

Unterrichtung

durch die Bundesregierung

Sechster Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-----------|
| 1 Prüfung und Genehmigung von Anträgen auf Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen zu Forschungszwecken | 3 |
| 1.1. Berichtsauftrag und Berichtszeitraum..... | 3 |
| 1.2. Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren..... | 3 |
| 1.3. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 4 StZG..... | 9 |
| 1.4. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG..... | 10 |
| 1.5. Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung..... | 15 |
| 2 Stand der Forschung mit pluripotenten menschlichen Stammzellen..... | 16 |
| 2.1. Einleitung..... | 16 |
| 2.2. Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien | 16 |
| 2.3. Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen..... | 17 |
| 2.3.1. Erkenntnisse aus dem Vergleich von hES- und Maus-ES-Zellen und bestimmende Merkmale pluripotenter Stammzellen..... | 17 |
| 2.3.2. Unterschiede zwischen verschiedenen hES-Zelllinien | 18 |

| | Seite |
|--|-----------|
| 2.3.3. Genetische Abnormitäten in embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen..... | 18 |
| 2.3.4. Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen..... | 20 |
| 2.4. Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen | 20 |
| 2.4.1. Kerntransfer-Verfahren..... | 20 |
| 2.4.2. Gewinnung von Stammzellen ausgehend von Keimzellen und deren Vorläuferzellen..... | 21 |
| 2.4.3. Fötale Stammzellen..... | 21 |
| 2.4.4. Fortschritte in der Reprogrammierung von Körperzellen | 21 |
| 2.4.5. Transdifferenzierung und Transprogrammierung | 22 |
| 2.5. Entwicklung von Therapien und Testmethoden mit hES- und hiPS-Zellen | 23 |
| 2.5.1. Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen | 23 |
| 2.5.2. Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen | 25 |
| 2.5.3. Pharmakologische / Toxikologische Substanztestung & Wirkstoffscreening..... | 25 |
| 2.5.4. Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen | 26 |
| 3 Schlussfolgerungen | 28 |
| 4 Glossar | 29 |
| Ausgewählte Internetadressen..... | 30 |
| 5 Zitierte Literatur..... | 31 |

1 Prüfung und Genehmigung von Anträgen auf Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen zu Forschungszwecken

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 Strukturreform des Gebührenrechts des Bundes vom 7. August 2013 (BGBl. I S. 3154). Er umfasst den Zeitraum vom 1. Januar 2012 bis zum 31. Dezember 2013 (sechster Berichtszeitraum).

1.2. Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren

1.2.1. Überblick über die im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Im vorangegangenen Berichtszeitraum (1. Januar 2010 bis 31. Dezember 2011; fünfter Berichtszeitraum) waren im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten 20 Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und/oder Verwendung humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) genehmigt worden. Für einen weiteren Antrag, der in diesem Zeitraum gestellt wurde, war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2011 noch nicht abgeschlossen.

Im aktuellen Berichtszeitraum (1. Januar 2012 bis 31. Dezember 2013) wurden im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten 19 Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und Verwendung bzw. Genehmigung der Verwendung von hES-Zellen gemäß § 6 StZG an das Robert Koch-Institut (RKI) als zuständige Genehmigungsbehörde gestellt. Ferner war ein Antrag aus dem vierten Berichtszeitraum anhängig. 18 dieser insgesamt 20 Anträge wurden im Berichtszeitraum genehmigt, wobei für einen Antrag aufgrund der gemeinsamen Antragstellung durch zwei Wissenschaftlerinnen zwei getrennte identische Genehmigungen erteilt wurden. Insgesamt ergingen im aktuellen Berichtszeitraum folglich 19 Genehmigungen nach dem Stammzellgesetz. Zu zwei Anträgen war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2013 noch nicht abgeschlossen. Zwei Anträge aus dem fünften Berichtszeitraum und ein Antrag aus dem vierten Berichtszeitraum, deren Bearbeitung auf Wunsch der Antragsteller bis auf weiteres ausgesetzt worden war, wurden im sechsten Berichtszeitraum von den Antragstellern zurückgenommen.

Die im Berichtszeitraum erteilten 19 Genehmigungen für neue, eigenständige Vorhaben ergingen an 18 Personen bzw. Institutionen, von denen fünf bereits im Besitz wenigstens einer zuvor erteilten Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen waren. 13 Personen bzw. Institutionen erhielten folglich erstmals eine Genehmigung nach dem StZG; an einigen Institutionen ist weiterhin mehr als eine Forschergruppe mit hES-Zell-Forschung befasst.

Insgesamt wurden vom Inkrafttreten des StZG im Juli 2002 bis zum Ende des Berichtszeitraumes 88 Genehmigungen für die Einfuhr und/oder Verwendung von hES-Zellen an 68 natürliche bzw. juristische Personen erteilt. Ein im Jahr 2006 genehmigtes Vorhaben war bereits im fünften Berichtszeitraum zum Abschluss gebracht worden, ein weiteres wurde im sechsten Berichtszeitraum beendet. Die entsprechenden Genehmigungen nach dem StZG sind folglich erloschen. Am Ende des Berichtszeitraumes bestanden somit Genehmigungen für die Durchführung von 86 Forschungsvorhaben unter Verwendung von hES-Zellen, die teilweise mehrfach erweitert wurden, für insgesamt 67 Arbeitsgruppen, die an 45 Einrichtungen (Universitäten bzw. Universitätsklinik, Forschungsinstitutionen, Unternehmen etc.) tätig sind.

Für mehrere bereits genehmigte Vorhaben wurden die Genehmigungen im Berichtszeitraum erweitert. In drei Fällen wurden zusätzliche experimentelle Arbeiten an hES-Zellen beantragt, die thematisch zwar nahe an den bislang genehmigten Verwendungen von hES-Zellen lagen, jedoch über die zuvor 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. Für 11 genehmigte Projekte wurde die Einfuhr weiterer hES-Zell-Linien beantragt und genehmigt, die zusätzlich zu hES-Zellen, deren Import bereits genehmigt war, für bereits genehmigte Zwecke verwendet werden sollen. Die Einträge im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des RKI wurden für die entsprechenden Genehmigungen jeweils angepasst.

1.2.2. Angaben zu den im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Bis zum 31. Dezember 2011 (Ende des fünften Berichtszeitraumes) waren 69 Genehmigungen nach dem StZG erteilt worden.

Die insgesamt 70. Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen erging am 2. Februar 2012 an Herrn Prof. Dr. Axel Methner, Universitätsklinikum Düsseldorf. Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten soll mittels von aus hES-Zellen differenzierten Motoneuronen ein Zellmodell für die erblich bedingte Polyneuropathie Charot-Marie-Tooth Type 4a (CMT4A) entwickelt werden. Insbesondere soll untersucht werden, ob und auf welche Art und Weise eine Mutation bzw. eine verringerte Expression des Gens für GDAP1 (ganglioside-induced differentiation associated protein 1) in neuronalen Zellen zu oxidativem Stress führt, welche Konsequenzen dies für den Glutathion-Stoffwechsel der Zelle sowie für die Aktivität der Mitochondrien hat und ob und inwieweit ein verminderter Schutz vor oxidativem Stress für die Pathogenese dieser Erkrankung maßgeblich ist. Die Arbeiten sollen teils vergleichend zwischen hES- und humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) durchgeführt werden. Die genehmigten Forschungsarbeiten können zum einen für die Grundlagenforschung wesentliche neue Erkenntnisse über die Funktion von GDAP1 in menschlichen Motoneuronen erbringen, zum anderen können sie ggf. zur Aufklärung des Pathogenesemechanismus von CMT4A beitragen. An dem angestrebten Zellmodell für CMT4A könnten auch weitere für CMT4A typische zelluläre Prozesse untersucht und ggf. Substanzen zur Behandlung dieser Krankheit identifiziert und bezüglich ihrer molekularen Wirkmechanismen untersucht werden.

Die 71. Genehmigung wurde am 3. Mai 2012 an Frau Dr. Suzanne Kadereit, damals Universität Konstanz, jetzt FH Sigmaringen, erteilt. Gegenstand des Forschungsvorhabens ist die Untersuchung des Einflusses verschiedener Typen ionisierender Strahlung auf hES-Zellen und deren frühe Differenzierung. Dabei soll u. a. der Einfluss der Strahlung auf die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit, die genetische Stabilität, die Zellzyklus-Progression, das Genexpressionsprofil sowie das frühe Differenzierungsvermögen von hES-Zellen untersucht werden. Zudem sollen Zellen mit hochsensitiven Methoden hinsichtlich möglicher strahleninduzierter DNA-Schäden analysiert und mögliche Konsequenzen einer Strahlenexposition, insbesondere für aus hES-Zellen differenzierte kardiale Zellen und neurale Vorläuferzellen, bestimmt werden. Aus dem Forschungsvorhaben werden u. a. Erkenntnisse über die Wirkung von Strahlung auf frühe menschliche Zellen und über Mechanismen der Reparatur von Strahlenschäden in diesen Zellen erwartet, was ggf. zu einer verbesserten Abschätzung von Strahlenrisiken für den sich entwickelnden Embryo – beispielsweise infolge berufsbedingter Strahlenexposition der Mütter oder im Zusammenhang mit medizinischen Untersuchungen – führen kann.

Die 72. Genehmigung erging am 17. Juli 2012 an Frau Dr. Claus, Universität Leipzig. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens soll ein Zellmodell für die Untersuchung der Auswirkungen einer Infektion mit Rötelnvirus (Rubella-Virus, RV) auf sich differenzierende menschliche Zellen entwickelt werden. So sollen u. a. die Auswirkungen einer RV-Infektion auf die metabolischen Eigenschaften von hES-Zellen, auf deren Mitochondrienfunktion sowie auf ihre Differenzierungsfähigkeit bestimmt werden. Hintergrund ist das hohe teratogene Potenzial von RV, dessen molekulare Grundlagen bislang wenig verstanden sind. Insbesondere soll ein möglicher Zusammenhang zwischen einer RV-Infektion und einer veränderten Mitochondrienfunktion in frühen embryonalen Zellen des Menschen überprüft und damit ein Beitrag zur Aufklärung der zellbiologischen Grundlagen der RV-induzierten Teratogenität geleistet werden.

Inhaber der am 16. August 2012 erteilten 73. Genehmigung ist Herr Dr. Prigione, der am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, tätig ist. hES-Zellen sollen in diesem Forschungsvorhaben zunächst verwendet werden, um vergleichende Untersuchungen zwischen den Mitochondrien von hiPS-Zellen und hES-Zellen durchzuführen und zu überprüfen, ob bei der Reprogrammierung somatischer Zellen zu hiPS-Zellen eine vollständige Reprogrammierung auch der Mitochondrien in ein quasi-embryonales Stadium erfolgt. Dabei soll u. a. der Einfluss der Reprogrammierungsmethode auf die mitochondriale DNA, auf den Energiestoffwechsel sowie auf das mitochondriale Metabolom und Transkriptom der jeweiligen Zellen untersucht werden. Ferner sollen in diesem Vorhaben hiPS-Zellen aus Zellen von Patienten hergestellt werden, die an teils schweren Erkrankungen leiden, die durch Mutationen im Mitochondriengenom verursacht werden bzw. auf funktionalen mitochondrialen Defekten beruhen. Ziel dieser Arbeiten ist die Entwicklung von Zellmodellen für derartige Erkrankungen. hES-Zellen dienen hier für Vergleichszwecke zur Bestimmung der für Pluripotenz maßgeblichen Eigenschaften der jeweils gewonnenen hiPS-Zellen. Die Zellmodelle sollen dann genutzt werden, um Aussagen über Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei den entsprechenden Erkrankungen treffen zu können und ggf. die Bedeutung bestimmter Mutationen im Mitochondriengenom für die Differenzierungsfähigkeit pluripotenter Zellen in spezifische Zelltypen einschätzen zu können.

Die 74. Genehmigung erging am 31. Oktober 2012 an die Medizinische Hochschule Hannover. Die Forschungsarbeiten haben vergleichende Untersuchungen der Glykosylierungsmuster in sich neuroektodermal differenzierenden hES- und hiPS-Zellen zum Inhalt. Nach Differenzierung beider Zelltypen in die neuroektodermale Linie sollen mögliche Veränderungen im Glykom der Zellen sowie in der Expression von Genen analysiert werden, deren Produkte an Glykosylierungsprozessen beteiligt sind. Ferner soll – im Vergleich mit hES-Zellen – an einem auf hiPS-Zellen basierenden zellulären Krankheitsmodell für eine erblich bedingte Erkrankung der Glykosylierung (congenital disorder of glycosylation Ia, CDG-Ia) untersucht werden, welche Auswirkungen der für die Erkrankung ursächliche genetische Defekt auf molekularer Ebene hat und welche Stoffwechsel- bzw. Signalübertragungswege bei CDG-Ia verändert sind. Aus dem Forschungsvorhaben werden u. a. Erkenntnisse über Glykosylierungsprozesse in hES- und hiPS-Zellen sowie über Prozesse erwartet, die während der neuralen Differenzierung auf der Ebene der Glykosylierung von Proteinen ablaufen. Die Forschungsarbeiten sollen ferner dazu beitragen, die zellbiologischen und molekularen Ursachen von CDG-Ia besser als bislang zu verstehen, was Grundlage für neue Therapiekonzepte sein kann.

Die 75. Genehmigung wurde am 28. Februar 2013 an Herrn Prof. Dr. Zenke, RWTH Aachen, erteilt. Das Forschungsvorhaben beschäftigt sich insbesondere mit der Etablierung von Zellmodellen für myeloproliferative Neoplasien (MPN), eine Gruppe von Erkrankungen des blutbildenden Systems. hES-Zellen sollen hier als Referenzmaterial für die Überprüfung der Eigenschaften von hiPS-Zellen genutzt werden, die aus von MPN betroffenen Patienten gewonnen und an denen die Auswirkungen der der Krankheit zugrundeliegenden genetischen Veränderungen, insbesondere auf das Differenzierungspotenzial, bestimmt werden sollen. Für den Fall, dass sich hiPS-Zellen mit bekannten MPN-assoziierten genetischen Veränderungen nicht aus Patienten gewinnen lassen, sollen diese Mutationen sowohl in Wildtyp-hiPS-Zellen als auch in hES-Zellen zielgerichtet eingeführt werden. Nach Differenzierung in die hämatopoetische Linie sollen MPN-hiPS-Zellen dann bezüglich ihrer molekularen Charakteristika untersucht und mit Wildtyp-iPS-Zellen sowie mit hES-Zellen verglichen werden. Die genehmigten Forschungsarbeiten sollen zu einem besseren Verständnis über die molekularen Vorgänge beitragen, die der Entstehung der MPN zugrunde liegen, was ggf. von erheblicher Relevanz für die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie dieser Erkrankungen sein kann.

Die 76. Genehmigung erging am 25. April 2013 an Herrn Prof. Dr. Lickert, Helmholtz-Zentrum München. Im Mittelpunkt des Forschungsvorhabens steht die Etablierung effizienter Vorgehensweisen für die Gewinnung von funktionsfähigen pankreatischen Beta-Zellen aus hES-Zellen. Ziel ist es, zunächst ausreichende Mengen entodermaler Vorläuferzellen reproduzierbar und in hoher Qualität bereitzustellen und dabei proliferationskompetente Subpopulationen dieser Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren. Diese sollen dann als Ausgangsmaterial für die Herstellung insulinproduzierender Beta-Zell-ähnlicher Zellen dienen. Zudem sollen niedermolekulare Substanzen identifiziert werden, die die entodermale Differenzierung von hES-Zellen auslösen bzw. verstärken können. Die an hES-Zellen gewonnenen Resultate sollen dann auf hiPS-Zellen übertragen werden. Ferner sollen hES-Zellen zu Vergleichszwecken für die Charakterisierung des entodermalen und pankreatischen Differenzierungspotenzials von hiPS-Zellen dienen, die aus Patienten mit Mutationen in den sog. MODY-Genen (MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young) gewonnen werden. Die Arbeiten sollen zu einem besseren Verständnis von den Grundlagen der pankreatischen Differenzierung beim Menschen beitragen, die Entwicklung verbesserter Protokolle für die In-vitro-Gewinnung der klinisch hochrelevanten Beta-Zellen für mittelfristig vorstellbare Zellersatztherapien ermöglichen, das Verständnis über Gemeinsamkeiten und Unterschiede von hES- und hiPS-Zellen vertiefen helfen und zu neuen Erkenntnissen über Differenzierungsdefekte in Zellen von Patienten mit MODY-Diabetes führen.

Inhaberin der ebenfalls am 25. April 2013 erteilten 77. Genehmigung ist erneut die Medizinische Hochschule Hannover. In diesem Forschungsvorhaben sollen hiPS-Zellen aus Patienten mit genetisch bedingten Erkrankungen umfassend mit hES-Zellen verglichen und insbesondere die Charakteristika von aus ihnen differenzierten spezifischen Zelltypen wie Nerven-, Leber-, Blut- oder Herzzellen bestimmt werden. Ferner sollen verschiedene Methoden zur genetischen Modifikation vergleichend an hES- und hiPS-Zellen genutzt werden, um Reportergene und Gene für Transkriptionsfaktoren in die Genome dieser Zellen zu integrieren. Dies soll Grundlage für die Erarbeitung verbesserter Vorgehensweisen zur Differenzierung pluripotenter Stammzellen insbesondere in verschiedene Zelltypen des Blutes sein. Weiterhin sollen hES-Zellen genetisch so modifiziert werden, dass sie für bestimmte genetische Erkrankungen ursächliche Gendefekte aufweisen (wie z. B. für bestimmte kongenitale Neutropenien). Diese Zellen sollen dann insbesondere als Referenzmaterial für die Beurteilung des Differenzierungsvermögens von hiPS-Zellen dienen, die aus Patienten mit der entsprechenden Erkrankung gewonnen worden sind. Schließlich sollen hiPS-Zellen aus Patienten mit bestimmten Erkrankungen des Blut- und Immunsystems sowie der Leber u. a. hinsichtlich ihrer Expressionsprofile sowie bezüglich ihrer Differenzierungsfähigkeit in die von der jeweiligen Erkrankung betroffenen Zelltypen untersucht wer-

den. Die Arbeiten dienen vor allem dem Ziel der Etablierung und Charakterisierung von zellbasierten humanen Krankheitsmodellen, an denen Ursachen für die jeweilige Erkrankung erforscht, potentielle targets für neue Wirkstoffe identifiziert und Medikamente bezüglich ihrer Wirkung auf zellulärer Ebene untersucht werden können.

Die 78. Genehmigung wurde am 28. Mai 2013 an Herrn Dr. Michael Drukker, Helmholtz-Zentrum München, erteilt. Im Zentrum der Forschungsarbeiten steht die Untersuchung von frühen Differenzierungsereignissen in hES-Zellen, die zu mesodermalen Vorläuferzellen und von diesen weiter zu multipotenten kardiovaskulären Vorläuferzellen führen, die in die drei wesentlichen Zelltypen des Herzens (Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und endotheliale Zellen) differenzieren können. Ziel ist die Identifizierung und Charakterisierung von Molekülen und Signalwegen, die an der Spezifizierung und Differenzierung der mesodermalen und kardialen Zellen beteiligt sind. Die kardialen Vorläuferzellen sollen *in vitro* und *in vivo* in die verschiedenen kardialen Zelltypen weiterdifferenziert, diese umfassend charakterisiert und letztendlich bezüglich ihres möglichen therapeutischen Potenzials in einem Kardiomyofarkt-Modell der Maus getestet werden. Das Vorhaben soll letztlich zur Entwicklung neuer Vorgehensweisen für die Bereitstellung reiner Populationen von reproduzierbar gewinnbaren und gut charakterisierten kardialen (Vorläufer)Zellen dienen, wie sie für *In-vitro*-Zellmodelle oder mittelfristig für therapeutische Zwecke benötigt werden. Die genehmigten Arbeiten können zudem zu einem vertieften Verständnis über Prozesse der kardialen Differenzierung während der Embryonal- und Fötalentwicklung des Menschen führen.

Die gleichfalls am 28. Mai 2013 erteilte 79. Genehmigung erging an Herrn Dr. Kleger, Universitätsklinikum Ulm. Zentraler Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Untersuchung molekularer Vorgänge bei der pankreatischen Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen. Dazu sollen u. a. verbesserte Protokolle für die Differenzierung von hES-Zellen in Zellen des definitiven Entoderms sowie in pankreatische Vorläuferzellen entwickelt und diese Zellen dann in reife pankreatische Zellen weiterdifferenziert werden. Im Rahmen des Forschungsvorhabens sollen Gene, deren Produkte für die pankreatische Differenzierung maßgeblich sind, identifiziert und die Effekte von deren Überexpression bzw. Ausschaltung auf die entodermale und pankreatische Differenzierung von hES-Zellen analysiert werden. Diese Forschungen sollen einerseits die *In-vitro*-Bereitstellung therapeutisch relevanter pankreatischer Zellen in hoher Qualität ermöglichen, zum anderen sollen neue Erkenntnisse über die Regulation einzelner Phasen der pankreatischen Differenzierung und der daran beteiligten Signalwege gewonnen werden. Ferner sollen in hES-Zellen Mutationen erzeugt werden, die bekanntermaßen in Verbindung mit genetisch bedingten Erkrankungen des Pankreas stehen. Durch Untersuchung der entodermalen und pankreatischen Differenzierung dieser genetisch veränderten Zellen soll Aufschluss über molekulare Vorgänge bei der Entstehung der entsprechenden Krankheiten auf zellulärer Ebene gewonnen werden.

Die 80. Genehmigung wurde am 4. Juli 2013 an Herrn Professor Sachinidis, Universität Köln, erteilt. Im Focus der hier genehmigten Arbeiten steht die Entwicklung eines zellbasierten *In-vitro*-Testsystem zur Bestimmung von potentieller Kardiotoxizität. Dazu sollen hES-Zellen nach Standardprotokollen zu kardialen Zellen differenziert, diese dann mit Referenzsubstanzen bekannter kardialer Wirkung behandelt und mögliche Endpunkte für kardiotoxische Wirkungen bestimmt werden. Insbesondere sollen die von den jeweiligen Substanzen verursachten Änderungen im Genexpressionsmuster und im Epigenom der Zellen sowie in Signal- und Stoffwechselwegen analysiert und auf dieser Grundlage mögliche Biomarker für substanzvermittelte Kardiotoxizität identifiziert werden. Die Untersuchungen sollen vergleichend zwischen hES-Zellen und hiPS-Zellen durchgeführt werden. Das Vorhaben dient dem Ziel, durch die Entwicklung eines stabilen humanen Zellsystems zur Prüfung kardialer Nebenwirkungen und kardiotoxischer Wirkungen, beispielsweise von pharmakologisch wirksamen Substanzen, bisherige zellbasierte Testsysteme, die vorrangig auf primären tierischen Zellen beruhen, ersetzen und die Aussagekraft entsprechender Tests für den Menschen erhöhen zu können.

Gegenstand der identischen 81. und 82. Genehmigungen, die am 3. August 2013 an Frau Dr. Winner, Universitätsklinikum Erlangen, und Frau Dr. Lampert, Universität Erlangen-Nürnberg, ergingen, ist die Etablierung von *In-vitro*-Zellmodellen für die Untersuchung zellbiologischer und molekularer Grundlagen von neurologischen Erkrankungen, insbesondere von Neuropathien. Dazu sollen u. a. verschiedene Typen sensorischer Neurone (vor allem Schmerzneurone) aus hES-Zellen gewonnen und diese insbesondere hinsichtlich der Präsenz bestimmter Natriumkanäle untersucht werden, deren Funktion bei erblich bedingten Neuropathien verändert ist. Ferner sollen Gene, deren Produkte an der Entstehung von (erblich bedingten) Schmerzsyndromen beteiligt sind, in hES-Zellen mutiert und mögliche Veränderungen, die während der Differenzierung in sensorische Neurone auftreten, analysiert werden. Schließlich sollen die an hES-Zellen entwickelten und optimierten Vorgehensweisen zur Erzeugung sensorischer Neurone auf hiPS-Zellen übertragen werden, die aus Patien-

ten mit erblich bedingten Schmerzsyndromen gewonnen wurden. Die Eigenschaften der aus diesen hiPS-Zellen abgeleiteten Neurone sollen dann mit den Eigenschaften von Neuronen verglichen werden, die aus von gesunden Probanden gewonnenen hiPS-Zellen oder aus hES-Zellen differenziert wurden. Aus dem Vorhaben werden neue Erkenntnisse über die Differenzierung sensorischer Neurone beim Menschen, über Gemeinsamkeiten und Unterschiede der neuronalen Differenzierung bei hES- und hiPS-Zellen sowie über molekulare und zellphysiologische Grundlagen neuropathischer Schmerzen erwartet.

Inhaberin der ebenfalls am 6. August 2013 erteilten 83. Genehmigung ist Frau Prof. Schenke-Layland, Universitätsklinikum Tübingen. In diesem Vorhaben soll der Einfluss von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (extracellular matrix, ECM) auf die frühe kardiale Differenzierung detailliert untersucht werden. Dazu soll die ECM von sich kardial differenzierenden hES-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung isoliert und bezüglich ihrer Zusammensetzung untersucht werden, wobei ggf. auch neue ECM-Komponenten identifiziert und in einem hES-Zell-basierten In-vitro-Modell auf ihre Relevanz für die frühe kardiale Differenzierung hin überprüft werden sollen. Ferner sollen Rezeptoren und Signalwege untersucht werden, die mit den identifizierten ECM-Komponenten in Zusammenhang stehen, und deren Einfluss auf die kardiale Differenzierung bestimmt werden. Schließlich sollen die komplexe (aus sich kardial differenzierenden hES-Zellen gewonnene) ECM und eine artifizielle ECM, die zuvor identifizierte Schlüsselproteine der frühen kardialen ECM enthält, bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht werden, die kardiale Differenzierung von hES-Zellen zu unterstützen. Das Vorhaben dient u. a. der Gewinnung eines vertieften Verständnisses über die Rolle extrazellulärer Signale in frühen kardialen Differenzierungsprozessen beim Menschen und kann darüber hinaus einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung verbesserter Strategien zur In-vitro-Differenzierung kardialer Zellen aus pluripotenten Stammzellen des Menschen leisten helfen. Ggf. könnten die angestrebten neuen Erkenntnisse über kritische Bestandteile der humanen kardialen ECM auch zu innovativen Therapieansätzen für kardiale Erkrankungen führen, die ausschließlich auf rekombinant hergestellten ECM-Proteinen beruhen.

Die 84. Genehmigung wurde am 26. September 2013 an Herrn Dr. Vilchez, Universität Köln, erteilt. Ziel der Forschungsarbeiten ist die Aufklärung molekularer Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Protein-Integrität (Proteostase) in hES-Zellen beitragen. Durch vergleichende systematische Untersuchungen der Proteome von hES-Zellen und von aus diesen differenzierten Zellen sollen Faktoren und Signalwege identifiziert werden, die für die in pluripotenten Stammzellen beobachtete erhöhte Proteasom-Aktivität verantwortlich sind. Durch Modulation der Expression der identifizierten Gene in hES-Zellen soll die Relevanz der entsprechenden Genprodukte für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz bestimmt und ihre mögliche Rolle bei der Reprogrammierung somatischer Zellen zu hiPS-Zellen sowie bei der Transdifferenzierung zu neuronalen Zellen aufgeklärt werden. Weiterhin soll die Funktion spezifischer Ubiquitin-Ligasen bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von hES-Zellen analysiert sowie ggf. ihre Substrate in diesen Zellen identifiziert werden. Anschließend soll untersucht werden, welche spezifische Funktion der regulierte Abbau dieser Proteine für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von hES-Zellen hat. Die Forschungsarbeiten sollen u. a. zu neuen Erkenntnissen über die Regulation der Lebensdauer von Zellen und molekularen Grundlagen von zellulären Alterungsprozessen führen.

Die Forschungsarbeiten, deren Durchführung dem Max-Delbrück-Centrum (MDC), Berlin, im Rahmen der 85. Genehmigung ebenfalls am 26. September 2013 genehmigt wurden, zielen auf die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die dem alternativen splicing in sich differenzierenden Herzmuskelzellen zugrunde liegen. Dazu sollen Gene für kardiale splicing-Faktoren über ein gerichtetes genomisches editing in hES-Zellen eingebracht und die hES-Zellen in kardiale Zellen bzw. zu artifiziellem Herzgewebe (engineered heart tissue, EHT) differenziert werden. Auf der Grundlage der Analyse von Wechselwirkungen zwischen den (rekombinanten) splicing-Faktoren und ihren Substraten sowie durch Ausschaltung der Expression einzelner splicing-Faktoren sollen Substratspezifitäten von splicing-Faktoren untersucht, ihre Beteiligung an der Produktion spezifischer Isoformen kardialer Genprodukte bestimmt und die Rolle einzelner Faktoren für das generelle kardiale splicing ermittelt werden. Ferner sollen Moleküle und Signalwege entschlüsselt werden, die insbesondere für ein differentielles kardiales splicing während der Entwicklung von kardialen Zellen unter den 3D-Bedingungen der EHTs von Relevanz sind. Zudem sollen Veränderungen im Isoform-Muster kardialer Proteine infolge einer exogenen Beeinflussung bestimmter splicing-Faktoren untersucht werden. Das Forschungsvorhaben soll u. a. einen Erkenntnisgewinn über die Rolle spezifischer splicing-Faktoren in bestimmten Entwicklungsphasen kardialer Zellen erbringen und damit zu neuen Erkenntnissen über die kardiale Differenzierung beim Menschen beitragen. Ferner ist ein Erkenntnisgewinn über die molekularen Ursachen solcher kardialer Erkrankungen zu erwarten, die durch ein fehlerhaftes splicing kardialer Genprodukte bedingt werden.

Die 86. Genehmigung wurde am 28. November 2013 erteilt und erging an Herrn Dr. Anastassiadis, Technische Universität Dresden. Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten sollen Methoden für die gezielte genetische Veränderung humaner pluripotenter Stammzellen entwickelt bzw. optimiert werden. Ziel der Arbeiten ist es u. a., beispielsweise durch Transfer von Reporter-genkassetten für die sog. lineage selection sowie durch Transfer von Genen für bestimmte Transkriptionsfaktoren hES-Zell-Linien bereitzustellen, die sich gut in mesodermale und mesenchymale Zellen differenzieren lassen. Ferner soll die Effizienz des Gentransfers in hES-Zellen, die sich in einem naiven pluripotenten Zustand (ground state of pluripotency) befinden, mit jener des Gentransfers in geprägten hES-Zellen (primed hES cells) verglichen werden. Schließlich sollen die im Vorhaben entwickelten bzw. optimierten Methoden zum Gentransfer in hES-Zellen auf hiPS-Zellen übertragen werden. Das Projekt zielt perspektivisch auf die Entwicklung effizienter Methoden zur Bereitstellung (klinisch relevanter) mesenchymaler Stammzellen in reproduzierbar hoher Menge, Reinheit und Qualität und kann außerdem voraussichtlich zur Klärung von relevanten Fragestellungen im Zusammenhang mit verschiedenen Ausprägungsformen von Pluripotenz bei humanen pluripotenten Stammzellen beitragen.

Die 87. Genehmigung erging ebenfalls am 28. November 2013. Genehmigungsinhaberin ist Frau Dr. Poitot, Technische Universität Dresden. Gegenstand der Forschungsarbeiten ist die Herstellung von dreidimensionalen Netzwerken humaner neuronaler Zellen, an denen Prozesse der neuronalen Zellreifung und insbesondere dafür notwendige Wechselwirkungen zwischen verschiedenen daran beteiligten Zelltypen untersucht werden können. Dazu sollen hES-Zellen zu dreidimensionalen Netzwerken differenziert und die Eigenschaften der Zellen dieser neuronalen Netzwerke bestimmt werden, insbesondere ihre elektrophysiologische Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten der Netzwerkbildung. Im Ergebnis der Arbeiten bestünde die Aussicht, Teile der Cortex-Architektur in einem In-vitro-Modell nachbilden zu können. Ein solches Modell könnte dann künftig als Grundlage für Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie des menschlichen Nervensystems dienen oder als Referenz für zellbasierte humane Krankheitsmodelle (beispielsweise Epilepsie) Verwendung finden. Die Arbeiten sollen auch vergleichend zwischen hES- und hiPS-Zellen durchgeführt werden, wobei sowohl aus Wildtyp-hiPS-Zellen abgeleitete neuronale Netzwerke als auch neuronale Netzwerke analysiert werden sollen, die aus hiPS-Zellen von Patienten mit neuro-degenerativen Erkrankungen hergestellt werden.

Inhaber der 88. Genehmigung ist Herr Dr. Kurtz, Charité Berlin, dessen Forschungsvorhaben sich auf die Untersuchung von zwei Fragestellungen richtet. In einem ersten Teilprojekt sollen Kulturbedingungen entwickelt werden, unter denen die Etablierung und Aufrechterhaltung eines naiven Pluripotenz-Zustandes von hES-Zellen möglich ist. Gegenwärtig genutzte hES-Zellen befinden sich im sog. geprägten (primed) Zustand von Pluripotenz, was mit verschiedenen Nachteilen verbunden ist. Geklärt werden soll, ob eine Konversion verfügbarer hES-Zellen in den naiven Pluripotenz-Status allein durch Modifizierung der Kulturbedingungen möglich ist, was u. a. zu einer Erweiterung der Kenntnisse über molekulare Grundlagen von Pluripotenz führen kann. In einem zweiten Teilprojekt sollen hES-Zellen in Richtung verschiedener Nierenvorläuferzellen differenziert werden, die dann in einer Nephrosphären-Kultur zu verschiedenen Typen terminal differenzierter Nierenzellen weiterentwickelt werden sollen. Die entstandenen Nephrosphären sollen als miniaturisierte Nieren-Organoid kultiviert und nach Ausreifung der Zellen in Hinblick auf ihre zellanatomischen, molekularen und funktionellen Eigenschaften analysiert werden. Diese Forschungsarbeiten, die auch im Vergleich mit hiPS-Zellen durchgeführt werden sollen, könnten von erheblichem Nutzen für die Etablierung von In-vitro-Modellen für Nierengewebe sein und wären von großem Wert für die präklinische Medikamententestung. Zudem können sie zur Schaffung von Grundlagen für künftig vorstellbare Gewebeersatztherapien beitragen.

Für die folgenden bereits in der Vergangenheit genehmigten Forschungsvorhaben wurde die Genehmigung auf Antrag hin inhaltlich erheblich erweitert und der Registereintrag entsprechend modifiziert:

Erweiterung der 46. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 9. Oktober 2009, Erweiterung der Genehmigung am 20. September 2012). Gegenstand des ursprünglich genehmigten Forschungsvorhabens ist die Untersuchung von Prozessen der Differenzierung pankreatischer Beta-Zellen aus hES-Zellen und die Entwicklung verbesserter entsprechender Protokolle. Da die Differenzierung von hES-Zellen in pankreatische Beta-Zellen offenbar die Kokultivierung mit anderen Typen menschlicher Zellen wie endothelialen, exokrinen oder duktafen Zellen erfordert, primäre menschliche Zellen dieser Art aber nicht oder nicht in für die Durchführung des Forschungsvorhabens ausreichender Menge, reproduzierbarer Qualität sowie in der erforderlichen Spezifität zur Verfügung stehen, sollen diese Zelltypen nunmehr ebenfalls aus hES-Zellen differenziert werden und die so gewonnenen Zellen für die Kokultur mit sich zu Beta-Zellen differenzierenden hES-Zellen verwendet werden. Ferner soll der Einfluss spezifischer mikro-RNAs (miRNAs) auf die Differenzierung von hES-Zellen in pankreatische Beta-Zellen untersucht und dazu beispielsweise Gene für bestimmte miRNAs in hES-Zellen zur Expression gebracht sowie deren Effekt auf die pankreatische Differenzierung von hES-Zellen untersucht werden. Diese Forschungsarbeiten dienen dem Ziel, effektive Protokolle für die In-vitro-

Differenzierung von hES-Zellen zu reifen pankreatischen Beta-Zellen zu entwickeln, und können zur Klärung verschiedener Fragestellungen der pankreatischen Differenzierung beim Menschen beitragen, insbesondere zu jenen nach der Rolle von Wechselwirkungen zwischen sich entwickelnden Beta-Zellen und Zellen des exokrinen Pankreas oder des duktales Systems sowie nach der Beteiligung spezifischer miRNAs an einzelnen Phasen der Entwicklung pankreatischer Zellen.

Erweiterung der 48. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 3. November 2009, Erweiterung der Genehmigung am 20. September 2012). Im Mittelpunkt der ursprünglich genehmigten Forschungsarbeiten steht die Differenzierung von hES-Zellen *in vitro* zu Neuralleistenzellen, die dann weiter in Richtung funktionaler Mechanorezeptoren entwickelt werden sollten. Im Rahmen der zusätzlich genehmigten Arbeiten soll überprüft werden, ob die im Rahmen des Forschungsvorhabens gewonnenen Neuralleistenzellen auch das Potenzial zur Differenzierung in weitere Typen sensorischer Neuronen haben, insbesondere in thermo- und chemosensitive Neuronen. Die Einschätzung des Differenzierungspotenzials soll auf Grundlage von *In-vivo*-Versuchen erfolgen, bei denen überprüft werden soll, ob sich die aus hES-Zellen gewonnenen menschlichen Neuralleistenzellen im Kontext von Hühner-embryonen in die angestrebten neuronalen Subtypen differenzieren lassen. Ggf. sollen anschließend *In-vitro*-Untersuchungen mit dem Ziel der Identifizierung von Faktoren durchgeführt werden, die eine Entwicklung von thermo- und chemosensitiven Neuronen aus Neuralleistenzellen bewirken oder begünstigen. Die Forschungsarbeiten sollen u. a. zu einem besseren Verständnis der neuronalen Differenzierung während der menschlichen Embryonalentwicklung führen und zur Schaffung von Grundlagen für neue, auf humanen Zellen basierende *In-vitro*-Zellkulturmodelle beitragen, 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.

Erweiterung der 16. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 21. März 2006, Erweiterung der Genehmigung am 31. Oktober 2012). Ziel der ursprünglich genehmigten Forschungsarbeiten ist die Entwicklung verbesserter Protokolle für die pankreatische Differenzierung. Diese Arbeiten sollen nunmehr um Verfahren erweitert werden, bei denen eine für pankreatische Zellen spezifische Reporterexpression zur Aufreinigung von Subpopulationen pankreatischer (Vorläufer)Zellen genutzt werden soll. Dazu sollen hES-Zellen mit Expressionskassetten für Reportergene versehen werden, in denen die Expression des Reportergens durch Promotoren kontrolliert wird, die in sich entodermal bzw. pankreatisch differenzierenden Zellen aktiv sind. Die aus so modifizierten hES-Zellen gewonnenen entodermalen bzw. pankreatischen Vorläuferzellen sollen dann auf Grundlage der jeweils auftretenden Reporterexpression angereichert werden. Zur Verminderung einer unspezifischen Aktivierung der Reportergene sollen ggf. Bindestellen für bestimmte mikro-RNAs (miRNAs) in die Expressionskassetten eingebaut werden, die die Expression des Reportergens in nicht differenzierten Zellen verhindern können. Dazu soll im Vorfeld bestimmt werden, welche miRNAs im Laufe der pankreatischen Differenzierung humaner ES-Zellen auftreten. Die differenzierten (Vorläufer)Zellpopulationen sollen anschließend umfassend *in vitro* charakterisiert und schließlich in immundefiziente diabetische Mäuse transplantiert werden, um ihre Funktionalität *in vivo* zu testen. Das Ziel des Forschungsvorhabens besteht unverändert in der Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Gewinnung humaner pankreatischer Zellen für einen späteren Einsatz in der Gewebeersatztherapie.

Weitere Angaben zum Inhalt der erteilten Genehmigungen sowie zu den 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).

1.3. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 4 StZG

Im Rahmen der Bewertung von Anträgen nach dem StZG ist jeweils zu prüfen, ob die zur Einfuhr und Verwendung beantragten hES-Zellen den Bedingungen des § 4 StZG entsprechen. Die Prüfung erfolgt auf Grundlage einer vom Antragsteller beigebrachten Dokumentation über die entsprechenden hES-Zell-Linien. In Fällen, in denen die Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen beantragt wird, über die dem RKI bereits eine entsprechende Dokumentation aus früheren Antragsverfahren vorliegt, ist eine erneute Erbringung der Dokumentation darüber, dass die Voraussetzungen nach § 4 Absatz 2 Nummer 1 StZG vorliegen, nicht erforderlich. Im Berichtszeitraum wurden die Einfuhr und Verwendung von insgesamt 32 verschiedenen hES-Zell-Linien genehmigt. Für 28 dieser Zell-Linien lag die nach § 6 Absatz 2 Nummer 3 StZG erforderliche Dokumentation am RKI bereits vor. Für vier hES-Zell-Linien wurde im Berichtszeitraum die Einfuhr und Verwendung erstmals beantragt und nach Prüfung der entsprechenden Dokumentation genehmigt. Gründe nach § 4 Absatz 2

Nummer 2 StZG standen der Einfuhr und Verwendung der hES-Zellen jeweils nicht entgegen. Tatsachen, nach denen die Genehmigung entsprechend § 4 Absatz 3 StZG zu versagen wäre, waren jeweils nicht bekannt.

Seit dem Inkrafttreten des Gesetzes zur Änderung des Stammzellgesetzes vom 14. August 2008 (BGBl I S. 1708) besteht die Möglichkeit der Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen, die nach dem 1. Januar 2002 und vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden. Bis zum 31. Dezember 2013 wurden die Einfuhr von 28 „neuen“ hES-Zell-Linien und ihre Verwendung in insgesamt 47 Forschungsvorhaben entweder im Zusammenhang mit der Genehmigung eines neuen Antrags oder im Rahmen der Erweiterung bereits bestehender Genehmigungen nach dem StZG genehmigt. Damit besteht für mehr als 50 % aller Forschungsvorhaben eine Genehmigung zur Nutzung von hES-Zell-Linien, deren Einfuhr und Verwendung erst mit der Änderung des Stammzellgesetzes im Jahr 2008 ermöglicht wurde.

Detaillierte Angaben darüber, welche humanen embryonalen Stammzell-Linien in den jeweiligen Forschungsvorhaben verwendet werden dürfen, finden sich ebenfalls im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des RKI

(http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register_node.html).

1.4. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG

Im Rahmen der Prüfung der Genehmigungsvoraussetzungen nach § 6 Absatz 4 Nummer 2 StZG hat die Genehmigungsbehörde bei allen im Berichtszeitraum abschließend bewerteten 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.

Hochrangigkeit der Forschungsziele

Die große Mehrzahl der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben dient – wie auch in den vorangegangenen Berichtszeiträumen – der Erreichung hochrangiger Forschungsziele für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung. Dabei sollen hES-Zellen weiterhin zur Aufklärung der biologischen Grundlagen der Pluripotenz von Stammzellen und früher Differenzierungs- und Entwicklungsvorgänge beim Menschen genutzt werden. Ferner sollen hES-Zellen verwendet werden, um In-vitro-Zellmodelle für weitere Fragestellungen der Grundlagenforschung, beispielsweise die Analyse von Pathogenesemechanismen, sowie für pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen zu entwickeln. Weiterhin zielt die Verwendung von hES-Zellen auch darauf, Verfahren für die Bereitstellung menschlicher Zellen für mögliche spätere klinische Anwendungen zu etablieren. Schließlich werden hES-Zellen auch als Referenzmaterial für Untersuchungen an humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) benötigt, wobei dies häufig mit Fragestellungen zu hES-Zellen selbst verbunden ist. Die wissenschaftlichen Fragestellungen, für deren Bearbeitung humane ES-Zellen verwendet werden sollen, lassen sich in sieben thematische Schwerpunkte gruppieren, die sich teils überschneiden:

Eine erste Gruppe von Fragestellungen umfasst Untersuchungen zu den Grundlagen von Pluripotenz. Hier spielt nunmehr auch die Frage nach der molekularen Basis der naiven Pluripotenz eine Rolle. Gegenwärtig genutzte hES-Zellen befinden sich im Stadium der geprägten Pluripotenz, die dem Stadium epiblastärer Zellen der Maus entspricht. Beide Pluripotenz-Zustände können offenbar ineinander überführt werden, wobei die Aufrechterhaltung des naiven Zustandes in Zellkultur bislang die permanente Expression bestimmter transgener (Reprogrammierungs)Faktoren erfordert. Nun soll geklärt werden, ob die Modifizierung von Kulturbedingungen zur Etablierung eines naiven Phänotyps in hES-Zellen führt, der dem von Maus-ES-Zellen näher ist als dem epiblastärer Stammzellen der Maus, und welche konkreten Eigenschaften hES-Zellen bei entsprechender Kultivierung aufweisen. Die angestrebte Langzeit-Etablierung von hES-Zell-Kulturen im naiven Stadium der Pluripotenz würde voraussichtlich zu stärker homogenen und damit besser standardisierbaren Zellpopulationen führen.

Zweitens sollen in mehreren Vorhaben weiterhin spezifische Eigenschaften von hES-Zellen untersucht und ihre molekularen Grundlagen aufgeklärt werden. Dies betrifft beispielsweise Fragen nach den Effekten ionisierender Strahlung auf das Differenzierungsvermögen humaner ES-Zellen, nach für hES-Zellen typischen Glykosilierungsmustern und deren Veränderung im Zuge der Differenzierung sowie nach für hES-Zellen typischen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Proteostase und deren Veränderung nach Induktion von Differenzierung. In diesen Vorhaben geht es weiterhin darum, den Kenntnisstand über hES-Zellen selbst auszuweiten und darüber hinaus ggf. zu bestimmen, ob und inwieweit hiPS-Zellen jeweils dieselben Eigenschaften aufweisen, ob Unterschiede zwischen beiden Typen pluripotenter Stammzellen bestehen und worin diese

begründet sind. Auch diese Arbeiten sollen zum Verständnis der Grundlagen von Pluripotenz bei menschlichen Zellen beitragen und Erkenntnisse über mit frühen Differenzierungsvorgängen einhergehende molekulare und zellbiologische Prozesse erbringen.

Ein erheblicher Teil der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben zielt drittens auf die Untersuchung der molekularen Vorgänge, die sich bei der gerichteten Differenzierung von hES-Zellen in spezifische Zelltypen abspielen, und – damit in Zusammenhang stehend – auf die Etablierung bzw. Optimierung von entsprechenden Differenzierungsprotokollen. Dabei sollen weiterhin vor allem Differenzierungsprozesse in Richtung neuraler, kardialer und pankreatischer Zellen untersucht, aber auch Fragen im Zusammenhang mit der Differenzierung von hES-Zellen in verschiedene Zelltypen der Niere beantwortet werden. Bei diesen Forschungsvorhaben geht es vielfach nicht mehr – wie in früheren Forschungsarbeiten – um den Nachweis der prinzipiellen Eignung bestimmter Methoden zur Generierung spezifischer Zelltypen im Sinne von proof of concept-Studien. Vielmehr sollen bestimmte Teilaspekte der Differenzierung in den jeweiligen Zelltyp beleuchtet, die Funktion einzelner zellulärer Faktoren (z. B. Transkriptionsfaktoren) für Teilschritte der Differenzierung bestimmt und ggf. die Mechanismen aufgeklärt werden, die einer möglichen Beeinträchtigung von Differenzierungsprozessen durch genetische Veränderungen (Mutationen) zugrunde liegen. Diese Untersuchungen können zum einen zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Differenzierung in die jeweiligen Zelltypen führen, im Falle der kardialen Differenzierung beispielsweise über den Einfluss von Komponenten der extrazellulären Matrix oder über die Rolle alternativ gespleißter Genprodukte. Aus den Ergebnissen dieser Forschungsvorhaben können ggf. auch Rückschlüsse auf entsprechende zelluläre Vorgänge während der Embryonalentwicklung des Menschen gezogen werden. Zum anderen sollen die Vorgehensweisen für die In-vitro-Differenzierung von hES-Zellen in den jeweiligen Zelltyp weiterentwickelt und optimiert werden, um menschliche Zellen in ausreichender Zahl und hoher Reinheit zur Verfügung stellen zu können. Dies ist von erheblicher Bedeutung, da die reproduzierbare Gewinnbarkeit möglichst reiner und gut charakterisierter Populationen menschlicher (Vorläufer)Zellen eine Voraussetzung für deren Nutzung in der pharmakologisch-toxikologischen Forschung (beispielsweise zur Identifizierung potentieller targets für Wirkstoffe oder für die Abschätzung möglicher Arzneimittelnebenwirkungen auf menschliche Zellen) sowie für die Bereitstellung eines geeigneten Zellmaterials für in der Zukunft absehbare Zell- und Gewebeersatztherapien ist. Die in diesen Vorhaben aufgeworfenen Fragestellungen sollen in der Mehrzahl der Fälle auch an hiPS-Zellen untersucht werden; dabei soll überprüft werden, ob und inwieweit sich hES- und hiPS-Zellen bezüglich der jeweils interessierenden Eigenschaften gleichen oder unterscheiden und ob bzw. inwieweit die entwickelten bzw. optimierten Differenzierungsprotokolle in gleicher Weise auch auf hiPS-Zellen angewandt werden können.

Viertens wird in einem Teil der im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben die Zielstellung verfolgt, humane In-vitro-Zellmodelle zu etablieren, an denen – entweder bereits im genehmigten Projekt oder aber in möglichen Folgeprojekten – insbesondere Pathogenese-Mechanismen von teils genetisch bedingten Erkrankungen des Menschen aufgeklärt werden sollen. Dabei sollen bestimmte Fragestellungen direkt an auf hES-Zellen basierenden In-vitro-Modellen geklärt werden, wie beispielsweise im Falle der Untersuchung des Einflusses einer Infektion mit dem Rubella-Virus auf frühe Differenzierungsprozesse in menschlichen Zellen oder bei der Untersuchung des Effektes krankheitsassoziierter Mutationen auf das Differenzierungspotenzial humaner ES-Zellen in Richtung pankreatischer Zellen. In anderen Forschungsvorhaben sollen hES-Zellen vor allem als Referenzmaterial für die Etablierung von Zellmodellen auf der Grundlage krankheitsspezifischer hiPS-Zellen dienen, beispielsweise bei der Etablierung von Zellmodellen für Mitochondriopathien. Schließlich sollen in einigen Vorhaben auch krankheitsspezifische hiPS-Zellen mit hES-Zellen verglichen werden, in die krankheitsassozierte Mutationen artifiziell eingebracht werden, um so die Effekte einer spezifischen Mutation vor einem isogenen Hintergrund beurteilen zu können. Derartige Vorgehensweisen sind eine generelle Tendenz in der internationalen Forschung an pluripotenten Stammzellen des Menschen. Aus den entsprechenden Untersuchungen wird prinzipiell Aufschluss über Veränderungen erwartet, die sich bei der jeweils interessierenden Krankheit auf molekularer und zellulärer Ebene vollziehen, was zu einem besseren Verständnis der Pathogenese und ggf. zu innovativen Therapieansätzen für diese schweren, meist nur inadäquat behandelbaren Erkrankungen führen kann.

Ein kleiner Teil der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben hat fünftens die Entwicklung von Zellmodellen für die Untersuchung von Fragestellungen in der Erforschung neuer Wirkstoffe bzw. für die Bestimmung möglicher toxischer Nebenwirkungen von Medikamenten zum Gegenstand. So sollen beispielsweise in einem Vorhaben Zellmodelle entwickelt werden, die auch für die Untersuchung von Stoffen mit potentieller Wirkung auf Kaliumkanäle in schmerzempfindlichen Neuronen genutzt werden können. In einem weiteren Vorhaben sollen auf Basis humaner ES-Zellen neurale Netzwerke u. a. zur Untersuchung von Effek-

ten von Medikamenten auf das Zentralnervensystem etabliert sowie in einem dritten Forschungsvorhaben ein Zellkulturmodell für die Abschätzung von potentieller Kardiotoxizität entwickelt und charakterisiert werden. Da gegenwärtig genutzte Zellkulturmodelle in der pharmakologisch-toxikologischen Forschung größtenteils auf primären tierischen oder immortalisierten humanen Zellen beruhen und Ergebnisse, die an solchen Zellmodellen gewonnen werden, die Situation in menschlichen Zellen nur unzureichend widerspiegeln, würden auf humanen Zellen basierende In-vitro-Testsysteme, wie sie in den genannten Vorhaben entwickelt werden sollen, die Erforschung neuer Arzneimittel voraussichtlich erheblich vereinfachen und beschleunigen, die Sicherheit von Patienten und Probanden verbessern helfen und zudem zu einer Verringerung des Tierverbrauchs in der Arzneimittelforschung beitragen können.

Sechstens wird in einem Teil der genehmigten Forschungsvorhaben des aktuellen Berichtszeitraumes – neben der Benennung auch jeweils anderer Forschungsziele – auch ausdrücklich die Absicht geäußert, Voraussetzungen für die Bereitstellung eines geeigneten humanen Zellmaterials für künftige Zellersatztherapien schaffen zu wollen. Dabei geht es in erster Linie um die Optimierung von Differenzierungsprotokollen, insbesondere für die Gewinnung bestimmter pankreatischer oder kardialer Zelltypen in hoher Reinheit und reproduzierbarer Qualität, um die Anreicherung der jeweils interessierenden Zelltypen sowie um die Etablierung von Verfahren zur Bereitstellung der Zellen in größeren als im Labor üblichen Maßstäben.

Siebtens schließlich werden hES-Zellen in der Mehrzahl der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben gemeinsam mit hiPS-Zellen eingesetzt. Dabei soll in einem Teil der Projekte die jeweils interessierende Fragestellung zunächst für hES-Zellen geklärt werden, um Erkenntnisse über hES-Zellen selbst zu gewinnen. Erst danach soll überprüft werden, ob sich hiPS-Zellen in den jeweils untersuchten Eigenschaften zu hES-Zellen identisch verhalten, ob ggf. Unterschiede bestehen und worin diese begründet sein könnten. Auf diesem Wege soll in den jeweiligen Vorhabensteilen dazu beigetragen werden, hiPS-Zellen besser als bislang zu charakterisieren und zu stärker allgemeingültigen Aussagen über pluripotente Stammzellen des Menschen insgesamt zu gelangen. In einigen Projekten werden hES-Zellen ausschließlich als Referenzmaterial für Forschungen an hiPS-Zellen benötigt. Hier sind die interessierenden Fragestellungen bereits an hES-Zellen untersucht und soweit geklärt worden, dass sie als Referenzmaterial im Sinne eines „gold standard“ für entsprechende Untersuchungen mit hiPS-Zellen dienen können. Auch hier besteht das Forschungsziel darin, zu einem besseren Verständnis der Biologie humaner iPS-Zellen zu gelangen.

Die Verwendung von hES-Zellen dient folglich in der Mehrzahl der im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben weiterhin primär der Gewinnung eines eigenständigen Erkenntnisgewinns über hES-Zellen selbst oder über pluripotente Stammzellen des Menschen insgesamt. Die Genehmigungstätigkeit der Jahre 2012 und 2013 ergibt weiterhin keinen Hinweis darauf, dass hES-Zellen in Deutschland derzeit nur oder vorwiegend nur als „gold standard“ für Forschungen an hiPS-Zellen verwendet werden.

Wie im vorangegangenen Berichtszeitraum dienen die genehmigten Forschungsvorhaben auch weiterhin sowohl Zielstellungen in der Grundlagenforschung als auch Zielstellungen im Bereich der Schaffung von Grundlagen für neue therapeutische, diagnostische und präventive Verfahren. Bei der Bewertung der Anträge fand ggf. auch ein jeweils prognostizierter künftiger wissenschaftlicher Nutzen, insbesondere von auf hES-Zellen basierenden humanen Zellkulturmodellen, die in den genehmigten Vorhaben jeweils erarbeitet werden sollen, bei der Zuerkennung von Hochrangigkeit für die Forschungsziele Berücksichtigung. So wurden in neun Forschungsvorhaben Zielstellungen im Bereich der Entwicklung von Zellmodellen formuliert, auf deren Basis im Rahmen künftiger Forschungen, also nach Abschluss des aktuell genehmigten Forschungsvorhabens, beispielsweise die Pathogenese bestimmter menschlicher Erkrankungen untersucht werden kann. Dies betrifft auch die beabsichtigte Entwicklung von In-vitro-Zellmodellen, die in künftigen Forschungsvorhaben beispielsweise zur Identifizierung neuer Arzneimitteltargets im Hochdurchsatzverfahren oder zur frühzeitigen Erkennung von Arzneimittelrisiken an spezifischen Zelltypen genutzt werden können. Die Verwendung von hES-Zellen mit dem Ziel der Bereitstellung verbesserter In-vitro-Testsysteme ist auch weiterhin gerechtfertigt, da beispielsweise für pharmakologisch-toxikologische Forschungen derzeit häufig lediglich Zellkultursysteme zur Verfügung stehen, die tierischen Ursprungs sind oder auf humanen immortalisierten bzw. Tumorzellen beruhen und die die physiologischen Eigenschaften primärer Zellen, wie sie beispielsweise für die zuverlässige Testung von (Neben)Wirkungen von Arzneimitteln auf zellulärer Ebene benötigt werden, nicht oder nicht vollständig aufweisen.

In mehreren der bewerteten Forschungsvorhaben wurde auch die Zielstellung formuliert, durch Forschungen an hES-Zellen Grundlagen für die Entwicklung neuer therapeutischer Verfahren in der Zellersatztherapie schaffen zu wollen. Zwar zielt keines der genehmigten Vorhaben unmittelbar auf die Durchführung einer klinischen Studie unter Verwendung von hES-Zell-abgeleiteten Zellen. Jedoch ist angesichts von derzeit neun

klinischen Studien, die weltweit auf der Basis von hES-Zellen stattfinden, das Ziel der Nutzung von hES-Zell-Derivaten für klinische Zwecke keine rein hypothetische Option mehr, wie dies in den ersten Jahren nach der Verabschiedung des StZG der Fall war. Die Zielstellung, Grundlagen für Gewebeersatztherapien schaffen zu wollen, fand neben jeweils formulierten Zielstellungen hinsichtlich eines angestrebten Erkenntnisgewinns für die Grundlagenforschung – nunmehr ausdrücklich Berücksichtigung bei der Bewertung entsprechender Anträge.

Dagegen konnten in einigen Anträgen neben anderen Forschungszielen, die auf die Gewinnung hochrangiger Erkenntnisse entsprechend § 5 Nummer 1 StZG gerichtet waren, explizit formulierte zusätzliche Anliegen, durch Entwicklung neuer In-vitro-Testsysteme zur Vermeidung oder Verringerung des Tierversuchs in der Forschung beizutragen oder Testsysteme zur Überprüfung der Wirkungen von Umweltgiften auf spezifische humane Zelltypen zu entwickeln, weiterhin nicht als eigenständiger Hochrangigkeitsgrund für die Verwendung humaner embryonaler Stammzellen anerkannt werden, weil es sich dabei nicht um Forschungsziele i. S. d. § 5 Nummer 1 StZG handelt.

Vorklärung der Forschungsfragen

Nach § 5 Nummer 2 Buchstabe a StZG hat der Antragsteller wissenschaftlich begründet darzulegen, dass die im Forschungsvorhaben vorgesehenen Fragestellungen nach dem anerkannten Stand der Wissenschaft so weit wie möglich bereits in In-vitro-Modellen mit tierischen Zellen oder Tierversuchen vorgeklärt worden sind. Dadurch soll gewährleistet werden, dass der Übergang zur Nutzung von hES-Zellen zur Klärung der jeweiligen Fragestellung gerechtfertigt ist und hES-Zellen nur für Forschungsvorhaben verwendet werden, deren Fragestellung durch vorangegangene Arbeiten hinreichend begründet wurde. Für die im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben wurden von den Antragstellern die erforderlichen Darlegungen jeweils erbracht, wobei weiterhin sowohl Ergebnisse eigener Vorarbeiten als auch in der internationalen Fachliteratur veröffentlichte Erkenntnisse anderer Gruppen vorgetragen wurden. Die jeweiligen Darlegungen haben nach Auffassung der Genehmigungsbehörde den gesetzlichen Voraussetzungen des § 5 Nummer 2 Buchstabe a StZG genügt und konnten die Nutzung von hES-Zellen jeweils rechtfertigen.

Erneut wurde bei der Prüfung der erforderlichen Vorklärung sichtbar, dass aufgrund des sich rasant entwickelnden Erkenntnisstandes über hES-Zellen Darlegungen zur Vorklärung zahlreicher Forschungsfragen an tierischen Zellen oder im Tierversuch nicht sinnvoll gefordert werden können. Grundlegende Fragestellungen wurden (im Inland oder im Ausland) bereits umfassend an hES-Zellen geklärt; eine zusätzliche oder vertiefende Voruntersuchung derselben Frage an tierischen Zellen würde hier voraussichtlich keinen Erkenntnisgewinn mehr erbringen, der für die Vorklärung des Vorhabens im Sinne einer Plausibilisierung der Forschungsfragen sowie des geplanten experimentellen Vorgehens relevant wäre. So ist beispielsweise die grundsätzliche Eignung von hES-Zellen zur Differenzierung in all jene Zelltypen, die im Rahmen der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben aus hES-Zellen gewonnen werden sollen, bereits an hES-Zellen selbst gezeigt worden; die entsprechenden Vorgehensweisen sollen in den jeweiligen Forschungsvorhaben nachgearbeitet und ggf. optimiert werden. Darlegungen darüber, ob und wie sich murine ES-Zellen in diese Zelltypen differenzieren lassen, sind hier verzichtbar. Insgesamt werden bei der Entscheidung darüber, ob das Forschungsvorhaben den Bedingungen des § 5 Nummer 2 Buchstabe a StZG entspricht, Sinn und Zweck des Vorklärungserfordernisses weiterhin so ausgelegt, dass die Forschungsfragen „wenigstens“ an tierischen Zellen oder im Tierversuch vorgeklärt sein müssen. Sollten bereits hinreichende „Vorklärungen“ der wissenschaftlichen Fragestellungen an hES-Zellen oder ggf. anderen humanen Stammzellen erfolgt und im Antragsverfahren dargelegt worden sein, besteht keine Notwendigkeit für die Vorklärung derselben Fragestellung mit tierischen Zellen oder im Tierversuch.

In anderen Fällen kann eine detaillierte Untersuchung der Fragestellungen, die an hES-Zellen geklärt werden sollen, unter Nutzung tierischer Zellen nicht zur Vorklärung der wissenschaftlichen Fragestellungen beitragen, da insoweit bereits bekannt ist, dass sich tierische und menschliche Zellen in den jeweils relevanten Eigenschaften erheblich unterscheiden. Ergebnisse aus Untersuchungen an tierischen Zellen könnten in diesen Fällen nicht auf menschliche Zellen übertragen werden, und die Voruntersuchungen würden keine Anhaltspunkte dafür liefern, ob die Untersuchung der jeweiligen Fragestellung an menschlichen (ES-)Zellen zu ähnlichen Resultaten führen würde wie die geforderten Experimente mit tierischen Zellen. Dies betrifft beispielsweise weiterhin jene Projekte, in denen die molekularen Grundlagen der Pluripotenz menschlicher ES-Zellen untersucht werden sollen, da diese sich zwischen Zellen verschiedener Spezies teils erheblich unterscheiden. Ferner gilt dies für Forschungsvorhaben, in denen Zellmodelle für humane Krankheiten (beispielsweise durch knock out bestimmter Gene) etabliert werden sollen, wenn bereits bekannt ist, dass ein knock out entsprechender

Gene in der Maus einen anderen Phänotyp als im Menschen bewirkt. Auch unterscheiden sich die Protokolle zur Gewinnung bestimmter Zelltypen aus Stammzellen verschiedener Spezies in zahlreichen Teilaspekten, so dass beispielsweise an murinen Zellen etablierte Protokolle nicht ohne weiteres auf humane Zellen übertragen werden können und folglich über einen proof of concept hinausgehende, detaillierte Voruntersuchungen mit diesen Zellen zur Vorklärung der jeweiligen konkreten experimentellen Fragestellung an hES-Zellen teilweise nicht sinnvoll wären. Im Übrigen wird auf die entsprechenden Ausführungen in den Erfahrungsberichten für die Jahre 2008 bis 2009 und 2010 bis 2011 verwiesen, in denen diese Probleme bereits thematisiert wurden.

Erforderlichkeit der Verwendung von hES-Zellen

Entsprechend § 5 Nummer 2 Buchstabe b StZG ist durch den Antragsteller darzulegen, dass der mit dem Forschungsvorhaben angestrebte wissenschaftliche Erkenntnisgewinn voraussichtlich nur unter Verwendung von hES-Zellen erreicht werden kann. Hier ist durch die Genehmigungsbehörde auf Grundlage der Darlegungen des Antragstellers jeweils zu prüfen, ob Alternativen zur Nutzung von hES-Zellen bestehen und ob hinreichende Belege dafür existieren, dass der mit dem Forschungsvorhaben angestrebte wissenschaftliche Erkenntnisgewinn auch unter ausschließlicher Nutzung anderer Zellen als hES-Zellen erreicht werden kann.

Für alle genehmigten Forschungsvorhaben wurde dargelegt, dass die Nutzung von hES-Zellen für das Erreichen des mit dem Forschungsvorhaben angestrebten wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns nach dem aktuellen Kenntnisstand jeweils erforderlich ist. Dabei wurde plausibel begründet, dass nach dem anerkannten Stand der Wissenschaft keine ausreichenden Hinweise bestehen, dass die Forschungsziele unter Verwendung tierischer Zellen erreicht werden könnten. Andere menschliche Zelltypen, die möglicherweise als Alternative zu humanen pluripotenten Stammzellen genutzt werden könnten (z. B. primäre menschliche Zellen, somatische Stammzellen, Tumorzell-Linien oder (immortalisierte) Zell-Linien aus abgetriebenen menschlichen Föten) weisen entweder nicht die für die Projektdurchführung erforderlichen biologischen Eigenschaften auf oder können nicht in der für die Projektdurchführung jeweils notwendigen Menge und in reproduzierbarer Qualität gewonnen werden.

Hinsichtlich der Erforderlichkeit der Verwendung von hES-Zellen ist seit einigen Jahren insbesondere zu prüfen, ob und inwieweit die Forschungsziele ggf. unter ausschließlicher Nutzung von hiPS-Zellen bei vollständigem Verzicht auf Nutzung von hES-Zellen erreicht werden könnten. Hierzu ist festzustellen, dass viele der Forschungsfragen, die Gegenstand der im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben sind, bislang noch nicht oder nur in Ansätzen an hiPS-Zellen untersucht worden sind. Es ist gerade Gegenstand der entsprechenden Forschungsvorhaben, durch vergleichende Untersuchungen an hES- und hiPS-Zellen zu klären, ob sich beide Typen pluripotenter Stammzellen des Menschen hinsichtlich der jeweils interessierenden Eigenschaften identisch verhalten, ob und welche Unterschiede bestehen und was die molekularen Grundlagen solcher Unterschiede sind. Dies erfordert die Nutzung von hES-Zellen. Auch zur Klärung von Forschungsfragen, für die hES-Zellen ausschließlich als Referenzmaterial zur Überprüfung von für pluripotente Zellen charakteristische Eigenschaften verwendet werden sollen, werden hES-Zellen benötigt, da es sich bei hES-Zellen um den einzigen Zelltypen des Menschen handelt, der nach derzeitigem Kenntnisstand als uneingeschränkt pluripotent angesehen wird.

Bei der Entscheidung darüber, ob Forschungsziele ggf. auch unter alleiniger Nutzung von hiPS-Zellen zu erreichen sind, ist ferner zu berücksichtigen, dass in der wissenschaftlichen Literatur weiterhin teils uneinheitliche Befunde zur Gleichartigkeit von hES- und hiPS-Zellen vorliegen. In verschiedenen Antragsverfahren wurde dargelegt, dass hiPS-Zellen eine erhebliche Variabilität in ihrem Differenzierungsverhalten aufweisen, die mit dem für die Reprogrammierung gewählten Zelltyp, der Reprogrammierungsmethode und dem postulierten epigenetischen Gedächtnis dieser Zellen zusammenhängen können. Zwar wurde bereits vielfach der Nachweis erbracht, dass sich sowohl hES-Zellen als auch hiPS-Zellen zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen eignen. Dennoch gibt es deutliche Hinweise darauf, dass hiPS Zellen eine höhere Variabilität und eine insgesamt geringere Effizienz bei der Differenzierung in bestimmte Zelltypen aufweisen als hES-Zellen. Ferner sind Fragen zur genetischen Stabilität von hiPS-Zellen sowie zu ihrer epigenetischen Identität mit hES-Zellen offen. Für die Entscheidung darüber, ob sich der mit einem Forschungsvorhaben angestrebte wissenschaftliche Erkenntnisgewinn ggf. durch Einsatz anderer Zellen als hES-Zellen erreichen lässt, ist aber die bloße Vermutung, dass dieser ggf. auch durch Untersuchungen an hiPS-Zellen erreicht werden könnte, nicht hinreichend. Vielmehr wären für die Versagung einer Genehmigung zur Verwendung von hES-Zellen hinreichende Daten und Erkenntnisse auf Basis des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes zum Zeitpunkt des Antragsverfahrens dafür erforderlich, dass der mit einem Forschungsvorhaben angestrebte wissenschaftliche Erkenntnisgewinn mit anderen Zellen (hier: hiPS-Zellen) tatsächlich erreichbar ist.

1.5. Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung

Die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES), die von der Bundesregierung zum 1. Juli 2011 zum vierten Mal berufen wurde, hat die gesetzliche Aufgabe, Anträge auf Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen 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 Stellungnahmen zu den Forschungsvorhaben, die Gegenstand der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben sowie der drei Genehmigungserweiterungen für bereits in der Vergangenheit bewilligte Forschungsvorhaben 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. Januar 2012 bis 31. Dezember 2012 (10. Tätigkeitsbericht der ZES) und für den Zeitraum vom 1. Januar 2013 bis 31. Dezember 2013 (11. Tätigkeitsbericht der ZES) dargestellt. Die Tätigkeitsberichte sind unter anderem auf den Internetseiten des Bundesministeriums für Gesundheit veröffentlicht (<http://www.bmg.bund.de/glossarbegriffe/z/zentrale-ethik-kommission-fuer-stammzellenforschung-zes.html>).

2 Stand der Forschung mit pluripotenten menschlichen Stammzellen

2.1. Einleitung

Der den Berichtszeitraum der Jahre 2012 und 2013 umfassende sechste Erfahrungsbericht der Bundesregierung zur Durchführung des Stammzellgesetzes gibt einen Überblick über die aktuellen Entwicklungen zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) und mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) sowie über aktuelle Entwicklungen zu anderen Quellen für biomedizinisch einsetzbare Stammzellen. Erneut werden nur die für diesen Bericht relevanten fachlichen Grundlagen dargestellt. Für allgemeine Aspekte wird auf die vorherigen Berichte verwiesen.

Der erste Erfahrungsbericht der Bundesregierung zur Durchführung des Stammzellgesetzes (Bundestagsdrucksache 15/3639 der 15. Wahlperiode vom 3. August 2004) beinhaltete die Rahmenbedingungen, Ergebnisse und Ausblicke der Grundlagenforschung und mögliche zukünftige Einsatzgebiete von embryonalen und adulten Stammzellen in der modernen Medizin bis einschließlich 2003. Im folgenden zweiten Erfahrungsbericht (Bundestagsdrucksache 16/4050 der 16. Wahlperiode vom 11. Januar 2007) wurden 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 beschrieben. Der dritte Erfahrungsbericht (Bundestagsdrucksache 16/12956 der 16. Wahlperiode vom 7. Mai 2009) befasste sich mit weiteren wissenschaftlichen Erkenntnissen bis einschließlich 2007, wobei die Charakterisierung, Standardisierung und der experimentelle Einsatz humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) im Vordergrund standen. Im vierten Erfahrungsbericht (Drucksache 7/4760 der 17. Wahlperiode vom 10. Februar 2011) wurde die Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) breit dargestellt und auf die Unterschiede zwischen hiPS-Zellen und hES-Zellen, sowie unter hES-Zellen untereinander eingegangen. Im fünften Bericht (Bundestagsdrucksache 17/12882 der 17. Wahlperiode vom 14. März 2013) wurde unter anderem auf die Entwicklung von In-vitro-Testmethoden für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen sowie auf die Entwicklung von stammzellbasierten Therapien eingegangen.

Im vorliegenden sechsten Erfahrungsbericht wird besonderes Augenmerk auf neue Methoden zur punktgenauen genetischen Veränderung von pluripotenten Stammzellen, auf die Fortschritte bei der direkten Umprogrammierung (Transprogrammierung) eines somatischen Zelltyps in einen anderen sowie auf die Vorbereitung von klinischen Studien mit aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleiteten Zelltransplantaten gerichtet.

2.2. Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien

Wie im fünften Stammzellbericht dargestellt wurde, werden weltweit weiterhin neue hES-Zelllinien generiert, so dass die Zahl der verfügbaren hES-Zelllinien kontinuierlich ansteigt. Aus dem laufenden Berichtszeitraum gibt es keine aktuellen Erhebungen, die eine eindeutige Anzahl an neu generierten hES-Zelllinien fundiert benennt. Insgesamt aber nehmen weiterhin Forschungsarbeiten aus den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) eine führende Rolle in der Forschung mit hES-Zellen ein. Daher kann das hES-Zell-Register des US-amerikanischen National Institute of Health (NIH) als gute Quelle angesehen werden, um die Anzahl neuer hES-Zelllinien in den letzten Jahren exemplarisch zu erfassen. Bis einschließlich des Jahres 2011 wurden im NIH-Register 142 hES-Zelllinien für die Forschung mittels NIH-Förderung zugelassen. In den Jahren 2012 und 2013 wurden weitere 56 beziehungsweise 45 neue hES-Zelllinien hinzugefügt. Ein Teil dieser Zelllinien wurde möglicherweise bereits vor einigen Jahren generiert und erst später zur Aufnahme in das NIH-Register angemeldet. Aus der Gesamtzahl der neueren Linien lässt sich aber deutlich ablesen, dass im internationalen Forschungsfeld weiterhin neue hES-Zelllinien generiert werden. Allerdings ist weiterhin die Fokussierung der internationalen Forschung auf eine überschaubare Anzahl von Standard- bzw. Referenz-hES-Zelllinien zu beobachten. Ursache hierfür könnte sein, dass sich auch im aktuellen Berichtszeitraum keine substantiell neuen Bedingungen zur Ableitung und zur weiteren Kultivierung von hES-Zellen durchgesetzt haben.

Für die Kultivierung von hES-Zellen und hiPS-Zellen wurden zwischenzeitlich verschiedene Zellkultur-Nährmedien entwickelt und stehen für die Kultivierung dieser Zellen unter Nährzell-freien und Xenogen-freien Bedingungen zur Verfügung. Solchermaßen kultivierte Zellen finden insbesondere für die Industrie-unterstützte Forschung zu neuen Wirkstoffen oder zur Standardisierung von Differenzierungsprotokollen Anwendung.

2.3. Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen

Eine Zusammenstellung von Daten zum internationalen Stand der Stammzellforschung des europäischen Verbundes *EuroStemCell*, des *Institute for Integrated Cell-Material Sciences* (iCeMS, Kyoto, Japan) und der Editorinnen von „*Cell*“ beziehungsweise „*Cell Stem Cell*“ (Elsevier Inc., Philadelphia, USA) zeigt, dass die meisten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zum gesamten Themenspektrum der Stammzellforschung weiterhin aus den USA stammen (EuroStemCell et al., 2013). Nach den USA (rd. 8000 Publikationen) folgt China mit rd. 3000 Publikationen und Deutschland mit rd. 1800 Publikationen an dritter Stelle. Gemäß dieser Erhebung ging im Jahr 2011 erstmals die Zahl der Publikationen zu hES-Zellen zurück und wurde von der weiterhin ansteigenden Zahl an Publikationen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) übertroffen. Allerdings wurde bei den iPS-Zell-Arbeiten nicht zwischen hiPS-Zellen und Zellen anderer Spezies unterschieden, so dass die Anzahl an Veröffentlichungen mit hiPS-Zellen wahrscheinlich noch deutlich unter der Zahl an hES-Zell-Publikationen liegt. Dieser Trend setzte sich im Jahr 2012 fort, wobei weltweit 1061 Veröffentlichungen zu iPS-Zellen gegenüber 642 Veröffentlichungen zu hES-Zellen und 2875 Publikationen zu ES-Zellen aller Spezies aufgeführt werden.

In einer anderen Erhebung eines deutschen Autorenteam wird die klare Dominanz der US-amerikanischen Forschungsarbeiten zu hES-Zellen bestätigt (Löser et al., 2012). Es wird dargestellt, dass im 5-Jahreszeitraum 2007 bis 2011 von weltweit 1719 Publikationen zu hES-Zellen 714 Arbeiten aus den USA stammen (41,5 %) und 39 Arbeiten aus Deutschland (2,3 %). Im gleichen Zeitraum gab es weltweit 512 Veröffentlichungen zu hiPS-Zellen, von denen 261 (51,0 %) aus den USA und 22 (4,3 %) aus Deutschland stammen.

Im Folgenden sind einige wichtige Bereiche der Forschung an hES-Zellen während des Berichtszeitraums 2012 bis 2013 dargestellt.

2.3.1. Erkenntnisse aus dem Vergleich von hES- und Maus-ES-Zellen und bestimmende Merkmale pluripotenter Stammzellen

Wie bereits in vorangehenden Stammzellberichten dargestellt, unterscheiden sich Maus-ES-Zellen und hES-Zellen in ihrer Morphologie und in ihren typischen Kulturbedingungen. Während die Eigenschaften von klassischen Maus-ES-Zellen näher an denen der Inneren Zellmasse einer Blastozyste (Prä-Implantationsembryo) liegen, entsprechen die typischen hES-Zellen unter den üblicherweise verwendeten Kulturbedingungen eher Zellen eines Embryos im Epiblast-Stadium (Post-Implantationsembryo). Zwischenzeitlich findet die Hypothese allgemeine Anerkennung, dass *in vitro* mindestens zwei verschiedene Stadien von Pluripotenz vorliegen können: Die sogenannte naive Pluripotenz (analog der Inneren Zellmasse des Prä-Implantationsembryos) und die bestimmte Pluripotenz („primed pluripotency“; analog dem Epiblast-Stadium des Post-Implantationsembryos). Stammzellen im Stadium der bestimmten Pluripotenz können *in vivo* und *in vitro* Zelltypen aller drei Keimblätter bilden, scheinen aber in ihrer Fähigkeit zur Bildung von funktionalen Keimzellen beeinträchtigt zu sein.

Eine genauere Analyse von Maus-Epiblast-Stammzellen zeigt darüber hinaus, dass wenigstens zwei Untergruppen von Zellen unterschieden werden können: Zellen des frühen beziehungsweise des späten Epiblast-Stadiums (Han et al., 2010). Interessanterweise scheinen diese Untergruppen ineinander übergehen zu können, wobei anscheinend nur der kleinere Anteil (frühe Epiblast-ähnliche Stammzellen) die Fähigkeit hat, alle Gewebe und auch Keimzellen bilden zu können. Diese aus Epiblast-Zellen gebildeten Keimzellen scheinen jedoch nicht in vollem Umfang funktional zu sein.

Ein solches Stadium der bestimmten Pluripotenz kann auch durch die Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS-Zellen erreicht werden. Hierfür müssen diese allerdings unter geeigneten Zellkulturbedingungen kultiviert werden (Han et al., 2011). Die betreffende Arbeit zeigt außerdem, dass zumindest aus Zellen der Maus unter Verwendung der generellen Reprogrammierungsstrategie von Shinya Yamanaka nicht nur ES-Zell-ähnliche iPS-Zellen erzeugt werden können. Je nach Zellkulturbedingung können auch andere Zelltypen generiert werden. Damit kann diese Arbeit als Grundlage für eine Fülle weiterer Publikationen verstanden werden, die eine direkte Reprogrammierung von Fibroblasten in andere Gewebszellen mit unterschiedlichen Reprogrammierungsfaktoren und Zellkulturbedingungen beschreiben [siehe 2.4.5 und (Pfaff and Cantz, 2013)].

Die Arbeiten zu Epiblaststammzellen der Maus haben aber auch deswegen hohe Relevanz, weil diese Zellen den bisher etablierten hES-Zellen viel ähnlicher sind. Wie im fünften Erfahrungsbericht bereits dargestellt wurde, konnte eine Überführung von hES-Zellen in das Stadium der naiven Pluripotenz nur durch weitere Manipulation, wie etwa durch Überexpression des Transkriptionsfaktors Klf4, erreicht werden (Hanna et al., 2010). Neuerdings sind Zellkulturbedingungen beschrieben worden, die eine Etablierung von hES-Zellen und

hiPS-Zellen mit Eigenschaften der naiven Pluripotenz erlauben sollen (Gafni et al., 2013). Details dieser Studie werden allerdings noch kritisch diskutiert.

Zur Charakterisierung humaner pluripotenter Stammzellen wird im Wesentlichen weiterhin auf Tierexperimente zurückgegriffen. Hierbei wird überprüft, ob undifferenzierte Stammzellen nach der Transplantation in der Lage sind, Abkömmlinge aller drei Keimblätter zu bilden. In Zukunft wird man jedoch möglicherweise in der Lage sein, diesen sogenannten Teratom-Test durch In-vitro-Tests zu ersetzen [Pluritest, (Muller et al., 2011)] [ScoreCard, (Bock et al., 2011)]. Diese Tests finden momentan in der Fachwelt allerdings noch keine sehr breite Akzeptanz. Dies liegt wenigstens teilweise darin begründet, dass unklar ist, wie unterschiedlich humane pluripotente Stammzellen unter Standard-Kulturbedingungen sind und ob diese Unterschiede in den In-vitro-Verfahren ausreichend erfasst werden können. Eine Arbeit zu embryonalen Stammzellen der Maus konnte beispielsweise zeigen, dass eine Subpopulation von Stammzellen bestimmte Transkripte exprimiert, die sonst nur in 2-Zell Embryonen (2-cell embryos) nachweisbar sind (Abad et al., 2013). Solche „2-cell embryo“-ähnliche Zellen scheinen ein erweitertes Differenzierungspotenzial zu besitzen und zeigen auch eine Beteiligung am Trophektoderm, wenn sie in Chimerismus-Experimenten eingesetzt werden können. Ein ähnlich erweitertes Potenzial wurde auch für Zellen beschrieben, die im lebendigen Mausorganismus zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert wurden (Abad et al., 2013). Quasi im Nebenbefund wurden Daten erhoben, dass diese Zellen in Chimerismus-Experimenten auch eine Beteiligung am Trophektoderm aufweisen, weswegen ihnen gar totipotenähnliche Eigenschaften zugesprochen wurden. Diese Zuschreibung ist inhaltlich allerdings nicht zutreffend, da nicht definitiv gezeigt werden konnte, dass unterschiedliche Zellen aller drei Keimblätter und des Trophektoderms tatsächlich von einer einzigen Stammzelle gebildet wurden. Außerdem wurde die Fähigkeit zur Ganzheitsbildung „aus sich selbst heraus“ experimentell allenfalls unzulänglich untersucht und die präsentierten Daten stehen streng genommen im Widerspruch zu den sehr weitgefassten Aussagen des Autorenteam.

2.3.2. Unterschiede zwischen verschiedenen hES-Zelllinien

Wie in den vorherigen Erfahrungsberichten dargestellt, unterscheiden sich das Differenzierungs-Verhalten und andere Eigenschaften einzelner hES-Zelllinien in der Zellkulturschale deutlich. Zum Teil scheinen diese Unterschiede durch epigenetische Prägungen verursacht zu werden, die während der Ableitung der hES-Zelllinien entstehen. Es werden aber auch häufig auftretende genetische Veränderungen (subchromosomale Aberrationen) als Ursache für diese unterschiedlichen Eigenschaften diskutiert. Eine Studie der *International Stem Cell Initiative* hat unter Vorsitz von Peter Andrews (Sheffield, Großbritannien) die genetische Stabilität von hES-Zelllinien untersucht. (International Stem Cell Initiative et al., 2011): 61 (54 %) dieser Zellen waren europäischen Ursprungs, 31 (28 %) asiatischen Ursprungs, 12 (10 %) stammten aus Nahost beziehungsweise Osteuropa. Die übrigen Zelllinien waren afrikanischen, südasiatischen, oder südeuropäischen Ursprungs. Zusätzlich einiger weiterer Zelllinien wurde das Auftreten genetischer Abnormitäten in 120 hES-Zelllinien untersucht. Es konnte jedoch keine Häufung für bestimmte genetische Veränderungen in Abhängigkeit vom ethnischen Ursprung festgestellt werden. In 79 Proben konnten weder in den frühen noch in den späten Passagen der Kultivierung genetische Veränderungen festgestellt werden, was zeigt, dass sich die überwiegende Mehrzahl an hES-Zelllinien unter den aktuell zur Verfügung stehenden Zellkulturmethoden stabil weitervermehren lässt. 24 der 120 untersuchten Zelllinien wiesen einen normalen Karyotyp in den frühen Passagen, in den späten Passagen jedoch einen veränderten Karyotyp auf. Allerdings zeigte sich in 2 der 120 Zelllinien, dass trotz genetischer Veränderungen in den frühen Passagen wieder Zellen mit normalem Karyotyp in den späten Passagen auftreten können. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die jeweiligen Veränderungen (genetische Alteration oder aber Korrektur einer Abnormität) unter den Bedingungen der Zelllinienetablierung zwar ursprünglich entstanden waren, normale Zellen aber einen Wachstumsvorteil gegenüber den veränderten Zellen aufwiesen und diese dann über die weitere Kultivierung verdrängt haben.

Möglicherweise lässt sich das Ausmaß an genetischen Veränderungen mit besseren Zellkulturbedingungen weiter reduzieren. Es wird spekuliert, dass hES-Zelllinien die robust im Status der naiven Pluripotenz gehalten werden können, auch weniger anfällig für genetische Veränderungen wären.

2.3.3. Genetische Abnormitäten in embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Die Integrität des Erbgutes einer Zelle ist von großer Bedeutung für den Erhalt der normalen Zellfunktionen. Genetische Veränderungen kommen allerdings auch natürlicherweise in verschiedenen Körpergeweben (z. B. in der Leber) vor (Shuga et al., 2010). Genetische Veränderungen sind also nicht zwingend mit dem Verlust

von Zellfunktionen verbunden. Auch in frühen Embryonen kommen genetische Veränderungen häufig vor (Hardarson et al., 2003; Vanneste et al., 2009), viele von diesen gehen jedoch während der Embryonalentwicklung verloren, andere führen durch fehlerhafte Zellfunktionen zu Fehlgeburten. Chromosomale Veränderungen und Mutationen können jedoch nicht nur zum Verlust einzelner Zellfunktionen und zum Zelltod führen, sondern auch zu so genannten malignen Entartungen, also der Bildung von Tumorzellen. So sind ca. 90% aller Tumore beim Menschen aneuploid, d. h. einzelne Chromosomen sind mehrfach vorhanden oder fehlen (Albertson et al., 2003). Bei Tumorzellen ist zum einen die natürliche Kontrolle der Zellvermehrung außer Kraft gesetzt, zum anderen sind vielfach auch Strukturen auf der Oberfläche dieser Zellen verändert. Ähnlich wie Tumorzellen können auch genetisch veränderte Stammzellen ein erhöhtes Vermehrungspotenzial aufweisen und sich so in Stammzellkulturen gegenüber „normalen“ Zellen durchsetzen. Dieses Phänomen wird natürlich insbesondere bei der Herstellung großer Zellmengen relevant, z. B. für die Gewebezüchtung, das sogenannte „Tissue Engineering“.

Wie schon im vorhergehenden Bericht erläutert, gelten die zelleigenen DNA-Reparatur- bzw. Schutzmechanismen in pluripotenten Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zelllinien als besonders stark ausgebildet (Tichy, 2011). Das Risiko einer malignen Entartung sollte daher bei pluripotenten Stammzellen relativ gering sein. Trotzdem berichten eine ganze Reihe von Studien über das Auftauchen chromosomaler Veränderungen in Langzeitkulturen von embryonalen Stammzellen und iPS-Zellen (Übersicht in (Lund et al., 2012; Ronen and Benvenisty, 2012).

Für embryonale Stammzellen geht man davon aus, dass derartige Veränderungen entweder schon aus dem zugrunde liegenden Embryo stammen oder während der Zeit in der Zellkultur entstehen. Neben Veränderungen des Kerngenoms wurden unterdessen auch Veränderungen des mitochondrialen Genoms beobachtet (Van Haute et al., 2013). Ob dies große Auswirkungen auf die Zellfunktion hat, ist jedoch bisher weitgehend unbekannt. Für weitere Details zu genetischen Veränderungen von hES-Zellen wird außerdem auf den fünften Stammzellbericht verwiesen.

Bei iPS-Zellen spielen beim Auftreten genetischer Veränderungen, wie schon im vorherigen Bericht diskutiert, auch andere Mechanismen eine Rolle. Nach aktuellem Kenntnisstand unterscheiden sich ES-Zellen und iPS-Zellen nicht im Hinblick auf die Häufigkeit karyotypischer (mikroskopisch erkennbarer) Veränderungen (Taapken et al., 2011). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich beide Zelltypen in Hinblick auf die Häufigkeit kleinerer Veränderungen (Deletionen, Insertionen und Punktmutationen, so genannter „Copy Number Variations (CNVs)“ und „Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)“ (Ronen and Benvenisty, 2012).

Von Bedeutung für das Auftreten verschiedener Arten von Abnormitäten ist sicherlich der Mechanismus Ihrer Entstehung. So beruht der Verlust oder die Vermehrung ganzer Chromosomen auf fehlerhafter Chromosomentrennung während der Mitose. Größere strukturelle Veränderungen können im Gegensatz dazu durch DNA-Schädigungen verursacht werden. Diese treten insbesondere im Zusammenhang mit der alterungsbedingten Verkürzung der Chromosomenenden auf, der sogenannten Telomere. Kleinere genetische Veränderungen, z. B. Insertionen, Deletionen oder der Austausch einzelner Basenpaare, beruhen häufig auf dem Einfluß mutagener Substanzen oder Strahlungen. Während DNA-Schäden in pluripotenten Stammzellen meist schnell repariert werden, ist die Fehlerrate bei solchen Reparaturprozessen nicht immer gering. Verlässliche Daten zur Häufigkeit von verschiedenen genetischen Abnormitäten in humanen pluripotenten Stammzellen sind bisher leider nicht verfügbar.

Der Vergleich unterschiedlicher Reprogrammierungsmethoden und der dabei verwendeten Ausgangszelltypen ergab keine Hinweise auf Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit und Art von genetischen Veränderungen (Ronen and Benvenisty, 2012). Bisherige Daten lassen allerdings vermuten, dass die Häufigkeit kleinerer genetischer Veränderungen in iPS-Zellen höher ist als in ES-Zellen (Ben-David and Benvenisty, 2011). Einige kürzlich publizierte Studien deuten darauf hin, dass zumindest ein Teil der in iPS-Zellen nachgewiesenen Abnormitäten schon in der somatischen Ursprungszelle vorhanden waren (Gore et al., 2011; Young et al., 2012). Inwieweit das Alter des Spenders, der Ursprungszelltyp und die Zahl der Zellteilungen in vitro vor Reprogrammierung für die Häufigkeit genetischer Veränderungen bedeutsam ist, wird derzeit untersucht. Möglicherweise begünstigt schon der Reprogrammierungsprozess selbst mit den dabei ablaufenden und bisher weitgehend unverstandenen epigenetischen Prozessen die Anreicherung seltener abnormer Ursprungszellen. Auch kann es bisher nicht ausgeschlossen werden, dass während der Reprogrammierung vermehrt neue Mutationen entstehen (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011). In diesem Zusammenhang erscheint es kritisch, dass Maßnahmen, welche die Reprogrammierungseffizienzen erhöhen, teilweise gleichzeitig auch in die DNA-Reparaturmechanismen der Zelle eingreifen (Marion et al., 2009; Banito et al., 2009). Zwangsläufig muss also die weitere Optimierung von Reprogrammierungsprotokollen nicht nur auf höhere

Effizienz, kürzere Reprogrammierungszeit und vollständige Reprogrammierung, sondern auch auf die Vermeidung genetischer Schäden und unerwünschter epigenetischer Veränderungen gerichtet sein (Barrilleaux and Knoepfler, 2011). Die Entwicklung von Techniken zur Minimierung derartiger kulturbedingter Veränderungen steht noch aus. Erste Arbeiten dazu existieren allerdings bereits (Ji et al., 2014). Ebenso müssen für klinische Anwendungen noch definierte Protokolle zur strengen Qualitätskontrolle entwickelt werden.

2.3.4. Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen

Das Einbringen fremder Gensequenzen in hES-Zellen ist für unterschiedliche wissenschaftliche Fragestellungen und Anwendungen von Bedeutung. So ist die dauerhafte Einbringung von bestimmten Genabschnitten in das Stammzellgenom entscheidend für die Klärung grundlegender entwicklungsbiologischer Fragestellungen, für die Entwicklung pharmakologischer und toxikologischer Testsysteme oder für potentielle klinische Anwendungen von Stammzellderivaten (vgl. auch fünfter Stammzellbericht). Die „klassischen“ Gentransfer-Methoden führen zu einer zufälligen Integration des Transgens in das Genom der Wirtszelle mit allen damit verbundenen Nachteilen (vgl. auch fünfter Stammzellbericht).

Alternativ zur klassischen gentechnischen Modifikation sind mittlerweile relativ junge Technologien verfügbar, mit denen ausgewählte Faktoren für einen begrenzten Zeitraum in die Zelle eingebracht werden können, ohne das Erbgut der Zielzelle zu modifizieren (synthetische mRNAs, microRNAs, RNA-Viren; vgl. auch fünfter Stammzellbericht). Außerdem sind Methoden entwickelt worden, mit denen eine gezielte und effiziente Modifikation des menschlichen Genoms, auch in humanen pluripotenten Stammzellen, möglich ist (Hockemeyer et al., 2009; Zou et al., 2009). Derartige auf so genannten „Designernukleasen“ basierende Methoden sind generell geeignet, um krankheitsspezifische Mutationen in iPS-Zellen, die aus Patienten mit genetischen Erkrankungen wie z. B. der Sichelzellanämie (Sebastiano et al., 2011; Zou et al., 2011) isoliert wurden, zu korrigieren oder, z. B. für die Entwicklung von In-vitro-Krankheitsmodellen, zu nutzen (Soldner et al., 2011). Die Effizienz dieser neuen Genmodifikationstechnologien scheint dabei generell in hES- und iPS-Zellen vergleichbar zu sein.

Größter Nachteil der initialen Zink-Finger-Nuklease-Technologie (ZFN-Technologie) war die sehr aufwendige Entwicklung zielspezifischer ZFNs, die nur in wenigen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen zu leisten ist. Allerdings wurden unterdessen neue Techniken entwickelt, die einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen wie die ZFN. Die sogenannten TALE-Nukleasen (Transcription activator like effector) sowie das CRISPR/Cas9 System sind beide in Baukastensystemen auch für akademische Gruppen verfügbar. Sie sind relativ einfach zu konstruieren und mit begrenztem Arbeitsaufwand herstellbar (Gaj et al., 2013) und wurden bereits sehr erfolgreich in ES- und iPS-Zellen eingesetzt (Ding et al., 2013; Mali et al., 2013).

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 weitergeführt. Weiterhin ist umstritten, ob pluripotente Stammzellen auch aus adulten Geweben außerhalb der Keimbahn gewonnen werden können. Exemplarisch zeigt eine Arbeit (Miyaniishi et al., 2013), dass die zuvor gezeigte Isolation so genannter very small embryonic-like stem cells (VSEs) aus dem Knochenmark nicht wiederholt werden konnte. Die Existenz solcher Zellen muss daher grundsätzlich angezweifelt werden. In Verbindung mit den unter 2.4.4 beschriebenen Fortschritten werden daher iPS-Zellen heute als die vielversprechendste Alternative angesehen.

2.4.1. Kerntransfer-Verfahren

Nicht nur wegen der Vergabe des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin 2012 an John B. Gurdon und Shinya Yamanaka hat das Kerntransfer-Verfahren (somatic cell nuclear transfer, SCNT) im aktuellen Berichtszeitraum erneut Aufmerksamkeit gewonnen, sondern auch durch Arbeiten einer US-amerikanischen Forschergruppe um Shoukhrat Mitalipov. Diese konnte erstmals zeigen, dass der Kerntransfer auch mit humanen Zellen gelingen kann (Tachibana et al., 2013). John Gurdon konnte zunächst in den 1960er Jahren beim Krallenfrosch zeigen, dass (entkernte) Eizellen die Kerne somatischer Zellen wieder auf ein totipotes Stadium reprogrammieren können. Die auf diese Weise entstandenen Kerntransfer-Entitäten können eine weitgehend normale Embryonalentwicklung durchlaufen (Gurdon, 1960, 1962). Hierdurch war das biologische Dogma einer unumkehrbaren Differenzierung zu reifen Zellen während der Entwicklung zum adulten Organismus bereits in Frage gestellt. Nachdem dieses Verfahren mit der Geburt des Schafs Dolly erstmals für Säugetiere erfolgreich angewendet werden konnte (Wilmut et al., 1997), hat es noch eine weitere Dekade

gedauert bis erstmals Kerntransfer-Embryonen von nicht-humanen Primaten generiert wurden (Byrne et al., 2007). Auch wenn das vollständige Entwicklungspotenzial bis zur Lebendgeburt für solche Kerntransfer-Entitäten nicht gezeigt werden konnte (Sparman et al., 2010), lassen sich pluripotente Stammzellen aus diesen SCNT-Embryonen ableiten. Diese Arbeiten ließen sich nach Optimierung verschiedener Schritte schließlich auch erfolgreich auf den Kerntransfer humaner Zellkerne in humane Eizellen übertragen. Anschließend gelang auch die Erzeugung pluripotenter Stammzellen aus diesen SCNT-Entitäten (Tachibana et al., 2013). Das Autorenteam dieser Studie spekuliert, dass SCNT-Zellen im Vergleich zu iPS-Zellen sogar eine verlässlichere Quelle für Patienten-spezifische pluripotente Stammzellen darstellen könnten. Belege für diese Spekulation stehen jedoch noch aus. Aus heutiger Sicht bleibt festzuhalten, dass das methodisch und personell sehr aufwändige Verfahren des Kerntransfers wohl kaum einer Automatisierung und Miniaturisierung zugänglich ist, wie es bei der Herstellung von iPS-Zellen möglich ist¹.

2.4.2. Gewinnung von Stammzellen ausgehend von Keimzellen und deren Vorläuferzellen

Über die im fünften Erfahrungsbericht dargestellten Arbeiten hinaus, haben sich im aktuellen Berichtszeitraum nur wenig neue Ansätze zur Ableitung pluripotenter Stammzellen aus adulten Keimzellen ergeben. Erwähnenswert ist eine Arbeit, die aufdeckt, dass die primordialen Keimzellen in den Gonaden durch Stimulation der LIF/Stat3-abhängigen Signalkaskaden zu Keimzelltumoren werden können. Die gleichen Signalwege können dafür eingesetzt werden, solche Keimzellen in vitro in pluripotente, selbsterneuernde Stammzellen zu überführen (Leitch et al., 2013).

2.4.3. Fötale Stammzellen

Die Verwendung fötaler Stammzellen ist auch im aktuellen Berichtszeitraum in der Forschung nicht sonderlich in den Vordergrund gerückt. Bezüglich der in den letzten Stammzellberichten benannten klinischen Studien mit fötalen neuronalen Stammzellen berichtet die britische Firma ReNeuron Ltd. über erste klinische Erfolge bei einer Studie mit fötalen Stammzellen zur Behandlung von Schlaganfällen. Darüber hinaus wurden diese Zellen auch zur Behandlung der Mangeldurchblutung aufgrund von arteriellen Stenosen eingesetzt (Katara et al., 2014). Zwischenergebnisse aus den laufenden klinischen Studien wurden bisher nicht in wissenschaftlichen Fachartikeln veröffentlicht.

2.4.4. Fortschritte in der Reprogrammierung von Körperzellen

Für die Entwicklung der Methode zur Reprogrammierung ausgereifter Körperzellen in iPS-Zellen (Takahashi et al., 2007) wurde Shinya Yamanaka 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt. Seit der Erstbeschreibung im Jahr 2006 konnte diese Technologie in vieler Hinsicht stark verbessert werden. Auch hat sich das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen stark verbessert. Eine kürzlich in Nature Reviews Genetics publizierte Übersichtsarbeit bietet zu diesem Thema viele anschauliche Detailinformationen (Buganim et al., 2013).

In der Zwischenzeit scheint klar, dass sich die große Mehrheit, vermutlich sogar alle Körperzellen reprogrammieren lassen. Unterdessen wurden Reprogrammierungseffizienzen von bis zu 100% auch für humane Zellen erreicht (Rais et al., 2013). Zwar gibt es weiterhin deutliche Unterschiede für unterschiedliche Ausgangszelltypen im Hinblick auf die Effizienz der Reprogrammierung, generell stellt die Reprogrammierungseffizienz aber keine Limitation der Technologie mehr da. Unterdessen existieren außerdem Protokolle, welche die ausreichend effiziente Reprogrammierung von nicht-invasiv oder zumindest minimal-invasiv zu gewinnenden Zellquellen (z. B. Haarwurzeln oder Blutproben) ermöglichen (Aasen et al., 2008; Giorgetti et al., 2009; Haase et al., 2009).

Dabei stellt für rein wissenschaftliche Fragestellungen die recht kostengünstige Reprogrammierung unterschiedlichster Körperzellen mit Hilfe von integrierenden Retro- oder Lentiviren international in vielen Laboren immer noch die Standardmethodik dar. Anders als bei der potentiellen klinischen Anwendung ist hierbei die genomische Integration der Reprogrammierungsvektoren meist vernachlässigbar.

Für die Herstellung potentiell klinisch einsetzbarer iPS-Zellen stehen dagegen eine Reihe unterschiedlicher Technologien zur Verfügung, bei denen keine in das Genom inserierenden und damit potentiell Tumorauslösenden (onkogenen) Vektoren für das Einbringen der Reprogrammierungsfaktoren verwendet werden müssen (Gonzalez et al., 2011; siehe auch fünfter Stammzellbericht). Methoden der Proteintransduktion sind

¹ Verschieden Konsortien weltweit, u.a. auch eines des Kompetenznetzwerks Stammzellforschung NRW arbeiten an einer automatisierten iPS-Zellgenerierung. Siehe auch: <http://www.stemcellfactory.de/>

aufgrund des hohen Aufwandes und der geringen Effizienz in den vergangenen Jahren in den Hintergrund getreten. Die so genannten microRNAs (Pfaff et al., 2011) sowie verschiedene chemische Wirkstoffe (Zhang et al., 2012) werden momentan eher als reprogrammierungsförderlich jedoch nicht als alleinstehende Reprogrammierungsmethode angesehen. Dagegen haben sich für die Transgen-freie Reprogrammierung die schon kommerziell angebotenen Boten-RNA- und insbesondere auf Sendai-Virus basierende Methoden durchgesetzt, welche gut etabliert sind und hochwertige iPS-Zellen liefern können (Lieu et al., 2013).

Im Berichtszeitraum konnten in Deutschland zwar eine zunehmende Anzahl an Arbeiten mit humanen iPS-Zellen initiiert, bisher jedoch weiterhin nur von einer überschaubaren Zahl von Arbeitsgruppen, erfolgreich und hochrangig publiziert werden (International Stem Cell Initiative et al., 2011).

Unverändert nicht beantwortet ist die Frage, ob iPS-Zellen aus Patienten fortgeschrittenen Alters sowohl funktionell als auch im Hinblick auf genetische Veränderungen (siehe Abschnitt 2.3.3) die gleiche Qualität aufweisen wie ES-Zellen oder iPS-Zellen, die aus jungen Zellquellen, wie Nabelschnurblut, generiert wurden. Erste entsprechende Daten dürften dazu allerdings in naher Zukunft verfügbar sein.

Aufgrund der immer noch offenen Fragen zu Mechanismen und Optimierung der Reprogrammierung, bzw. zur Qualität und Verwendbarkeit der Zellen aus alternativen Quellen, wird es, wie bereits beschrieben, weiterhin zu einem unverändert hohen Bedarf an Forschungsprojekten mit hES-Zellen kommen, da diese Zellen häufig in Forschungsprojekten zum Vergleich unverzichtbar sind.

2.4.5. Transdifferenzierung und Transprogrammierung

Der Begriff der Dedifferenzierung bezeichnet die Umkehrung der Differenzierung von einer spezialisierten Zelle mit spezifischen Funktionen nicht bis hin zu einer pluripotenten Zelle (Reprogrammierung) sondern nur zu einer weniger differenzierten Vorläuferzelle mit einem in der Regel höheren Teilungspotenzial. Entsprechende Vorgänge sind aus Pflanzen bekannt und konnten in Wirbeltieren vor allem für Fische und Amphibien gezeigt werden, z. B. für die Reparatur geschädigter Herzen von Zebrafischen und Amphibien (Jopling et al., 2010). In Säugetieren findet man Dedifferenzierung z. B. in Schwannschen Zellen bei der Regeneration peripherer Nerven (Eguizabal et al., 2013). In der Zellkultur ist Dedifferenzierung z. B. für Oberflächenzellen der Atemwege beschrieben (Suprynowicz et al., 2012).

Im Gegensatz dazu meint Transdifferenzierung die Differenzierung von Zellen, die bereits auf eine bestimmte Gewebeart festgelegt sind, in andere Zelltypen verschiedener Gewebe, ohne dass dabei das Zwischenstadium pluripotenter Zellen durchlaufen wird. Während der Embryonalentwicklung kommen solche Transdifferenzierungsvorgänge natürlicherweise vor. Auch kann es in einzelnen Fällen bei Erwachsenen zu einer Transdifferenzierung kommen, wenn es krankheitsbedingt zur Bildung „ortsfremden“ Gewebes kommt. Dies ist z. B. der Fall bei der Bildung von Magen-Epithel in der Speiseröhre (Barret-Syndrom) als Antwort auf eine chronische Reflux-Krankheit. Eine gute Übersicht zu Dedifferenzierung und Transdifferenzierung bietet ein Artikel von Eguizabal et al. (Eguizabal et al., 2013).

Wie schon im vorhergehenden Bericht erläutert, konnte unterdessen zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass sich über künstlich eingebrachte Gene Fibroblasten und vermutlich auch andere Zelltypen (Davis et al., 1987) transdifferenzieren lassen. Bei dieser künstlich induzierten Transdifferenzierung wird dann alternativ auch von „Transprogrammierung“ gesprochen. Im Fall der neuronalen Transdifferenzierung erfolgt diese auch relativ effizient und erste Einblicke in zugrundeliegende Mechanismen wurden bereits gewonnen (Wapinski et al., 2013).

Auch ist es gelungen, *in vitro* und *in vivo* herzmuskelzellartige Zellen aus Fibroblasten zu generieren. Umstritten dabei ist allerdings, welche Effizienz der Transprogrammierung erzielt werden kann (Chen et al., 2012). Der Nachweis der Reproduzierbarkeit durch unabhängige Arbeitsgruppen steht ebenso noch aus. Außerdem wurde bisher nicht nachgewiesen, dass die generierten Kardiomyozyten tatsächlich funktionell sind oder ob sie nur einige Eigenschaften von Herzmuskelzellen besitzen (Yi et al., 2013). Derzeit muss daher festgehalten werden, dass die volle *In-vitro*-Transprogrammierung zu funktionellen Herzmuskelzellen technisch sehr schwierig und relativ ineffizient ist (Yi et al., 2013). Interessanterweise ließen sich höhere Effizienzen *in vivo* erzielen (Qian et al., 2012; Song et al., 2012), so dass eine *In-vivo*-Transprogrammierung beispielsweise einer Infarktnarbe denkbar erscheint.

Unklar ist allerdings weiterhin, inwieweit durch Transprogrammierung erzeugte Zellen therapeutische Anwendung finden können, oder ob die Erzeugung von iPS-Zellen und die anschließende gezielte Differenzierung zielführender ist.

Problematisch ist dabei, dass eine nennenswerte Effizienz der direkten Umwandlung von Fibroblasten über Transprogrammierung bisher nur über inserierende virale Vektoren erzielt werden kann. Hier muss das Problem der potentiellen Tumorbildung berücksichtigt werden, welches bisher noch nicht untersucht worden ist. Ob Alternativmethoden, die z. B. auf microRNAs (Jayawardena et al., 2012) oder auf chemischen Substanzen basieren, jemals effizient genug durchgeführt werden können, bleibt abzuwarten.

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

2.5.1. Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen

Im Vergleich zum fünften Stammzellbericht gab es in den unterschiedlichen Gebieten der Forschung zur Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen bemerkenswerte und z. T. enorme Fortschritte, welche zu einer spezifischeren, effizienteren und reproduzierbareren Differenzierung führten. Die erzielten Erfolge beruhen in der Regel auf Strategien, die es zum Ziel haben, die Induktion unterschiedlicher Gewebe- und Zelltypen über spezifische Faktoren, wie sie im Embryo stattfindet, auch an Stammzellen in der Kulturschale nachzuvollziehen. Mit entsprechenden Protokollen können unterdessen eine Vielzahl verschiedener Zelltypen in vitro aus humanen pluripotenten Zellen hergestellt werden. Darüber hinaus führte der Ersatz bestimmter Differenzierungsfaktoren, in der Regel Proteine, durch chemische Substanzen oftmals zu besser reproduzierbaren und vor allem kostengünstigeren Protokollen (z. B. (Chambers et al., 2012; Lian et al., 2013).

Auch wenn, inspiriert durch die von S. Yamanaka 2006 gemachten Entdeckungen im Bereich der Reprogrammierung, die „Transprogrammierung“ durch künstliches Einbringen von Genen in die Zellen vielerorts als eine weitere alternative Differenzierungsmethode untersucht wird (vgl. Kapitel 2.4.5 „Transdifferenzierung und Transprogrammierung“), sind größere Erfolge hier bisher ausgeblieben. Insgesamt scheint sich mehr und mehr die gezielte Differenzierung durch sequentiellen Einsatz chemischer Induktoren und Inhibitoren relevanter molekularer Signalwege in der Zelle als am vielversprechendsten herauszukristallisieren.

Generell scheint die schwankende Qualität der Ausgangszellkulturen eine der Hauptursachen für die trotz aller Fortschritte immer noch in praktisch allen Laboren auftretenden erheblichen Schwankungen der Differenzierungseffizienzen darzustellen. Hier fehlt es an kostengünstigen und verlässlichen Assays, die eine Aussage erlauben, ob sich die jeweils als Zellquelle verwendeten pluripotenten ES- oder iPS-Kulturen effizient in bestimmte Subtypen differenzieren lassen.

Differenzierung in neuroektodermale Zellen (Zellen des Nervensystems)

Ein wichtiges Forschungsgebiet stellt unverändert die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu verschiedenen neuronalen Zelltypen dar. Auch in den für den vorliegenden Bericht relevanten Jahren wurden weiter optimierte Protokolle für die gezielte Differenzierung verschiedener neuronaler Zelltypen entwickelt, die als Ausgangsmaterial für mögliche Therapien in Betracht kommen können (Sandoe and Eggan, 2013). So wurden weitere Signalwege identifiziert, welche bedeutsam für eine gezielte Differenzierung von hES- und iPS-Zellen z. B. zu funktionellen dopaminergen Neuronen sind (Studer, 2012) und Differenzierungsprotokolle auf chemisch synthetisierten Wirkstoffen wurden entwickelt (Chambers et al., 2012). Auch die Effizienz und Verlässlichkeit von Differenzierungsprotokollen zur Herstellung von Neuronen mit Nozirezeptoren (Schmerzrezeptoren; Chambers et al., 2012), GABA-ergen Neuronen (Kaye and Finkbeiner, 2013), Motoneuronen (Chipman et al., 2012), dopaminergen Neuronen (Studer, 2012), Photorezeptoren (Carr et al., 2013), Astrozyten (Gupta et al., 2013) oder Oligodendrozyten (Alsanie et al., 2013) wurde im Berichtszeitraum deutlich gesteigert (Chambers et al., 2012).

Differenzierung in mesodermale Zellen

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeiten mit hES-Zellen ist unverändert die gezielte Differenzierung zu mesodermalen Zelltypen.

Von großer Bedeutung für die Transfusionsmedizin wäre die effiziente Herstellung kernloser roter Blutzellen (Erythrozyten) und Blutplättchen, aus denen im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen keine Tumorzellen entstehen können. Kernlose Zellen erscheinen daher für einen solchen Einsatz weniger risikobehaftet zu sein. Auch wenn die Herstellung unreifer Erythrozyten schon vor Jahren gelungen ist (Lu et al., 2008), gestaltete sich die Herstellung voll ausgereifter Zellen im großem Maßstab unter definierten Bedingungen bisher allerdings noch als schwierig (Baron, 2013; Ebihara et al., 2012). Unterdessen scheint die Herstellung klinisch einsetzbarer

Präparate aber in greifbare Nähe gerückt. Ähnliche Fortschritte wurden auch für die Herstellung von Blutplättchen erzielt (Lambert et al., 2013).

Die Herstellung von Zellen der Blutgefäße (Kane et al., 2011) ist für die vaskuläre Regeneration (Descamps and Emanuelli, 2012) und für das Tissue Engineering von Blutgefäßen von großer Bedeutung. Basierend auf zuvor entwickelten Zellkulturprotokollen, welche eine effiziente Differenzierung von hES- und iPS-Zellen erlauben (Tan et al., 2013), ist unterdessen die gezielte Differenzierung von Endothel (Drukker et al., 2012; Lippmann et al., 2012) und glatten Muskelzellen (Majesky and Mummery, 2012) möglich. Auch hier sind zunehmend chemische Signalstoffe von Bedeutung.

Von hohem klinischem Interesse sind auch Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), welche unter anderem verwendet werden könnten, um nach einem Herzinfarkt die Funktionalität des Herzmuskels wieder herzustellen. Auf diesem Gebiet sind unterdessen sehr große Fortschritte zu verzeichnen. Auch wenn es immer noch nicht möglich ist, gezielt Subtypen von Herzmuskelzellen herzustellen, sind unterdessen Protokolle verfügbar, die unabhängig von der verwendeten Linie die Herstellung von bis zu 90% reinen Kardiomyozyten aus humanen ES- und iPS-Zellen ermöglichen (Lian et al., 2013).

Im Gegensatz zu Herzmuskelzellen wären Skelettmuskelzellen bzw. deren Vorläufer eine wichtige Grundlage für Zelltherapien z. B. von muskulären Dystrophien (Darabi et al., 2012). Auch bei der Differenzierung zu funktionellen Skelettmuskelvorläufern sind deutliche Fortschritte zu verzeichnen (Darabi et al., 2012), auch wenn hier die entsprechend definierten Protokolle bisher fehlen und die erzielten Effizienzen weiterhin unzureichend sind.

Obwohl es möglich ist, Knochen- und Knorpelzellen aus humanen ES-Zellen zu differenzieren (Oldershaw et al., 2010), und die Herstellung solcher Zellen aus unbegrenzt vermehrbaren ES- bzw. iPS-Zellen besonders zur Reparatur größerer Knochen- und Knorpeldefekte große Vorteile hätte, waren nur wenige Aktivitäten und Fortschritte auf diesem Gebiet im Berichtszeitraum zu verzeichnen. Vermutlich liegt dies daran, dass Knochen und Knorpelzellen auch aus körpereigenen adulten Stammzellen gewonnen (z. B. aus Fettgewebe) und damit voraussichtlich in großen Mengen zur Verfügung gestellt werden könnten.

Differenzierung in endodermale Zellen

Wie schon im fünften Stammzellbericht erwähnt, steht im Hinblick auf die große Bedeutung von Lungenerkrankungen auch die Herstellung von Zellen der Lunge aus embryonalen Stammzellen zunehmend im Fokus der Forschung. Nachdem 2011 der erste überzeugende Bericht zur gezielten Differenzierung von hES- und iPS-Zellen zu Lungenvorläuferzellen erschienen war (Green et al., 2011), gab es im Berichtszeitraum weitere bedeutende Fortschritte zur gezielten und effizienten Differenzierung zu Lungenvorläuferzellen und Atemwegsgeweben aus ES- und iPS-Zellen (Longmire et al., 2012; Mou et al., 2012; Wong et al., 2012).

Hinsichtlich der Generierung von Leberzellen (hepatische Zellen) aus hES- und hiPS-Zellen wurden zwischenzeitlich die Differenzierungsprotokolle weiter verfeinert, um eine robustere Ableitung hepatischer Zellen aus pluripotenten Stammzellen zu erlauben. Beispielsweise kann dabei unter Verwendung von Selektionssystemen die Reinheit der hepatischen Zellpopulation deutlich gesteigert werden (Sgodda et al., 2013). Außerdem zeigen einige Arbeiten auf, dass ein verbessertes Verständnis der molekularen Mechanismen während der hepatischen Differenzierung (Greenhough et al., 2013) auch eine Produktion solcher Zellen in großer Anzahl ermöglichen könnte. Bisher scheinen aber die stammzellabgeleiteten hepatischen Zellen in ihrem Reifestadium zwar nur fötalen Hepatoblasten zu ähneln, doch konnten solche Zellen schon erfolgreich für die pharmakotoxikologische Testung verwendet werden (Szkolnicka et al., 2014). Zudem konnten hepatische Zellen generiert werden, die den Replikationszyklus von Hepatitis C-Viren unterstützen und somit als Zellkultursystem für Untersuchungen neuer Wirkmechanismen dienen könnten (Schwartz et al., 2012a). Zudem konnten aus hiPS-Zellen abgeleitete Leberzellen auch schon erfolgreich zur Identifizierung neuer Wirkstoffe für metabolische Lebererkrankungen eingesetzt werden. Beispielsweise konnte das bisher hauptsächlich zur Behandlung von Epileptikern eingesetzte Medikament Valproinsäure als potentiell wirksam zur Behandlung der alpha1-Antitrypsindefizienz entdeckt werden (Choi et al., 2013).

Differenzierung in Keimzellen

Es zeichnet sich ab, dass mit den gegenwärtig zur Verfügung stehenden Techniken eine ausschließliche In-vitro-Differenzierung nicht zu funktionalen Eizellen oder Spermien führt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten aber mit Mauszellen zeigen, dass eine Strategie, die eine In-vitro-Differenzierung mit einer Ausreifung in vivo kombiniert, zu funktionalen Keimzellen führen kann (Cai et al., 2013). In dieser Arbeit diskutieren die

Autoren, dass ein solches In-vitro- und In-vivo-Differenzierungssystem als Modell dienen kann, um die weitere meiotische Teilung von Spermatozyten in reife Spermatiden untersuchen und auf diese Weise funktionale männliche Gameten aus Stammzellen generieren zu können. Auf ähnliche Weise wurden ebenfalls im Mausmodell bereits aus weiblichen Stammzell-abgeleiteten Gameten funktionale Eizellen erzeugt. Dabei wurden aus murinen, weiblichen embryonalen Stammzellen beziehungsweise induzierten pluripotenten Stammzellen unreife Keimzellen in vitro differenziert und mit Zellen aus fötalen Gonaden zusammengebracht. Anschließend wurden diese Konstrukte in Mäuse transplantiert. Nach viermonatiger In-vivo-Reifung wurden die transplantierten Keimzellgewebe wieder entnommen und es konnten reife Eizellen isoliert werden. Aus den Eizellen ließ sich im Anschluss lebensfähiger Nachwuchs erzeugen (Hayashi et al., 2012).

Es wird zwar spekuliert, dass sich viele dieser Arbeiten auch auf humane pluripotente Stammzellen übertragen ließen, doch eine Generierung funktionaler, humaner Gameten aus pluripotenten Stammzellen ist bisher noch nicht gelungen. Immerhin zeigen aber zwei Arbeiten aus dem Labor von Renee Reijo Pera, dass die Transplantation reprogrammierter, pluripotenter humaner Stammzellen in die Hoden von Mäusen zu einer Differenzierung in humane Gameten führen kann (Durruthy Durruthy et al., 2014; Ramathal et al., 2014). Diese Gameten weisen Charakteristika von fötalen Keimzellen auf, wobei noch ungeklärt ist, ob auch tatsächlich reife Spermatiden generiert werden könnten.

2.5.2. Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen

Wie schon im letzten Stammzellbericht angedeutet, werden iPS-Zellen derzeit schon im großen und weiter zunehmendem Umfang für die Erforschung genetischer Erkrankungen und der zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen verwendet. Erste wichtige Erkenntnisse zu verschiedenen Erkrankungen, die mit den bisher verfügbaren Methoden nicht zu erlangen gewesen wären, wurden bereits gewonnen. So wurden beispielsweise einige zugrundeliegende Mechanismen der Parkinsonschen Erkrankung (Miller et al., 2013; Reinhardt et al., 2013) oder der arrhythmogenen rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Kim et al., 2013) aufgeklärt. Damit zeichnet sich schon jetzt ein hoher klinischer Nutzen der iPS-Zellen auch für das Verständnis komplexer Erkrankungen und die damit mögliche Entwicklung neuer Therapien ab (Siller et al., 2013).

Bis Ende 2013 wurden bereits für eine große Zahl unterschiedlicher Erkrankungen patientenspezifische iPS-Linien generiert, charakterisiert und z. T. auch genetisch korrigiert (siehe Kap. 2.3.4). Darunter sind z. B. neurologische Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose (Egawa et al., 2012), spinale Muskelatrophie (Nihei et al., 2013) und die parkinsonsche Erkrankung (Ryan et al., 2013), Lebererkrankungen wie die Typ I Glykogenspeicherkrankheit (Rashid et al., 2010) oder die familiäre Hypercholesterinämie (Rashid et al., 2010), Herzerkrankungen wie die familiäre hypertrophen Kardiomyopathie (Lan et al., 2013) und das Long QT-Syndrom (Moretti et al., 2010), oder auch Lungenerkrankungen wie die pulmonale alpha-1-Antitrypsindefizienz (Yusa, 2013) und die Mukoviszidose (Mou et al., 2012).

Vergleichbare Arbeiten werden im Ausland auch weiterhin mit hES-Zellen durchgeführt, die nach In-vitro-Fertilisation und Präimplantationsdiagnostik gewonnen wurden (s. z. B. (Guan et al., 2012). Da § 4 Absatz 2 Nummer 1 Buchstabe b StZG die Einfuhr solcher Stammzelllinien verbietet, sind solche Arbeiten nicht in Deutschland durchführbar.

Von zunehmender Bedeutung für iPS-basierte Krankheitsmodelle ist die Herstellung von sogenannten Organoiden in der Kulturschale (Lancaster et al., 2013), welche die Komplexität ganzer Gewebe und Organe zumindest zum Teil widerspiegeln können.

2.5.3. Pharmakologische / Toxikologische Substanztestung & Wirkstoffscreening

Die Entwicklung stammzellbasierter In-vitro-Testmethoden für Toxikologie und Arzneimittelentwicklung stellt, wie schon im fünften Stammzellbericht dargelegt, weltweit einen wichtigen Schwerpunkt der Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen dar.

Auf humanen Stammzellen basierende Testsysteme können der Reduzierung von tierexperimentellen Studien dienen und besitzen potentiell im Vergleich dazu eine höhere Datenqualität und bessere Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus, auch gegenüber existierenden In-vitro-Systemen.

Auch auf europäischer Ebene wird die Entwicklung solcher Tests zurzeit gezielt gefördert (z. B. im Rahmen des „STEMBANCC“-Konsortiums², <http://stembancc.org/>). Auch die Pharmaindustrie investiert derzeit massiv in eigene Forschergruppen, die sich mit der Verwendung insbesondere patientenspezifischer iPS-Zellen

² siehe auch http://www.laborwelt.de/fileadmin/dateien_transkript/PDF/2013_07_tk-Spez_LB_Zellbasiertes-Screening_01.pdf

für das Wirkstoffscreening beschäftigen. Zumindest im industriellen Bereich scheinen hier hES-Zellen eine nur geringe Bedeutung zu haben.

Bedeutsam für das Wirkstoffscreening sind verschiedene Eigenschaften von iPS-Zellen:

- i) Die routinemäßige Herstellung von humanen iPS-Zellen ist auch aus nicht- oder minimalinvasiv isolierbaren Zellquellen wie Haarwurzeln oder Blut möglich.
- ii) Definierte Kulturbedingungen für die skalierbare kontrollierte Expansion sind verfügbar (Olmer et al., 2012).
- iii) Effiziente Methoden der genetischen Modifikation von iPS-Zellen sind verfügbar.
- iv) iPS-Zellen lassen sich in unterschiedlichste Zelltypen differenzieren, so dass organspezifische Wirkstoffeffekte untersucht werden können (z. B. im Fall der Mukoviszidose an Lungenepithel und Gallengangsepithel).
- v) In patientenspezifischen iPS-Zellen lässt sich der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf Wirkstoffeffekte untersuchen.
- vi) Es können auch Screenings auf neue Wirkstoffe für komplexe multigenetische Erkrankungen durchgeführt werden.
- vii) Kandidatenwirkstoffe können an iPS-Zell-Derivaten unterschiedlicher Patienten auf unerwünschte Nebenwirkungen getestet werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Entwicklung stammzellbasierter In-vitro-Testmethoden für Toxikologie und Arzneimittelentwicklung sowohl in der Industrie als auch im akademischen Bereich auf Hochtouren läuft und einen wichtigen Schwerpunkt der Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen darstellt. Auch wenn basierend auf den entsprechenden Technologien noch keine neuen Medikamente bis zur Zulassungsreife entwickelt werden konnten, belegt die massive Aktivität der Pharmaindustrie in diesem Bereich, dass auch in der Industrie große Hoffnung in die iPS-Technologie gesetzt wird.

2.5.4. Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Auch wenn der Schwerpunkt der angewandten Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen sicherlich derzeit im Bereich der Krankheitsmodelle und der Wirkstoffforschung zu sehen ist, werden zurzeit in verschiedensten Bereichen Zelltherapiekonzepte experimentell in Klein- und Großtieren getestet. Darüber hinaus wurden im Berichtszeitraum auch klinische Studien vorbereitet und durchgeführt.

Im Fokus dieser klinischen Studien steht vor allem die Verwendung von ES-Zell-abgeleitetem pigmentiertem Epithel für die Zelltherapie von Augenerkrankungen wie der trockenen Makuladegeneration, die zur Erblindung führen kann. Die Verwendung von allogenen, körperfremden Zellen ist bei dieser Applikation weniger problematisch, weil die Zellschichten der Netzhaut bzw. Aderhaut im Augeninneren als „immun-privilegiert“ anzusehen sind und somit keine schweren Abstoßungsreaktion zu erwarten sind.

Folgende klinische Zelltherapie-Studien, die auf ES-Zellen basieren und von den verantwortlichen Behörden genehmigt worden sind, wurden im Berichtszeitraum initiiert bzw. fortgesetzt (Quelle: ClinicalTrials.gov):

| Studie | Kennnummer | Land |
|--|-------------|------------|
| Safety study of GRNOPC1 in Spinal Cord Injury | NCT01217008 | USA |
| Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure (ESCORT) | NCT02057900 | Frankreich |
| Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived Retinal Pigmented Epithelial (hESC-RPE) Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy (SMD) | NCT01469832 | UK |
| A Phase I/IIa, Open-Label, Single-Center, Prospective Study to Determine the Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived | NCT01674829 | Korea |

| Studie | Kennnummer | Land |
|---|-------------------|-------------|
| Retinal Pigmented Epithelial(MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age-related Macular Degeneration(AMD) | | |
| Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE(MA09-hRPE)Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy | NCT01345006 | USA |
| Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age Related Macular Degeneration (Dry AMD) | NCT01344993 | USA |
| Safety and Tolerability of MA09-hRPE Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy(SMD) | NCT01625559 | Korea |

Ein in 2012 unter Mitwirkung der beteiligten Firma veröffentlichter Zwischenbericht zu zwei der Studien (NCT01345006, NCT01344993) beschreibt keine erheblichen Nebenwirkungen durch die Behandlung (Schwartz et al., 2012b). Außerdem wird auch über die erste klinische Zelltherapie-Studie unter Verwendung hiPS-Zellen berichtet. Auch im Fokus dieser Studie steht die Behandlung der Macula Degeneration (Quelle: http://www.riken.jp/en/pr/press/2013/20130730_1/).

3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich auch in der aktuellen Berichtsperiode der potentielle Nutzen humaner embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen (hES- und hiPS-Zellen) für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Wirkstoffe deutlich konkretisiert hat. Dabei dient die Forschung unter Verwendung von hES-Zellen weiterhin vorrangig der Gewinnung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse in der Grundlagenforschung.

Das Forschungsfeld der Stammzellbiologie hat mit der Vergabe des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin des Jahres 2012 an John Gurdon und Shinya Yamanaka für ihre bahnbrechenden Arbeiten zur Reprogrammierung somatischer Zellen eine Aufwertung erfahren. Die Reprogrammierung somatischer Zellen hat sich weltweit innerhalb sehr kurzer Zeit als Methode zur Generierung von pluripotenten Stammzellen etabliert. Es zeichnet sich darüber hinaus ab, dass auch die direkte Umprogrammierung (die Transprogrammierung) von einem somatischen Zelltyp in einen anderen effizient genutzt werden kann. Viele verschiedene Zelltypen ließen sich auf diese Weise bereits herstellen. Es bleibt aber abzuwarten, ob und inwieweit reprogrammierte bzw. umprogrammierte Zelltypen für Fragestellungen der regenerativen Medizin einsetzbar sind. Als problematisch werden hier die möglicherweise auftretenden genetischen Veränderungen in solchen Zellen diskutiert, welche ggf. die Entstehung von Tumorzellen begünstigen könnten.

Im Hinblick auf die Erforschung der Rolle definierter genetischer Mutationen bei der Krankheitsentwicklung – und möglicherweise von besonderer Bedeutung für eine zukünftige Verwendung von iPS-Zellen als Zelltransplantat – konnten Verfahren zur punktgenauen genetischen Modifikation entwickelt bzw. weiter verbessert werden. Diese neuen Techniken erlauben mit recht hoher Effizienz eine nahtlose Reparatur von Gendefekten bzw. das gezielte Einbringen bestimmter Veränderungen in das Erbgut pluripotenter Stammzellen. Damit eröffnen sich neue Perspektiven zur Aufklärung der molekularen und zellbiologischen Ursachen monogenetischer aber auch multifaktorieller Erkrankungen. Nach wie vor müssen jedoch auch grundlegende Fragen, wie z. B. Mechanismen der molekularen Reprogrammierung oder die Induktion von Pluripotenz, weiter untersucht werden.

Mittlerweile hat der Umfang der Forschungsarbeiten mit hiPS-Zellen die Dimension der Forschung mit hES-Zellen erreicht. In der translationalen Forschung zu Krankheitsmechanismen und in der Wirkstoff-Forschung haben sich hiPS-Zellen als geeignetes Ausgangsmaterial für die Gewinnung dringend benötigter menschlicher Zellen etabliert. Für viele Fragen der Grundlagenforschung zur Regulation von Pluripotenz oder zu den molekularen Mechanismen von Differenzierungsvorgängen werden hES-Zellen aber weiterhin in hohem Umfang genutzt. Im Bereich zelltherapeutischer Anwendungen kommen iPS-Zellen bisher kaum zum Einsatz. In fast allen klinischen Studien, die weltweit derzeit unter Verwendung humaner pluripotenter Stammzellen durchgeführt werden, werden gut charakterisierte hES-Zelllinien als Ausgangsmaterial verwendet. Die entsprechenden Studien, die in den USA, Großbritannien, Frankreich und Südkorea durchgeführt werden, zielen vor allem auf die Entwicklung neuer Therapien für verschiedene Formen der Makuladegeneration, aber auch auf die Therapie von Rückenmarksverletzungen, Herzinfarkt oder Diabetes mellitus. In der Grundlagenforschung werden hES-Zellen weiterhin als Standard-Zellsystem eingesetzt. So werden hES-Zellen zur Optimierung der Kulturbedingungen für eine möglichst effiziente und mutationsfreie Vermehrung pluripotenter Stammzellen, zur Etablierung robusterer Differenzierungsprotokolle sowie zur Erforschung grundlegender Differenzierungsvorgänge während der frühen Embryonalentwicklung genutzt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass für immer mehr Anwendungsszenarien geeignete Methoden zur Herstellung funktionaler, transplantierbarer Zelltypen aus hES- und hiPS-Zellen entwickelt werden konnten. Die Umsetzung dieser Erkenntnisse in präklinische und klinische Studien wird weltweit weiter vorangetrieben. Es wird auch künftig notwendig sein, die sich diversifizierende und gegenseitig ergänzende Forschung mit verschiedenen Typen pluripotenter humaner Stammzellen einschließlich hES-Zellen weiterzuverfolgen.

In Deutschland wurde durch das Stammzellgesetz die Forschung mit hES-Zellen ermöglicht, ohne den durch das Embryonenschutzgesetz gewährleisteten Schutz menschlicher Embryonen einzuschränken. Die bis Ende 2013 bewilligten 88 Forschungsvorhaben unter Verwendung von hES-Zellen, von denen im Berichtszeitraum 19 genehmigt worden sind, zeigen, dass die durch das Stammzellgesetz eröffneten Möglichkeiten weiterhin wahrgenommen werden und ein unvermindertes Interesse an der Forschung unter Verwendung von hES-Zellen besteht.

4 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 Differenzierungspotenzial.

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 zurückgehen, sondern auf eine vererbte 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 zellularen 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.

hES: 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 Entwicklungsstadien 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 Gewebear ten 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.

Transprogrammierung: Künstlich hervorgerufene Transdifferenzierung durch Einführen spezifischer Steuerungsgene

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/DE/Content/Gesund/Stammzellen/stammzellen_node.html

5 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. *Nature biotechnology* 26, 1276-1284.
- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., Grana, O., Megias, D., Dominguez, O., Martinez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPSC cells with totipotency features. *Nature* 502, 340-345.
- Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., and Gray, J.W. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34, 369-376.
- Alsanie, W.F., Niclis, J.C., and Petratos, S. (2013). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocytes: protocols and perspectives. *Stem cells and development* 22, 2459-2476.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., *et al.* (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23, 2134-2139.
- Baron, M.H. (2013). Concise Review: early embryonic erythropoiesis: not so primitive after all. *Stem Cells* 31, 849-856.
- Barrilleaux, B., and Knoepfler, P.S. (2011). Inducing iPSCs to escape the dish. *Cell stem cell* 9, 103-111.
- Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11, 268-277.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., *et al.* (2011). Reference Maps of human ES and iPSC cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439-452.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., and Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nature reviews Genetics* 14, 427-439.
- 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.
- Cai, H., Xia, X., Wang, L., Liu, Y., He, Z., Guo, Q., and Xu, C. (2013). In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. *Biochemical and biophysical research communications* 433, 286-291.
- Carr, A.J., Smart, M.J., Ramsden, C.M., Powner, M.B., da Cruz, L., and Coffey, P.J. (2013). Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration. *Trends in neurosciences* 36, 385-395.
- Chambers, S.M., Qi, Y., Mica, Y., Lee, G., Zhang, X.J., Niu, L., Bilslund, J., Cao, L., Stevens, E., Whiting, P., *et al.* (2012). Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nature biotechnology* 30, 715-720.
- Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., *et al.* (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 8, 424-429.
- Chen, J.X., Krane, M., Deutsch, M.A., Wang, L., Rav-Acha, M., Gregoire, S., Engels, M.C., Rajarajan, K., Karra, R., Abel, E.D., *et al.* (2012). Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circulation research* 111, 50-55.
- Chipman, P.H., Toma, J.S., and Rafuse, V.F. (2012). Generation of motor neurons from pluripotent stem cells. *Progress in brain research* 201, 313-331.
- Choi, S.M., Kim, Y., Shim, J.S., Park, J.T., Wang, R.H., Leach, S.D., Liu, J.O., Deng, C., Ye, Z., and Jang, Y.Y. (2013). Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 57, 2458-2468.

- Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C. (2012). Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell stem cell* 10, 610-619.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.
- Descamps, B., and Emanuelli, C. (2012). Vascular differentiation from embryonic stem cells: novel technologies and therapeutic promises. *Vascular pharmacology* 56, 267-279.
- Ding, Q., Lee, Y.K., Schaefer, E.A., Peters, D.T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D.L., Meissner, T.B., Hendriks, W.T., *et al.* (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell stem cell* 12, 238-251.
- Drukker, M., Tang, C., Ardehali, R., Rinkevich, Y., Seita, J., Lee, A.S., Mosley, A.R., Weissman, I.L., and Soen, Y. (2012). Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 30, 531-542.
- Durruthy Durruthy, J., Ramathal, C., Sukhwani, M., Fang, F., Cui, J., Orwig, K.E., and Reijo Pera, R.A. (2014). Fate of induced pluripotent stem cells following transplantation to murine seminiferous tubules. *Human molecular genetics* 23, 3071-3084.
- Ebihara, Y., Ma, F., and Tsuji, K. (2012). Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. *International journal of hematology* 95, 610-616.
- Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., *et al.* (2012). Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science translational medicine* 4, 145ra104.
- Eguizabal, C., Montserrat, N., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine. *Seminars in reproductive medicine* 31, 82-94.
- EuroStemCell, iCeMS, and Elsevier (2013). Stem Cell Research Trends and Perspectives on the Evolving International Landscape.
- Frank, S., Zhang, M., Scholer, H.R., and Greber, B. (2012). Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PloS one* 7, e41958.
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., *et al.* (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504, 282-286.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F., 3rd (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology* 31, 397-405.
- 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.
- Gonzalez, F., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 12, 231-242.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63-67.
- Green, M.D., Chen, A., Nostro, M.C., d'Souza, S.L., Schaniel, C., Lemischka, I.R., Gouon-Evans, V., Keller, G., and Snoeck, H.W. (2011). Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29, 267-272.
- Greenhough, S., Bradburn, H., Gardner, J., and Hay, D.C. (2013). Development of an embryoid body-based screening strategy for assessing the hepatocyte differentiation potential of human embryonic stem cells following single-cell dissociation. *Cellular reprogramming* 15, 9-14.
- Guan, X., Yabuuchi, A., Huo, H., Ginsberg, E., Racowsky, C., Daley, G.Q., and Lerou, P.H. (2012). Derivation of human embryonic stem cells with NEMO deficiency. *Stem cell research* 8, 410-415.

- Gupta, K., Chandran, S., and Hardingham, G.E. (2013). Human stem cell-derived astrocytes and their application to studying Nrf2-mediated neuroprotective pathways and therapeutics in neurodegeneration. *British journal of clinical pharmacology* 75, 907-918.
- Gurdon, J.B. (1960). The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* 8, 505-526.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622-640.
- 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.
- Han, D.W., Greber, B., Wu, G., Tapia, N., Arauzo-Bravo, M.J., Ko, K., Bernemann, C., Stehling, M., and Scholer, H.R. (2011). Direct reprogramming of fibroblasts into epiblast stem cells. *Nature cell biology* 13, 66-71.
- Han, D.W., Tapia, N., Joo, J.Y., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Bernemann, C., Ko, K., Wu, G., Stehling, M., Do, J.T., *et al.* (2010). Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. *Cell* 143, 617-627.
- Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., and Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9222-9227.
- Hardarson, T., Caisander, G., Sjogren, A., Hanson, C., Hamberger, L., and Lundin, K. (2003). A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum Reprod* 18, 399-407.
- Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., and Saitou, M. (2012). Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science (New York, NY)* 338, 971-975.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKever, 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. *Nature biotechnology* 27, 851-857.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., *et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58-62.
- International Stem Cell Initiative, Amps, K., Andrews, P.W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M.B., *et al.* (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nature biotechnology* 29, 1132-1144.
- Jayawardena, T.M., Egemnazarov, B., Finch, E.A., Zhang, L., Payne, J.A., Pandya, K., Zhang, Z., Rosenberg, P., Mirotsov, M., and Dzau, V.J. (2012). MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circulation research* 110, 1465-1473.
- Ji, J., Sharma, V., Qi, S., Guarch, M.E., Zhao, P., Luo, Z., Fan, W., Wang, Y., Mbabaali, F., Neculai, D., *et al.* (2014). Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports* 2, 44-51.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606-609.
- Kane, N.M., Xiao, Q., Baker, A.H., Luo, Z., Xu, Q., and Emanueli, C. (2011). Pluripotent stem cell differentiation into vascular cells: a novel technology with promises for vascular re(generation). *Pharmacol Ther* 129, 29-49.
- Katare, R., Stroemer, P., Hicks, C., Stevanato, L., Patel, S., Corteling, R., Miljan, E., Vishnubhatla, I., Sinden, J., and Madeddu, P. (2014). Clinical-grade human neural stem cells promote reparative neovascularization in mouse models of hindlimb ischemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 408-418.

- Kaye, J.A., and Finkbeiner, S. (2013). Modeling Huntington's disease with induced pluripotent stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 56, 50-64.
- Kim, C., Wong, J., Wen, J., Wang, S., Wang, C., Spiering, S., Kan, N.G., Forcales, S., Puri, P.L., Leone, T.C., *et al.* (2013). Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 494, 105-110.
- Lambert, M.P., Sullivan, S.K., Fuentes, R., French, D.L., and Poncz, M. (2013). Challenges and promises for the development of donor-independent platelet transfusions. *Blood* 121, 3319-3324.
- Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., Han, L., Yen, M., Wang, Y., Sun, N., *et al.* (2013). Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 12, 101-113.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373-379.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., *et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell* 8, 106-118.
- Leitch, H.G., Nichols, J., Humphreys, P., Mulas, C., Martello, G., Lee, C., Jones, K., Surani, M.A., and Smith, A. (2013). Rebuilding pluripotency from primordial germ cells. *Stem cell reports* 1, 66-78.
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., and Palecek, S.P. (2013). Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nature protocols* 8, 162-175.
- Lieu, P.T., Fontes, A., Vemuri, M.C., and Macarthur, C.C. (2013). Generation of induced pluripotent stem cells with CytoTune, a non-integrating Sendai virus. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 997, 45-56.
- Lippmann, E.S., Azarin, S.M., Kay, J.E., Nessler, R.A., Wilson, H.K., Al-Ahmad, A., Palecek, S.P., and Shusta, E.V. (2012). Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 30, 783-791.
- Longmire, T.A., Ikonomou, L., Hawkins, F., Christodoulou, C., Cao, Y., Jean, J.C., Kwok, L.W., Mou, H., Rajagopal, J., Shen, S.S., *et al.* (2012). Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell stem cell* 10, 398-411.
- Löser, P., Kobold, S., Guhr, A., Müller, F.J., and Kurtz, A. (2012). Scope and impact of international research in human pluripotent stem cells. *Stem cell reviews* 8, 1048-1055.
- 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.
- Lund, R.J., Narva, E., and Lahesmaa, R. (2012). Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 13, 732-744.
- Majesky, M.W., and Mummery, C.L. (2012). Smooth muscle diversity from human pluripotent cells. *Nature biotechnology* 30, 152-154.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, NY)* 339, 823-826.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153.
- Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J.W., Kriks, S., *et al.* (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell stem cell* 13, 691-705.
- Miyamishi, M., Mori, Y., Seita, J., Chen, J.Y., Karten, S., Chan, C.K., Nakauchi, H., and Weissman, I.L. (2013). Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem cell reports* 1, 198-208.

- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F., *et al.* (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363, 1397-1409.
- Mou, H., Zhao, R., Sherwood, R., Ahfeldt, T., Lapey, A., Wain, J., Sicilian, L., Izvolsky, K., Musunuru, K., Cowan, C., *et al.* (2012). Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell stem cell* 10, 385-397.
- Muller, F.J., Schuldt, B.M., Williams, R., Mason, D., Altun, G., Papapetrou, E.P., Danner, S., Goldmann, J.E., Herbst, A., Schmidt, N.O., *et al.* (2011). A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods* 8, 315-317.
- Nihei, Y., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Yagi, T., Yoshizaki, T., Okano, H., and Suzuki, N. (2013). Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. *The Journal of biological chemistry* 288, 8043-8052.
- Oldershaw, R.A., Baxter, M.A., Lowe, E.T., Bates, N., Grady, L.M., Soncin, F., Brison, D.R., Hardingham, T.E., and Kimber, S.J. (2010). Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nature biotechnology* 28, 1187-1194.
- Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U., and Zweigerdt, R. (2012). Suspension Culture of Human Pluripotent Stem Cells in Controlled, Stirred Bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods*.
- Pfaff, N., and Cantz, T. (2013). From skin to blood: a new member joins the iClub. *Cell stem cell* 13, 131-133.
- Pfaff, N., Fiedler, J., Holzmann, A., Schambach, A., Moritz, T., Cantz, T., and Thum, T. (2011). miRNA screening reveals a new miRNA family stimulating iPS cell generation via regulation of Meox2. *EMBO reports* 12, 1153-1159.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J.D., and Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485, 593-598.
- Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A.A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., *et al.* (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 502, 65-70.
- Ramathal, C., Durruthy-Durruthy, J., Sukhwani, M., Arakaki, J.E., Turek, P.J., Orwig, K.E., and Reijo Pera, R.A. (2014). Fate of iPSCs derived from azoospermic and fertile men following xenotransplantation to murine seminiferous tubules. *Cell reports* 7, 1284-1297.
- Rashid, S.T., Corbineau, S., Hannan, N., Marciniak, S.J., Miranda, E., Alexander, G., Huang-Doran, I., Griffin, J., Ahrlund-Richter, L., Skepper, J., *et al.* (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *The Journal of clinical investigation* 120, 3127-3136.
- Reinhardt, P., Schmid, B., Burbulla, L.F., Schondorf, D.C., Wagner, L., Glatza, M., Hoing, S., Hargus, G., Heck, S.A., Dhingra, A., *et al.* (2013). Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell stem cell* 12, 354-367.
- Ronen, D., and Benvenisty, N. (2012). Genomic stability in reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 22, 444-449.
- Ryan, S.D., Dolatabadi, N., Chan, S.F., Zhang, X., Akhtar, M.W., Parker, J., Soldner, F., Sunico, C.R., Nagar, S., Talantova, M., *et al.* (2013). Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1alpha transcription. *Cell* 155, 1351-1364.
- Sandoe, J., and Eggan, K. (2013). Opportunities and challenges of pluripotent stem cell neurodegenerative disease models. *Nature neuroscience* 16, 780-789.
- Schwartz, R.E., Trehan, K., Andrus, L., Sheahan, T.P., Ploss, A., Duncan, S.A., Rice, C.M., and Bhatia, S.N. (2012a). Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2544-2548.
- Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012b). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-720.

- Sebastiano, V., Maeder, M.L., Angstman, J.F., Haddad, B., Khayter, C., Yeo, D.T., Goodwin, M.J., Hawkins, J.S., Ramirez, C.L., Batista, L.F., *et al.* (2011). In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* 29, 1717-1726.
- Sgodda, M., Mobus, S., Hoepfner, J., Sharma, A.D., Schambach, A., Greber, B., Ott, M., and Cantz, T. (2013). Improved hepatic differentiation strategies for human induced pluripotent stem cells. *Current molecular medicine* 13, 842-855.
- Shuga, J., Zeng, Y., Novak, R., Mathies, R.A., Hainaut, P., and Smith, M.T. (2010). Selected technologies for measuring acquired genetic damage in humans. *Environ Mol Mutagen* 51, 851-870.
- Siller, R., Greenhough, S., Park, I.H., and Sullivan, G.J. (2013). Modelling human disease with pluripotent stem cells. *Current gene therapy* 13, 99-110.
- Soldner, F., Laganieri, J., Cheng, A.W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L.I., Myers, R.H., Lindquist, S., *et al.* (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 146, 318-331.
- Song, K., Nam, Y.J., Luo, X., Qi, X., Tan, W., Huang, G.N., Acharya, A., Smith, C.L., Tallquist, M.D., Neilson, E.G., *et al.* (2012). Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485, 599-604.
- Sparman, M.L., Tachibana, M., and Mitalipov, S.M. (2010). Cloning of non-human primates: the road "less traveled by". *Int J Dev Biol* 54, 1671-1678.
- Studer, L. (2012). Derivation of dopaminergic neurons from pluripotent stem cells. *Progress in brain research* 200, 243-263.
- Suprynowicz, F.A., Upadhyay, G., Krawczyk, E., Kramer, S.C., Hebert, J.D., Liu, X., Yuan, H., Cheluvvaraju, C., Clapp, P.W., Boucher, R.C., Jr., *et al.* (2012). Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 20035-20040.
- Szkolnicka, D., Farnworth, S.L., Lucendo-Villarin, B., Storck, C., Zhou, W., Iredale, J.P., Flint, O., and Hay, D.C. (2014). Accurate prediction of drug-induced liver injury using stem cell-derived populations. *Stem cells translational medicine* 3, 141-148.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsel-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 29, 313-314.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.S., Sritanaudomchai, H., *et al.* (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Tan, K.S., Tamura, K., Lai, M.I., Veerakumarasivam, A., Nakanishi, Y., Ogawa, M., and Sugiyama, D. (2013). Molecular pathways governing development of vascular endothelial cells from ES/iPS cells. *Stem cell reviews* 9, 586-598.
- Tichy, E.D. (2011). Mechanisms maintaining genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 987-996.
- Van Haute, L., Spits, C., Geens, M., Seneca, S., and Sermon, K. (2013). Human embryonic stem cells commonly display large mitochondrial DNA deletions. *Nature biotechnology* 31, 20-23.
- Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., *et al.* (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 15, 577-583.
- Wapinski, O.L., Vierbuchen, T., Qu, K., Lee, Q.Y., Chanda, S., Fuentes, D.R., Giresi, P.G., Ng, Y.H., Marro, S., Neff, N.F., *et al.* (2013). Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155, 621-635.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

- Wong, A.P., Bear, C.E., Chin, S., Pasceri, P., Thompson, T.O., Huan, L.J., Ratjen, F., Ellis, J., and Rossant, J. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nature biotechnology* 30, 876-882.
- Yi, B.A., Mummery, C.L., and Chien, K.R. (2013). Direct cardiomyocyte reprogramming: a new direction for cardiovascular regenerative medicine. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3, a014050.
- Young, M.A., Larson, D.E., Sun, C.W., George, D.R., Ding, L., Miller, C.A., Lin, L., Pawlik, K.M., Chen, K., Fan, X., *et al.* (2012). Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 10, 570-582.
- Yusa, K. (2013). Seamless genome editing in human pluripotent stem cells using custom endonuclease-based gene targeting and the piggyBac transposon. *Nature protocols* 8, 2061-2078.
- Zhang, Y., Li, W., Laurent, T., and Ding, S. (2012). Small molecules, big roles -- the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Journal of cell science* 125, 5609-5620.
- Zou, J., Maeder, M.L., Mali, P., Pruetz-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.
- Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S.N., and Cheng, L. (2011). Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 118, 4599-4608.

