrichment and tracking. In *International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 8th Annual Meeting (Moscone West, San Francisco, CA, USA, ISSCR)*, pp. 41 #P 46.

- Shi, Y., Desponts, C., Do, J. T., Hahm, H. S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008a). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 3, 568–574.
- Shi, Y., Do, J. T., Desponts, C., Hahm, H. S., Scholer, H. R., and Ding, S. (2008b). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 525–528.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Streckfuss-Bomeke, K., Vlasov, A., Hulsmann, S., Yin, D., Nayernia, K., Engel, W., Hasenfuss, G., and Guan, K. (2009). Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. *Stem Cell Res* 2, 139–154.
- Tabar, V., Tomishima, M., Panagiotakos, G., Wakayama, S., Menon, J., Chan, B., Mizutani, E., Al-Shamy, G., Ohta, H., Wakayama, T., et al. (2008). Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice. *Nat Med* 14, 379–381.
- Takeuchi, J. K., and Bruneau, B. G. (2009). Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459, 708–711.
- Turnpenny, L., Spalluto, C. M., Perrett, R. M., O'Shea, M., Hanley, K. P., Cameron, I. T., Wilson, D. I., and Hanley, N.A. (2006). Evaluating human embryonic germ cells: concord and conflict as pluripotent stem cells. *Stem Cells* 24, 212–220.
- Utikal, J., Polo, J. M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R. M., Khalil, A., Rheinwald, J. G., and Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145–1148.
- van der Heyden, M. A., Smits, M. E., and Vos, M. A. (2008). Drugs and trafficking of ion channels: a new pro-arrhythmic threat on the horizon? *Br J Pharmacol* 153, 406–409.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041.
- Wang, D., Haviland, D. L., Burns, A. R., Zsigmond, E., and Wetsel, R. A. (2007). A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4449–4454.
- Wang, D., Morales, J. E., Calame, D. G., Alcorn, J. L., and Wetsel, R. A. (2010). Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. *Mol Ther* 18, 625–634.
- Weissman, I. (2009). The ISSCR: who are we and where are we going? *Cell Stem Cell* 5, 151–153.
- Wernig, M., Zhao, J. P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5856–5861.
- Woll, P. S., Grzywacz, B., Tian, X., Marcus, R. K., Knorr, D. A., Verneris, M. R., and Kaufman, D. S. (2009). Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood* 113, 6094–6101.
- Xia, X., Zhang, Y., Zieth, C. R., and Zhang, S. C. (2007). Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev* 16, 167–176.
- Xu, X. Q., Graichen, R., Soo, S. Y., Balakrishnan, T., Bte Rahmat, S. N., Sieh, S., Tham, S. C., Freund, C., Moore, J., Mummery, C., et al. (2008). Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation*.
- Xu, X. Q., Soo, S. Y., Sun, W., and Zweigerdt, R. (2009). Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 2163–2174.
- Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G. W., Linden, R. M., et al. (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453, 524–528.
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519–523.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.
- Zhao, D., Chen, S., Cai, J., Guo, Y., Song, Z., Che, J., Liu, C., Wu, C., Ding, M., and Deng, H. (2009a). Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 4, e6468.
- Zhao, X. Y., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C. L., Ma, Q. W., Wang, L., et al. (2009b). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461, 86–90.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627–632.

Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruett-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B. K., Chen, G., Ye, Z., Park, I. H., Daley, G. Q., et al. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 97–110.