

## Unterrichtung

durch die Bundesregierung

### Siebter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes

#### Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Prüfung und Genehmigung von Anträgen auf Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen zu Forschungszwecken</b> .....	3
1.1 Berichtsauftrag und Berichtszeitraum .....	3
1.2 Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren .....	3
1.3 Erfüllung der Voraussetzungen nach § 4 StZG .....	10
1.4 Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG .....	11
1.5 Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES).....	16
<b>2 Stand der Forschung mit pluripotenten menschlichen Stammzellen</b> .....	17
2.1 Einleitung .....	17
2.2 Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien.....	17
2.3 Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen .....	18
2.3.1 Erkenntnisse aus dem Vergleich von humanen ES- und Maus-ES-Zellen und zu bestimmenden Merkmalen pluripotenter Stammzellen .....	18
2.3.2 Unterschiede zwischen hES-Zelllinien und zwischen hES- und hiPS-Zellen .....	19
2.3.3 Genetische Anomalien in hES- und hiPS-Zellen.....	19
2.3.4 Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen .....	22

	Seite
2.3.5 Generierung von chimären Tieren durch Embryoaggregation mit ES- / iPS-Zellen.....	24
2.4 Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen.....	24
2.4.1 Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus PID-Embryonen .....	25
2.4.2 Gewinnung von Stammzellen aus Keimzellen und deren Vorläuferzellen .....	25
2.4.3 Fötale Stammzellen .....	25
2.4.4 Fortschritte in der Reprogrammierung von Körperzellen.....	25
2.4.5 Transprogrammierung und Transdifferenzierung.....	26
2.5 Entwicklung von Therapien und Testmethoden mit hES- und hiPS-Zellen .....	26
2.5.1 Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stamm-zellen und 3D-Kultur Stammzell-abgeleiteter Organoiden.....	26
2.5.2 Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen .....	28
2.5.3 Pharmakologische / Toxikologische Substanztestung & Wirkstoffscreening .....	29
2.5.4 Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen .....	30
<b>3 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>32</b>
<b>4 Zitierte Literatur .....</b>	<b>34</b>

## **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 der Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG) vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), zuletzt geändert durch Artikel 50 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626). Er umfasst den Zeitraum vom 1. Januar 2014 bis zum 31. Dezember 2015 (siebenter Berichtszeitraum).

### **1.2 Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren**

#### **1.2.1 Übersicht über die im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben**

Im vorangegangenen Berichtszeitraum (1. Januar 2012 bis 31. Dezember 2013, sechster Berichtszeitraum) waren im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten 19 Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und/oder Verwendung humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) genehmigt worden, wobei für einen Antrag aufgrund der gemeinsamen Antragstellung durch zwei Wissenschaftlerinnen zwei getrennte identische Genehmigungen erteilt worden waren. Für zwei weitere Anträge, die in diesem Zeitraum eingegangen waren, war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2013 noch nicht abgeschlossen.

Im aktuellen Berichtszeitraum (1. Januar 2014 bis 31. Dezember 2015) wurden im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten 16 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, von denen sich einer auf ein Forschungsvorhaben bezog, für das bereits zuvor eine Genehmigung erteilt worden war. Ferner waren zwei Anträge aus dem sechsten Berichtszeitraum anhängig. 17 Anträge wurden im Berichtszeitraum genehmigt; ein Antrag wurde vom Antragsteller zurückgenommen. Am 31. Dezember 2015 waren die Genehmigungsverfahren für alle im Berichtszeitraum eingegangenen Anträge abgeschlossen.

Die im Berichtszeitraum erteilten 17 Genehmigungen für neue Forschungsvorhaben ergingen an 15 Personen bzw. Institutionen, von denen vier bereits im Besitz wenigstens einer zuvor erteilten Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen waren. 11 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 105 Genehmigungen für die Einfuhr und/oder Verwendung von hES-Zellen an natürliche bzw. juristische Personen erteilt. Im Berichtszeitraum wurden insgesamt fünf in der Vergangenheit genehmigte Forschungsvorhaben beendet, zwei weitere Vorhaben waren bereits zuvor abgeschlossen worden. Die entsprechenden Genehmigungen nach dem StZG sind folglich erloschen. Am Ende des Berichtszeitraumes bestanden somit 98 Genehmigungen für die Durchführung von Forschungsvorhaben unter Verwendung von hES-Zellen, die teilweise mehrfach erweitert wurden. Derzeit sind insgesamt 75 Arbeitsgruppen, die an 53 Einrichtungen (Universitäten, Universitätsklinika, Forschungsinstitutionen, Unternehmen etc.) tätig sind, mit hES-Zell-Forschung befasst.

Im Berichtszeitraum wurde zudem 19-mal die Genehmigung für bereits laufende Forschungsvorhaben erweitert. In fünf Fällen wurden zusätzliche experimentelle Arbeiten an hES-Zellen für vier bereits laufende Vorhaben 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 14 Vorhaben wurde die Einfuhr weiterer hES-Zell-Linien sowie deren Verwendung für bereits zuvor genehmigte Forschungsarbeiten beantragt und genehmigt. Die Einträge im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des RKI wurden für die entsprechenden Genehmigungen jeweils ergänzt bzw. aktualisiert.

### 1.2.2 Angaben zu den im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Bis zum 31. Dezember 2013 (Ende des sechsten Berichtszeitraumes) waren 88 Genehmigungen nach dem StZG erteilt worden.

Die insgesamt 89. Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen erging am 16. Januar 2014 an Herrn Prof. Dr. Jürgen Hescheler, Universität Köln. Die hier genehmigten Forschungsarbeiten sind mit jenen identisch, die bereits im Jahr 2013 Herrn Prof. Dr. Agapios Sachinidis am 4. Juli 2013 genehmigt wurden (80. Genehmigung nach dem StZG). Im Zentrum der Arbeiten steht die Entwicklung eines zellbasierten *In-vitro*-Testsystems 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 humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (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, zu ersetzen und somit die Aussagekraft entsprechender Tests für den Menschen zu erhöhen.

Die 90. Genehmigung wurde am 30. Januar 2014 an Herrn Dr. Anthony Gavalas, Technische Universität Dresden, erteilt. Das Forschungsvorhaben gliedert sich in zwei Teilprojekte. Im ersten Teilprojekt sollen reife und funktionsfähige Beta-Zellen aus hES-Zellen gewonnen und insbesondere jene molekularen und zellbiologischen Prozesse weiter aufgeklärt und *in vitro* nachvollzogen werden, die bei der Entwicklung von Zellen des definitiven Entoderms in endokrine pankreatische Zellen und während der Reifung zu Insulin-sekretierenden Beta-Zellen ablaufen, wobei insbesondere die Regulation der Expression der Gene für Signalrezeptoren durch bestimmte entodermale bzw. pankreatische Transkriptionsfaktoren untersucht werden soll. Nach terminaler Differenzierung sollen pankreatische Beta-Zellen auch in diabetische Tiermodelle transplantiert und bezüglich ihrer Funktionalität überprüft werden. Im zweiten Teilprojekt soll die Frage geklärt werden, auf welchem Wege spezifische Subtypen von Motoneuronen aus hES-Zellen gewonnen werden können. Dazu soll u. a. durch die kombinierte Modulation bestimmter Genaktivitäten und spezifischer Signalwege in aus hES-Zellen gewonnenen neuronalen Vorläuferzellen die Entwicklung von Vorläuferzellen verschiedener Subtypen von Motoneuronen angestoßen werden. Nach Charakterisierung und Passagierung der entstandenen Vorläuferzellen sollen diese in Motoneurone differenziert und dann in funktioneller Hinsicht *in vitro* untersucht werden. Die genehmigten Forschungsarbeiten können voraussichtlich zum einen Erkenntnisse über Signalwege erbringen, die an der Reifung pankreatischer Zellen beteiligt sind, was ggf. Rückschlüsse auf während der menschlichen Fötalentwicklung ablaufende Prozesse zulassen und zur Entwicklung verbesserter Protokolle für die Bereitstellung reifer Beta-Zellen *in vitro* beitragen kann. Zum anderen können neue Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Moleküle und Signalwege an der Spezifizierung humaner neuronaler Vorläuferzellen zu verschiedenen Subtypen von Motoneuronen beteiligt sind, was einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis von Prozessen der Neurogenese während der Embryonalentwicklung des Menschen leisten könnte.

Die 91. Genehmigung erging am 5. März 2014 an Herrn Dr. Leo Kurian, Universität Köln. Ziel der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Aufklärung der Funktion von sogenannten langen nicht-codierenden RNAs (*long non-coding RNAs*, lncRNAs) bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz, bei der Differenzierung pluripotenter Stammzellen in kardiale und vaskuläre Zellen sowie bei der Regeneration des Herzens und des vaskulären Systems. Dabei sollen u. a. zunächst bereits in der Vergangenheit identifizierte lncRNAs, deren Expression in humanen pluripotenten bzw. sich kardiovaskulär differenzierenden Zellen erhöht ist, hinsichtlich ihrer Relevanz für Pluripotenz bzw. Differenzierung untersucht werden. Ferner soll die Präsenz von lncRNAs, die in sich regenerierenden Herzen von Zebrafischen verstärkt auftreten, in aus hES-Zellen gewonnenen kardialen Vorläuferzellen bzw. reifen Kardiomyozyten überprüft und eine mögliche Rolle dieser lncRNAs bei der Proliferation bzw. Dedifferenzierung von kardialen Zellen ermittelt werden. Schließlich sollen die als für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz bzw. kardiale Differenzierung als wesentlich identifizierten lncRNAs u. a. bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation, hinsichtlich potentieller Wechselwirkungen mit RNAs und Proteinen sowie mit Blick auf ihre funktionell aktiven Sequenzen untersucht werden. Die Arbeiten sollen zu einem verbesserten Verständnis der Grundlagen von Pluripotenz menschlicher Zellen führen, Kenntnisse über die derzeit wenig verstandenen Funktionen von zelltypspezifischen lncRNAs insbesondere während der kardialen Differenzierung erbringen

sowie ggf. zu neuen Erkenntnissen über die derzeit wenig verstandenen molekularen Prozesse der Regeneration des menschlichen Herzens beitragen.

Inhaberin der ebenfalls am 5. März 2014 erteilten 92. Genehmigung ist Frau Dr. Jennifer Winter, Universitätsmedizin Mainz. Die genehmigten Forschungsarbeiten sind auf die Erlangung eines besseren Verständnisses der molekularen Ursachen des Opitz-Syndroms gerichtet, einer Erkrankung, die zu Fehlbildungen in Derivaten der Neuralleiste und Defekten in der neuralen Entwicklung führt. Die hier interessierende Form dieser Erkrankung wird durch eine Mutation im MID1-Gen verursacht, weswegen die Funktion von MID1 in aus hES-Zellen gewonnenen Neuralleistenzellen und deren Derivaten sowie in neuralen (Vorläufer-)Zellen näher bestimmt und die Effekte von MID1-Mutationen auf molekularer Ebene analysiert werden sollen. Dies erfolgt u. a. durch Überexpression eines mutierten MID1-Gens bzw. durch Verminderung oder Ausschaltung der Expression dieses Gens in hES-Zellen und die Untersuchung der aus diesen mutierten hES-Zellen hergestellten oben genannten Zelltypen hinsichtlich einer veränderten Aktivierung von Signalwegen und möglicher Konsequenzen für das Differenzierungsvermögen der Zellen, für ihre Proliferation, Migration und Vitalität. Die an hES-Zellen gewonnenen Erkenntnisse sollen auch auf hiPS-Zellen übertragen werden. Angesichts eines nur lückenhaften Kenntnisstandes über die Auswirkungen einer Fehlfunktion von MID1 auf die Differenzierung beim Menschen sollen die Forschungsarbeiten Aufschluss über die Auswirkungen von MID1-Defekten auf die Differenzierungsfähigkeit humaner Neuralleistenzellen und neuraler Zellen erbringen und die Aufdeckung eines vermuteten Zusammenhangs zwischen einem potentiell veränderten Differenzierungsvermögen in spezifische Zelltypen infolge des MID1-Defektes und phänotypischen Effekten beim Opitz-Syndrom ermöglichen. Die Untersuchungen können insgesamt dazu beitragen, die molekularen Grundlagen des Opitz-Syndroms in Neuralleistenzellen und deren Derivaten sowie in neuralen Zellen aufzuklären.

Die 93. Genehmigung erging am 6. März 2014 an Herrn Dr. Armin Blesch, Universitätsklinikum Heidelberg. Ziel des Forschungsvorhabens ist die Entwicklung neuer Ansätze für stammzellbasierte Therapien von Verletzungen des Rückenmarks. Dazu sollen phänotypisch definierte Populationen neuraler Zellen aus pluripotenten Stammzellen des Menschen hergestellt, angereichert, charakterisiert und auf ihre Eignung zur Regeneration von Nervengewebe im Tiermodell getestet werden. Aus hES-Zellen differenzierte verschiedene Typen neuronaler und glialer Zellen sollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Entwicklung, in variierenden Mengenverhältnissen und ggf. unter zusätzlicher Verwendung von Wachstumsfaktoren und Trägermaterialien in Tiermodelle für Rückenmarksläsionen transplantiert und die Effekte der transplantierten Zellen auf die motorischen, autonomen und sensorischen Funktionen bestimmt werden. Die Untersuchungen sollen auch auf hiPS-Zellen ausgedehnt werden, wobei bestimmt werden soll, ob und inwieweit hES- und hiPS-Zellen mit vergleichbarer Effektivität in spezifische Subpopulationen neuraler Zellen differenzieren können und nach Transplantation in Tiere mit Rückenmarksläsionen einen therapeutischen Effekt haben. Aus dem Forschungsvorhaben sind vor allem Erkenntnisse darüber zu erwarten, unter welchen Bedingungen sich bestimmte neurale Zelltypen nach Transplantation in das Rückenmark integrieren können und ob und inwieweit dies zu einer Verbesserung der motorischen, sensorischen und autonomen Funktionen führen kann. Die Arbeiten können insgesamt zur Entwicklung von neuen Ansätzen für regenerative Therapien unter Verwendung humaner pluripotenter Stammzellen beitragen.

Die 94. Genehmigung wurde ebenfalls am 6. März 2014 an die Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, erteilt. Das sehr vielgestaltige und umfangreiche Forschungsvorhaben soll zur Entwicklung standardisierter Bedingungen führen, unter denen humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) kultiviert und reproduzierbar in definierte Zelltypen differenziert werden können. In diesem Zusammenhang sollen Medien und Methoden zur effizienten Expansion von hES-Zellen unter 2D- und 3D-Bedingungen optimiert und die Bedingungen für die Differenzierung in zahlreiche klinisch relevante Zelltypen weiterentwickelt und optimiert sowie jeweils geeignete Differenzierungsmedien entwickelt werden. Ferner sollen Verfahren zur An- bzw. Abreicherung spezifischer Zelltypen etabliert, die im Vorhaben entwickelten Vorgehensweisen für die Kultivierung und Differenzierung von hES-Zellen und ihren Derivaten automatisiert und auf geschlossene Systeme (z. B. Bioreaktoren) übertragen und schließlich Verfahren der guten Herstellungspraxis (GMP) zur Gewinnung der interessierenden Zelltypen etabliert werden. Die aus hES-Zellen gewonnenen Zellen sollen ferner *in vitro* und nach Transplantation in jeweils geeignete Tiermodelle umfassend charakterisiert werden. Alle Forschungsarbeiten sollen vergleichend zwischen hES-Zellen und hiPS-Zellen durchgeführt werden. Die genehmigten Forschungsarbeiten werden voraussichtlich dazu beitragen, humane Zellen in großer Menge und Reinheit nach standardisierten Verfahren herstellen zu können, was eine wesentliche Voraussetzung für die künftige Nutzung pluripotenter Stammzellen für klinische Zwecke sowie ihre Nutzung für pharmakologisch-toxikologische Zwecke ist, beispielsweise in der Arzneimittelentwicklung.

Die 95. Genehmigung erging am 29. April 2014 an Frau PD Dr. Christine Blattner, Karlsruher Institut für Technologie. Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten sind Untersuchungen zur Rolle des Tumorsuppressor-Proteins p53 in hES-Zellen und in deren frühen differenzierten Derivaten sowie zu Ursachen für bekannte Unterschiede in der Funktion dieses Proteins in murinen und humanen ES-Zellen. Dazu soll durch RNA-Sequenzierung bestimmt werden, welche Gene nach siRNA-abhängiger Repression des *p53*-Gens in hES-Zellen sowie nach Induktion früher Differenzierung eine veränderte Expression aufweisen und folglich ggf. durch p53 reguliert werden. Ferner sollen u. a. die Konformation von p53 in hES-Zellen und in aus diesen abgeleiteten Zellen unter verschiedenen Bedingungen ermittelt und die Fähigkeit des jeweils vorliegenden p53-Proteins untersucht werden, an bekannte Interaktionspartner zu binden, sowie der Effekt der Hemmung der *p53*-Genexpression auf das Proliferationsverhalten von hES-Zellen ermittelt werden. Angesichts der wesentlichen zellulären Funktionen von p53 u. a. für die Zellzyklusregulation sollen die Arbeiten zu einem verbesserten Verständnis über molekulare Grundlagen von Pluripotenz und früher Differenzierung in menschlichen Zellen beitragen.

Inhaber der gleichfalls am 29. April 2014 erteilten 96. Genehmigung ist das Universitätsklinikum Essen. Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten soll ein auf hES-Zellen basierendes Zellmodell für das Angelman-Syndrom etabliert werden. Beim Angelman-Syndrom handelt es sich um eine entwicklungsneurologische Störung, die infolge eines Defekts des im Gehirn monoallelisch exprimierten Gens für eine Ubiquitin-Ligase (UBE3A) auftritt. hES-Zellen sollen zum einen als Referenzmaterial für die Bestimmung insbesondere der neuronalen Differenzierungsfähigkeit von für das Angelman-Syndrom spezifischen hiPS-Zellen genutzt werden. Zum anderen soll eine das Angelman-Syndrom bedingende UBE3A-Mutation in hES-Zellen eingeführt werden, wodurch krankheitsspezifische pluripotente Zellen mit einem isogenen genetischen Hintergrund verfügbar gemacht werden sollen. Neuronal differenzierte (krankheitsspezifische) Zellen sollen dann u. a. bezüglich ihres allelspezifischen Imprintings untersucht und Strategien entwickelt und *in vitro* erprobt werden, um das in Neuronen inaktive Allel für UBE3A zu reaktivieren. Die Forschungsarbeiten zielen auf die Erlangung eines vertieften Verständnisses der molekularen und zellbiologischen Vorgänge, die der Pathogenese des Angelman-Syndroms zugrunde liegen. Sie sind aber auch von Relevanz für das grundsätzliche Verständnis der Mechanismen der monoallelischen Expression bestimmter Gene in Neuronen und können ggf. zur Entwicklung der Grundlagen für neue Ansätze zur Therapie des Angelman-Syndroms beitragen.

Die 97. Genehmigung wurde am 7. Oktober 2014 an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst, Helmholtz-Zentrum München, erteilt. Das Forschungsvorhaben gliedert sich in zwei Teilprojekte, von denen das erste auf die Entwicklung verbesserter Protokolle für die Gewinnung dopaminerger Neurone aus hES-Zellen gerichtet ist. Dabei sollen insbesondere spezifische Vorläuferzelltypen, die bei der Differenzierung von hES-Zellen zu dopaminerger Neuronen auftreten, identifiziert bzw. genauer charakterisiert, an der Differenzierung beteiligte Moleküle, Rezeptoren und Signalwege bestimmt sowie der Einfluss von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) auf die Entstehung dopaminerger Neurone bestimmt und ggf. moduliert werden. Die aus hES-Zellen gewonnenen dopaminerger Neuronen sollen umfassend bezüglich biochemischer, molekularer und elektrophysiologischer Parameter untersucht und nach Transplantation in Nagermodelle des Morbus Parkinson im Detail analysiert werden. Im zweiten Teil des Forschungsvorhabens sollen dann gezielt Punktmutationen in hES-Zellen eingeführt werden, die bei erblich bedingten Formen des Morbus Parkinson auftreten. Die genetisch veränderten hES-Zellen sollen dann in Richtung dopaminerger Neurone differenziert, diese umfassend charakterisiert und schließlich mit dopaminerger Neuronen verglichen werden, die aus hiPS-Zellen von Patienten mit entsprechenden genetischen Veränderungen abgeleitet werden.

Die am 7. Oktober 2014 erteilte 98. Genehmigung erging wiederum an das Universitätsklinikum Essen. Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen auf ein tieferes Verständnis jener Vorgänge, die bei der Entstehung des Retinoblastoms (Rb), eines juvenilen Tumors des Auges, ablaufen, sowie auf die Identifizierung jener retinalen Zelltypen, die Ausgangspunkt für die Entstehung des Retinoblastoms sind. Dazu sollen Mutationen im Rb1-Gen, dessen Genprodukt ein wesentlicher Regulator des Zellzyklus ist und dessen Mutation zur Entstehung des Retinoblastoms führt, in hES-Zellen erzeugt und deren Einfluss auf die Differenzierung der Zellen zu neuraler Retina analysiert werden. Dabei sollen die Effekte von genetischen Veränderungen in verschiedenen Regionen des Rb1-Gens, von hetero- vs. homozygoten Mutationen sowie von multiplen genetischen Veränderungen im Rb1-Gen untersucht werden. Die umfassende Analyse insbesondere des Transkriptom und des Epigenoms der sich in Richtung retinaler Zellen differenzierenden Zellen soll zur Isolierung von retinalen Vorläuferzellpopulationen führen, deren Eigenschaften aufgrund der Mutationen im Rb1-Gen verändert sind und die ggf. Tumovorläuferzellen darstellen. Die Forschungsarbeiten können voraussichtlich zur Aufklärung der Effekte von Mutationen im Rb1-Gen auf die retinale Differenzierung beitragen und ein verbessertes Verständnis der molekularen und zellulären Ursachen des Retinoblastoms ermöglichen.

Die 99. Genehmigung wurde am 14. Januar 2015 an das Zentrum für Regenerative Therapien (CRTD), Dresden, erteilt. Hier soll zunächst ein Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung und Verifizierung von Wirkstoffen entwickelt werden, die die Phagozytose durch Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE-Zellen) stimulieren. Eine verminderte Phagozytose durch RPE-Zellen ist ursächlich für eine Reihe von Augenerkrankungen wie beispielsweise verschiedene Formen der Makula-Degeneration. Hierfür soll ein Zellmodell etabliert werden, das auf aus hES-Zellen abgeleiteten RPE-Zellen basiert. Potentielle Wirkstoffe sollen dann *in vitro* sowie in einem humanisierten Mausmodell getestet werden, in das zuvor aus hES-Zellen abgeleitete RPE-Zellen transplantiert wurden. Weiterhin sollen, unter Nutzung des zuvor etablierten Zellmodells, molekulare Vorgänge bei der Phagozytose in humanen RPE-Zellen aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang sollen beispielsweise Gene identifiziert werden, deren Ausschaltung zu einer veränderten Phagozytoseleistung führen. Die Identifizierung der Funktion der entsprechenden Genprodukte soll ggf. zur Entdeckung möglicher Zielstrukturen für neue Wirkstoffe führen. Ferner sollen umfangreiche Untersuchungen spezifischer Aspekte der Phagozytose in hES-Zell-abgeleiteten retinalen Zellen erfolgen. Durch das Forschungsvorhaben sollen zum einen Grundlagen für die Entwicklung von Therapien für häufig auftretende und derzeit nicht heilbare Augenerkrankungen geschaffen, zum anderen das Verständnis der molekularen Grundlagen der Phagozytose in RPE-Zellen und damit der Ursachen von Erkrankungen wie bestimmter Formen der Makula-Degeneration vertieft werden.

Gegenstand der 100. Genehmigung, die am 10. März 2015 an Herrn Prof. Dr. Jürgen Rohwedel, Universität Lübeck, erteilt wurde, ist die Etablierung eines humanen Nierenzellmodells auf der Grundlage von hES-Zellen. An diesem Zellmodell sollen vor allem molekulare und zellbiologische Vorgänge analysiert werden, die der polyzystischen Nierenerkrankung (*polycystic kidney disease*, PKD) zugrunde liegen. PKD, die durch Mutationen der Gene *Pkd1* bzw. *Pkd2* bedingt wird, die für die Proteine PC1 bzw. PC2 codieren, führt zu einer fortschreitenden Störung der Nierenfunktion mit teils fatalen Folgen und ist in der westlichen Welt die häufigste zum Tode führende Erbkrankheit; eine kausale Therapie existiert nicht. Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten sollen hES-Zellen zu den wesentlichen Zelltypen der Niere differenziert und diese insbesondere auf ihre Fähigkeit zur Zilienbildung hin untersucht werden, da PC1 und PC2 in den Zilien lokalisiert sind. Parallel dazu sollen auch hiPS-Zellen, die aus Patienten mit PKD gewonnen wurden und die für PKD ursächliche Mutationen aufweisen, in renale Zellen differenziert werden, wobei das Differenzierungsvermögen dieser hiPS-Zellen mit jenem von isogenen hiPS-Zellen aus denselben Patienten sowie von hES-Zellen verglichen werden soll. Um den Einfluss spezifischer Mutationen der Gene für PC1 und PC2 auf die Zilienbildung untersuchen zu können, sollen in hES-Zellen zudem entsprechende Mutationen im *Pkd1*- und *Pkd2*-Gen erzeugt und deren Relevanz für den Phänotyp der aus diesen Zellen differenzierten Nierenepithelzellen bestimmt werden. Angesichts des derzeit geringen Kenntnisstandes über die unmittelbaren molekularen Folgen einer Fehlfunktion der genannten Proteine wird das Forschungsvorhaben voraussichtlich vor allem zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der polyzystischen Nierenerkrankung beitragen.

Inhaberin der am 28. April 2015 erteilten 101. Genehmigung ist die Medizinische Hochschule Hannover. Im genehmigten Vorhaben sollen funktionell aktive Leberzellen aus pluripotenten Stammzellen gewonnen, in 3D-Kultur zu Organoiden, ggf. gemeinsam mit endothelialen und mesenchymalen Zellen, aggregiert und – nach Transplantation in geeignete Mausmodelle – bezüglich ihrer Funktionalität *in vivo* untersucht werden. Im Zuge der geplanten Optimierung der Vorgehensweise für die hepatische Differenzierung von hES-Zellen sollen zudem das Expressionsprofil von mikro-RNAs (miRNAs) zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung hepatischer Zellen analysiert, der Einfluss von spezifischen miRNAs auf die hepatische Differenzierung bestimmt und die konkreten Funktionen der miRNAs in den entsprechenden Differenzierungsprozessen und an daran beteiligten Signalwegen ermittelt werden. Zudem sollen im Hochdurchsatzverfahren (niedermolekulare) Faktoren identifiziert werden, die die Aktivität von an der hepatischen Differenzierung beteiligten Signalwegen modulieren. Die Fragestellung, zu deren Klärung hES-Zellen verwendet werden sollen, soll auch unter Nutzung von hiPS-Zellen untersucht werden, wobei hES-Zellen hier ggf. als Referenzmaterial verwendet werden sollen. Die Arbeiten, deren Ziel die Bereitstellung großer Mengen gut charakterisierter und funktionell aktiver menschlicher Leberzellen ist, sind im Hinblick auf den hohen Bedarf an humanen Leberzellen für die pharmakologisch-toxikologische Forschung, für die Arzneimittelentwicklung und -testung, für die *In-vitro*-Modellierung hepatischer Erkrankungen des Menschen sowie für künftige regenerative Therapien von hoher Relevanz. Zudem können die Forschungsarbeiten zu einem vertieften Verständnis der molekularen Grundlagen hepatischer Differenzierungsprozesse und somit der Fötalentwicklung des Menschen beitragen.

Die 102. Genehmigung wurde ebenfalls am 28. April 2015 erteilt und erging an Frau Prof. Dr. Ulrike Nuber, Technische Universität Darmstadt. Ein erstes Teilprojekt des Forschungsvorhabens ist auf die Etablierung eines Zellmodells gerichtet, mit dem Untersuchungen zu den molekularen Ursachen des Rett-Syndroms erfolgen können, einer genetisch bedingten neurologischen Erkrankung, von der fast ausschließlich Mädchen betroffen sind.

Ziel ist es, die Rolle der für das Rett-Syndrom ursächlichen Mutationen im *MECP2*-Gen bei der Entwicklung und Ausprägung des für die Erkrankung typischen zellulären Phänotyps zu bestimmen. Dazu sollen zum einen hiPS-Zellen aus Patienten mit entsprechenden Mutationen hergestellt und – für Referenzzwecke – dieselben Mutationen in hES-Zellen erzeugt werden. Mutationen, für die kein Zellmaterial aus Patienten verfügbar ist und für die folglich keine hiPS-Zellen hergestellt werden können, sollen ebenfalls in hES-Zellen erzeugt werden. Nach Differenzierung in bestimmte neuronale Zellen und umfassender Charakterisierung sollen anhand des Zellmodells potentielle Zielgene von *MECP2* in den mutierten Zellen identifiziert werden. Zum anderen soll überprüft werden, ob durch Modulation des Glukokortikoidrezeptor-vermittelten Signalweges die funktionellen Parameter in den betroffenen Zellen verändert werden können. Der Vorhabensteil zielt auf ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge, die bei der Pathogenese des Rett-Syndroms ablaufen, sowie auf die Entwicklung von Ansätzen für eine Therapie dieser Erkrankung. In einem zweiten Teilprojekt sollen Verfahren entwickelt werden, mit denen verschiedene Subpopulationen neuraler Vorläuferzellen, die aus pluripotenten Stammzellen des Menschen differenziert wurden, anhand spezifischer Oberflächenmarker identifiziert, voneinander getrennt und angereichert werden können. Ziel ist es, die grundsätzlichen Vorgehensweisen für die neurale *In-vitro*-Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen zu verbessern und Differenzierungsvorgänge beim Menschen besser als bislang zu verstehen.

Inhaberin der am 9. Juni 2015 erteilten 103. Genehmigung ist Frau Dr. Zsuzsanna Izsvák, Max-Delbrück-Centrum, Berlin. Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen auf die Aufklärung der Funktion des Transkriptionsfaktors *DLX5* bei der Entwicklung von Trophoblastzellen aus hES-Zellen. Hintergrund ist eine mögliche Rolle des *DLX5*-Genproduktes bei der Entstehung der Präeklampsie, deren primäre Ursache in veränderten Eigenschaften des sich entwickelnden Trophoblasten liegt. hES-Zellen sollen nach Standard-Protokollen zu Trophoblastzellen differenziert und die Zielgene von *DLX5* ermittelt werden. Durch Repression bzw. Überexpression des Gens für *DLX5* sowie potentieller Zielgene von *DLX5* in hES-Zellen soll die Rolle der entsprechenden Genprodukte bei der Entstehung des Trophoblasten sowie bei einer möglichen Fehlregulation dieses Prozesses untersucht werden. Die Forschungsarbeiten sollen insgesamt dazu beitragen, die Vorgänge besser zu verstehen, die bei der Entstehung des Trophoblasten aus pluripotenten Stammzellen auf molekularer und zellulärer Ebene ablaufen, und molekulare Ursachen der Präeklampsie zu ergründen.

Die 104. Genehmigung erging am 14. Juli 2015 an die Evotec International GmbH, Hamburg. Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen auf die Etablierung eines auf hES-Zellen basierenden *In-vitro*-Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die als Grundlage für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung des Diabetes mellitus dienen könnten. Hierfür sollen zunächst verbesserte Methoden für die Gewinnung pankreatischer Beta-Zellen aus hES-Zellen entwickelt, die entstandenen Zellen umfassend *in vitro* und *in vivo* charakterisiert und anschließend für die Testung verschiedener Bibliotheken kleiner Moleküle und potentiell therapeutischer Proteine bezüglich einer möglichen Wirkung auf Beta-Zellen im Hochdurchsatzverfahren verwendet werden. Dabei sollen insbesondere Substanzen identifiziert werden, die die Replikation von Beta-Zellen stimulieren, das für den Diabetes mellitus charakteristische und durch metabolischen Stress oder durch Immunzellen vermittelte Absterben der Beta-Zellen verhindern und/oder dem durch Stress oder Entzündung induzierten Funktionsverlust dieser Zellen entgegenwirken. Neben der avisierten Identifizierung von potentiellen Wirkstoffkandidaten, die ggf. zu dringend benötigten neuen Medikamenten für die Behandlung des Diabetes mellitus weiterentwickelt werden können, kann die geplante detaillierte Analyse der Wirkmechanismen der identifizierten Substanzen dazu beitragen, die Replikation sowie Prozesse der Aufrechterhaltung von Vitalität und Funktionalität humaner Beta-Zellen besser als bislang zu verstehen.

Im Rahmen der 105. Genehmigung, die am 29. Oktober 2015 an die Medizinische Hochschule Hannover erteilt wurde, sollen hES-Zellen ebenfalls in Richtung pankreatischer Beta-Zellen differenziert werden. Ziel der Forschungsarbeiten ist es, ein tieferes Verständnis der pankreatischen Differenzierung beim Menschen zu erlangen und Methoden zu entwickeln, mit denen ausreichende Mengen funktionsfähiger pankreatischer Beta-Zellen für künftige regenerative Therapien des Diabetes mellitus bereitgestellt werden können. Insbesondere sollen jene bislang wenig verstandenen Prozesse näher untersucht werden, die bei der Entwicklung von Zellen des definitiven Entoderms zu reifen, funktionsfähigen Beta-Zellen ablaufen. Ferner sollen verbesserte Strategien für die Aufreinigung von pankreatischen Vorläuferzell-Populationen entwickelt und die Rolle von mikro-RNAs (miRNAs) während der Segregation der mesodermalen und entodermalen Linie sowie während der pankreatischen Differenzierung von hES-Zellen näher untersucht werden. Schließlich soll der Frage nachgegangen werden, welche Wirkung proinflammatorische Zytokine auf aus hES-Zellen differenzierte pankreatische Zellen haben. Die Fragestellungen, zu deren Klärung hES-Zellen verwendet werden sollen, sollen auch unter Nutzung von hiPS-Zellen untersucht werden. Neben einem besseren Verständnis der molekularen Prozesse, die bei der



Entwicklung des menschlichen Pankreas auftreten, sollen die genehmigten Forschungsarbeiten vor allem dazu beitragen, Grundlagen für eine Gewebeersatz-Therapie des Diabetes mellitus zu schaffen.

Für die folgenden bereits in der Vergangenheit genehmigten Forschungsvorhaben wurde die Genehmigung auf Antrag hin inhaltlich erweitert und der Registereintrag ggf. entsprechend ergänzt bzw. aktualisiert:

Erweiterung der 73. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 16. August 2012, Erweiterung der Genehmigung am 29. April 2014). Während im Mittelpunkt der ursprünglich genehmigten Forschungsarbeiten die Untersuchung der mitochondrialen metabolischen Reprogrammierung humaner Zellen und die Etablierung von hES-Zell-basierten Modellen für Mitochondriopathien stand, soll nunmehr geklärt werden, welche Rolle eine mögliche Dysfunktion von Mitochondrien bei der Pathogenese degenerativer Erkrankungen des Nervensystems spielt. In diesem Zusammenhang soll zunächst untersucht werden, welchen spezifischen Veränderungen Mitochondrien im Prozess der neuronalen Differenzierung unterliegen, ob hierbei Unterschiede zwischen hiPS- und hES-Zellen bestehen und ob die Integrität der mitochondrialen DNA während der neuronalen Differenzierung erhalten bleibt. Ferner sollen die Funktion von Transposons bei der neuronalen Musterbildung bestimmt und schließlich Zellmodelle für Erkrankungen des Nervensystems etabliert werden, die nach gegenwärtigem Kenntnisstand auch mit einer veränderten Mitochondrienfunktion in neuronalen Zellen einhergehen. hES-Zellen dienen hier vorwiegend als Referenzmaterial für entsprechende Arbeiten mit hiPS-Zellen, die Forschungsarbeiten können aber ggf. auch einen Erkenntnisgewinn insbesondere über mögliche Veränderungen im Energiestoffwechsel während der Differenzierung von hES-Zellen in spezifische (Sub)Typen neuronaler und glialer Zellen sowie über damit einhergehende Variationen in der Zahl, Struktur und Funktion von Mitochondrien erbringen.

Erweiterung der 78. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 28. Mai 2013, Genehmigung erweitert am 19. November 2015). Das Ziel der ursprünglich genehmigten Forschungsarbeiten besteht in erster Linie darin, an der mesodermalen und frühen kardiovaskulären Differenzierung von hES-Zellen beteiligte Signalwege detailliert zu analysieren, zelluläre Zwischenstadien der kardiovaskulären Differenzierung genauer als bislang zu charakterisieren und kardiovaskulär differenzierte Zellen bezüglich ihres therapeutischen Potentials in Tiermodellen des Myokardinfarkts zu testen. Da sich die Transkriptome benachbarter, sich kardial differenzierender humaner pluripotenter Stammzellen offenbar erheblich voneinander unterscheiden können, beispielsweise in Abhängigkeit von ihrer lokalen Position in der sich differenzierenden Stammzellkolonie, soll in den nunmehr genehmigten Forschungsarbeiten der Frage nachgegangen werden, wie groß das Ausmaß der Heterogenität sich differenzierender hES-Zellen ist, welche konkreten Unterschiede im Transkriptom benachbarter Zellen auftreten und wie dies bei der Erarbeitung verbesserter Differenzierungsstrategien künftig berücksichtigt werden kann. Dies soll durch Anwendung einer neuartigen Methode zur Sequenzierung von Einzelzell-Transkriptomen geklärt werden, wobei auch Fragen nach molekularen Mechanismen der Segregation der Entwicklung in Zellen des Mesoderms und des Trophoblasten untersucht werden sollen. Ferner sollen nun auch hiPS-Zellen in die Untersuchungen einbezogen werden, um Gemeinsamkeiten und potentielle Unterschiede zwischen hES- und hiPS-Zellen bei ihrer Differenzierung in kardiovaskuläre Zellen bzw. Zellen des Trophoblasten bestimmen zu können. Die genehmigten Arbeiten sollen u. a. zu umfangreichen Daten über Genexpressionskaskaden führen, die während der frühesten Phasen der mesodermalen Differenzierung ablaufen, was Grundlage für neue Erkenntnisse über die Sequenz der Genexpressionsereignisse sowie über möglicherweise existierende Subpopulationen von Zellen mit unterschiedlicher Expression von Schlüsselgenen der mesodermalen Differenzierung sein kann.

Erweiterungen der 84. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 26. September 2013, Genehmigung erweitert am 5. Juni 2014 und 12. Oktober 2015). Das Forschungsvorhaben befasst sich im wesentlichen mit der Untersuchung von Aspekten der Regulation der Protein-Integrität in hES-Zellen und daraus abgeleiteten Zellen. Im Rahmen der nunmehr genehmigten Forschungsarbeiten sollen die Untersuchungen zum einen auf die Frage ausgedehnt werden, welche spezifischen Mechanismen hES-Zellen entwickelt haben, um proteotoxischen Stress abzubauen, der durch die Akkumulation fehlgefalteter und daher für (unspezifische) Aggregation anfällige Proteine verursacht wird. Gene, deren Produkte vermutlich an der Degradation solcher Proteine beteiligt sind, sollen in diesem Zusammenhang in hES-Zellen ausgeschaltet und die Effekte auf die Lebensfähigkeit und Pluripotenz der Zellen untersucht werden. Zum anderen wurde durch Vergleich der Proteome undifferenzierter und differenzierter hES-Zellen festgestellt, dass Gene, die für sog. Kälteschockproteine (*cold shock proteins*, CSPs) codieren, in hES-Zellen in starkem Maße exprimiert werden. CSPs können durch Bildung von Komplexen mit Ribosomen und Bindung von mRNA die Translationsrate regulieren und so einen Beitrag zur Proteostase in Zellen leisten. Daher soll nun geklärt werden, ob und wenn ja auf welchem Wege bestimmte CSPs die Eigenschaften von hES-Zellen modulieren können und welche molekularen Grundlagen dies hat. Entsprechende Untersuchungen sollen auch an hiPS-Zellen durchgeführt werden. Die mit den genehmigten Forschungsarbeiten

beabsichtigte Aufklärung von molekularen Prozessen, die zur Integrität des Proteoms beitragen, ist mit Blick auf das Verständnis von Pluripotenz und Differenzierung von hoher Relevanz und kann darüber hinaus zum Verständnis von Prozessen beitragen, die bei der krankheitsbedingten Degeneration von menschlichen Zellen eine Rolle spielen, da degenerative Erkrankungen des Menschen teils mit einer verminderten Fähigkeit der Zellen zur Aufrechterhaltung ihres Proteoms einhergehen.

Erweiterung der 99. Genehmigung nach dem StZG (Genehmigung erteilt am 14. Januar 2015, Genehmigung erweitert am 10. März 2015). Gegenstand der ursprünglich genehmigten Forschungsarbeiten ist die Etablierung eines aus hES-Zellen abgeleiteten *In-vitro*-Modells für Zellen des humanen retinalen Pigment-Epithels (RPE), das zum einen zur Identifizierung von potentiellen Wirkstoffen zur Modulation der Phagozytose-Aktivität von RPE-Zellen dienen und zum anderen für die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Phagozytose in humanen RPE-Zellen genutzt werden soll. Im Rahmen der nachträglich genehmigten Forschungsarbeiten sollen große Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren auf die Präsenz von Molekülen mit Wirkung auf die Phagozytose in RPE-Zellen untersucht und auf diesem Wege Wirkstoffkandidaten für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von Erkrankungen des Auges identifiziert werden. Dies ist angesichts der großen Zahl betroffener Patienten und des Fehlens adäquater Therapieoptionen beispielsweise für die altersbedingte Makula-Degeneration von großer Relevanz.

Weitere Angaben zum Gegenstand 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](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, weiterhin nicht erforderlich. Im Berichtszeitraum wurden die Einfuhr und Verwendung von insgesamt 49 verschiedenen hES-Zell-Linien genehmigt. Für 38 dieser Zell-Linien lag die nach § 6 Absatz 2 Nummer 3 StZG erforderliche Dokumentation am RKI bereits vor. Für 11 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 ebenfalls nicht bekannt.

Seit dem Inkrafttreten des Gesetzes zur Änderung des Stammzellgesetzes vom 14.08.2008 (BGBl I S. 1708) besteht zusätzlich die Möglichkeit der Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen, die nach dem 01.01.2002 und vor dem 01.05.2007 gewonnen wurden. Bis zum 31. Dezember 2015 wurden die Einfuhr von 38 verschiedenen „neuen“ hES-Zell-Linien und ihre Verwendung in insgesamt 66 Forschungsvorhaben, von denen 65 noch nicht abgeschlossen sind, entweder im Zusammenhang mit der Genehmigung eines neuen Antrags oder im Rahmen der Erweiterung bereits bestehender Genehmigungen nach dem StZG genehmigt. Damit besteht für ca. 66 Prozent aller derzeit laufenden Forschungsvorhaben eine Genehmigung zur Nutzung von hES-Zell-Linien, deren Einfuhr und Verwendung erst mit der Änderung des Stammzellgesetzes im Jahr 2008 ermöglicht wurde. Zur Durchführung der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben wurde in ca. 76 Prozent der Fälle auch die Einfuhr und Verwendung solcher „neuen“ hES-Zell-Linien genehmigt.

Auch im vergangenen Berichtszeitraum wurden im Vorfeld der Antragstellung verschiedentlich Anfragen hinsichtlich der Genehmigungsfähigkeit der Einfuhr und Verwendung bestimmter humaner ES-Zell-Linien an das RKI gestellt, von denen am RKI bereits bekannt war, dass sie die Genehmigungsvoraussetzungen des § 4 Absatz 2 StZG aufgrund ihrer Ableitung nach dem 1. Mai 2007 nicht erfüllen. Nach entsprechender Auskunft durch das RKI wurde auf die Antragstellung jeweils verzichtet.

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](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

Von den insgesamt 17 Forschungsvorhaben, die im Berichtszeitraum genehmigt worden sind, zielt die Mehrzahl auch weiterhin auf einen Erkenntnisgewinn zu verschiedenen Fragestellungen der Grundlagenforschung, wobei Fragen der molekularen Grundlagen von Differenzierungsprozessen und die Entwicklung von Zellmodellen für Erkrankungen des Menschen im Mittelpunkt des Interesses stehen. Die Verwendung von hES-Zellen zielt in einigen Fällen auch darauf, Verfahren für die Bereitstellung ausreichender Mengen differenzierter, funktional aktiver humaner Zellen hoher Qualität für Fragestellungen in der pharmakologisch-toxikologischen Forschung sowie für in den Blick rückende klinische Anwendungen zu entwickeln. Schließlich werden hES-Zellen auch weiterhin als Referenzmaterial für Untersuchungen an humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) benötigt, wobei in diesem Zusammenhang die jeweils interessierende Frage auch für hES-Zellen geklärt werden soll. Im Berichtszeitraum wurden Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen im Wesentlichen für die Klärung folgender Fragestellungen genehmigt:

Erstens zielen einige der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben auf die Untersuchung charakteristischer molekularer Eigenschaften von hES-Zellen, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von hES-Zellen sowie für die Regulation früher Differenzierungsprozesse bedeutsam sind. Ziel dieser Vorhaben ist es, die Grundlagen der Pluripotenz menschlicher Zellen besser als bislang zu verstehen. Dies betrifft zum einen die Frage nach der Funktion von langen nicht-codierenden RNAs (lncRNAs) in hES-Zellen, deren Rolle insbesondere bei der Aufrechterhaltung einer spezifischen epigenetischen Architektur und bei der durch mikro-RNAs (miRNAs) vermittelten Regulation von Schlüsselfaktoren der Pluripotenz von hES-Zellen aufgeklärt werden soll. Zum anderen soll die Rolle des Zellzyklus-Regulators und Tumorsuppressor-Gens *p53* in hES-Zellen aufgeklärt werden, was – neben der Erlangung eines vertieften Verständnisses dieses wichtigen Transkriptionsfaktors für Pluripotenz und frühe Differenzierung – auch im Hinblick auf das Verständnis der Mechanismen der Reprogrammierung humaner somatischer Zellen zu pluripotenten Stammzellen von erheblichem Interesse ist. Die genehmigten Arbeiten können bei erfolgreicher Durchführung der jeweiligen Projekte zu einem relevanten Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung beitragen.

Zweitens hat die Mehrzahl der Vorhaben auch weiterhin zum Ziel, die molekularen und zellbiologischen Vorgänge besser zu verstehen, die bei der gerichteten Differenzierung von hES-Zellen in spezifische Zelltypen des Menschen ablaufen. In diesem Zusammenhang sollen *In-vitro*-Differenzierungsprotokolle für die effiziente Herstellung von Zellen des entsprechenden Zelltyps entwickelt bzw. optimiert werden. Dies ist Voraussetzung für die Bereitstellung ausreichender Mengen humaner Zellen für die Etablierung von Krankheitsmodellen, für pharmakologisch-toxikologische Fragestellungen sowie für künftige Zellersatztherapien. Bei den zu diesen Fragestellungen im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsarbeiten steht die Differenzierung in Richtung kardialer, neuronaler, hepatischer und vor allem pankreatischer Zellen im Mittelpunkt des Interesses, aber auch Fragen im Zusammenhang mit der Differenzierung von hES-Zellen in verschiedene Zellen der Niere und des Trophoblasten sollen geklärt werden. Dabei kann in vielen Fällen bereits auf eigenen Vorarbeiten mit humanen ES-Zellen und auf einer Vielzahl publizierter Studien aufgebaut werden, in denen bestimmte Fragen zur Differenzierung in die jeweils interessierenden Zelltypen bereits bearbeitet wurden. Auf dieser Grundlage sollen jeweils spezifische Fragestellungen der Differenzierung in den entsprechenden Zelltyp untersucht, Teilschritte der Differenzierung besser verstanden und optimiert, zelluläre Zwischenstadien der Differenzierung identifiziert und eingehender als bislang charakterisiert sowie die Funktion bestimmter Signalwege oder Transkriptionsfaktoren für spezifische Differenzierungsschritte bestimmt werden. Stärker als bislang stehen nun beispielsweise Fragestellungen zu den epigenetischen Veränderungen im Zuge der Differenzierung oder Fragen nach der Rolle von miRNAs bei der Differenzierung im Fokus des Interesses. Besonders hinzuweisen ist auf die Tatsache, dass drei der genehmigten Projekte auf ein besseres Verständnis der Differenzierung von pankreatischen Beta-Zellen aus hES-Zellen zielen, wobei jeweils ausdrücklich darauf hingewiesen wird, dass diese Arbeiten auch mit dem Ziel der Schaffung von Grundlagen für die Bereitstellung ausreichender Mengen dieses Zelltyps für eine Ersatztherapie des Diabetes mellitus erfolgen. Zellersatztherapien des Diabetes mellitus sind angesichts einer entsprechenden ersten klinischen Studie, die im Berichtszeitraum in den USA begonnen wurde und die auf aus hES-Zellen abgeleiteten Beta-Zellen beruht, eine mittlerweile realistische Option.

Insgesamt können die zum genannten Themenkomplex genehmigten Forschungsarbeiten zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Differenzierung in die jeweiligen Zelltypen führen, im Falle der hepatischen und pankreatischen Differenzierung beispielsweise über die bislang wenig verstandene Rolle von miRNAs im Differenzierungsprozess. Aus den Forschungsergebnissen können ggf. auch Rückschlüsse auf die molekularen Grundlagen von Differenzierungsprozessen während der Embryonalentwicklung des Menschen gezogen werden. Ferner ist das Verständnis von Differenzierungsprozessen und die Möglichkeit von deren Nachstellung *in vitro* Grundlage für die Bereitstellung ausreichender Mengen humaner Zellen für weitere Fragestellungen der Grundlagenforschung sowie für die angewandte und klinische Forschung. Die in den jeweiligen Vorhaben benannten Forschungsfragen sollen i. Allg. auch an hiPS-Zellen untersucht werden. Dies kann in jedem Fall Erkenntnisse darüber erbringen, ob und inwieweit hES- und hiPS-Zellen bezüglich ihres Differenzierungsverhaltens identisch oder verschieden und worin mögliche Unterschiede begründet sind.

Drittens zielen mehrere der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben darauf, humane Zellmodelle für die Untersuchung von Pathogenesemechanismen menschlicher Erkrankungen sowie für die Entwicklung neuer Medikamente für deren Behandlung zu etablieren. Gegenstand von Vorhaben, die vorrangig auf ein verbessertes Verständnis von Pathogenesemechanismen zielen, sind Erkrankungen des Menschen mit gut bekannter genetischer Ursache wie die polyzystische Nierenerkrankung, der familiär bedingte Morbus Parkinson, das Angelman-Syndrom, das Rett-Syndrom und das Opitz-Syndrom, wobei auch in diesen Vorhaben teilweise Ansätze für neue therapeutische Optionen entwickelt werden sollen. Dabei sollen bestimmte Fragestellungen an aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen geklärt werden, in anderen Forschungsvorhaben sollen hES-Zellen vor allem als Referenzmaterial für die Etablierung von Zellmodellen auf der Grundlage krankheitsspezifischer hiPS-Zellen dienen. In mehreren Fällen sollen patientenspezifische Mutationen in hES-Zellen erzeugt werden, um vor dem Hintergrund einer ansonsten genetisch identischen Zelle den spezifischen Einfluss der jeweiligen Mutation auf den Phänotyp der Zelle untersuchen zu können. Angesichts der im Berichtszeitraum entstandenen Verfügbarkeit sehr effektiver Werkzeuge zur genetischen Manipulation von Zellen *in vitro* (insbesondere CRISPR/Cas) ist die genetische Veränderung von hES-Zellen mit deutlich geringerem Aufwand verbunden, als dies in der Vergangenheit der Fall war. Aus diesen Arbeiten werden neue Erkenntnisse über Veränderungen erwartet, die bei der jeweiligen Erkrankung auf molekularer und zellulärer Ebene auftreten, was zu einem besseren Verständnis der Pathogeneseprozesse und ggf. zu neuen Therapieansätzen für diese derzeit nur inadäquat behandelbaren Erkrankungen führen kann.

Andere Vorhaben zielen auf die Entwicklung von Zellmodellen für häufiger auftretende Erkrankungen ohne klar definierte genetische Ursachen wie Diabetes mellitus oder die altersbedingte Makula-Degeneration. Diese Vorhaben zielen – außer auf ein besseres Verständnis der Krankheitsursachen – vor allem auf die Identifizierung neuer Zielstrukturen für potentielle Arzneimittel und die Testung von Substanzbibliotheken im Hochdurchsatzverfahren, um Wirkstoffkandidaten zu ermitteln, die für die Erkrankung charakteristische phänotypische Eigenschaften der Zellen modulieren können. Da primäre humane Zellen zur Modellierung dieser Erkrankungen i. Allg. nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung stehen bzw. tierische Zellmodelle die humane Erkrankung nur partiell nachbilden können, sind *In-vitro*-Testsysteme, wie sie in den genannten Vorhaben entwickelt werden sollen, für die Entwicklung neuer Arzneimittel von erheblicher Relevanz.

Viertens formulieren zwei der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben keine Zielstellungen im Bereich der Grundlagenforschung, sondern zielen ausschließlich auf die Bereitstellung eines geeigneten humanen Zellmaterials für künftige Anwendungen in der Forschung und in der Klinik bzw. auf die Erprobung von Zellersatztherapien unter Nutzung humaner ES-Zellen im Tiermodell. In einem Vorhaben sollen effiziente Verfahren für die Differenzierung, Anreicherung und Herstellung von hES-Zellen unter den Bedingungen der guten Herstellungspraxis (*good manufacturing practice*) entwickelt werden, wobei die Differenzierung in zahlreiche Zelltypen optimiert werden soll. Die Verfügbarkeit gut definierter, reproduzierbar und in großen Mengen gewinnbarer sowie möglichst reiner Zellpopulationen ist Voraussetzung für eine künftige Nutzung von Derivaten pluripotenter Stammzellen in der Gewebeersatztherapie, aber auch für die Bereitstellung ausreichender Zellmengen beispielsweise für die pharmakologisch-toxikologische Forschung. In einem anderen Vorhaben soll ein auf hES-Zellen beruhendes Verfahren für die Therapie von Rückenmarksläsionen entwickelt und im Tiermodell erprobt werden, was angesichts der fehlenden Therapieoptionen für diese Verletzungen von außerordentlicher Relevanz ist.

Fünftens werden hES-Zellen – wie bereits in den vorangegangenen Berichtszeiträumen – in der Mehrzahl der genehmigten Forschungsvorhaben zusammen mit hiPS-Zellen eingesetzt. Dabei soll in der Mehrzahl der Fälle ein unter Nutzung von hES-Zellen erreichter Erkenntnisgewinn an hiPS-Zellen überprüft werden, um zu neuen

Erkenntnissen insbesondere über die Grundlagen von Pluripotenz in hiPS-Zellen sowie über deren Differenzierungsvermögen zu gelangen und Klarheit über Identität oder Unterschiedlichkeit der jeweils interessierenden Eigenschaften zu gewinnen. Entsprechend soll im größeren Teil der genehmigten Vorhaben die wissenschaftliche Fragestellung zunächst unter Verwendung von hES-Zellen geklärt werden, woraus jeweils ein Erkenntnisgewinn über hES-Zellen selbst erwartet wird. Im Anschluss daran soll dann überprüft werden, ob und inwieweit sich hiPS-Zellen und hES-Zellen bezüglich der jeweils analysierten Eigenschaften identisch verhalten, welche Unterschiede ggf. bestehen und worin die Ursachen für mögliche Unterschiede liegen. Dies soll letztlich stärker generalisierte Aussagen über spezifische Charakteristika pluripotenter Stammzellen des Menschen ermöglichen. In einigen Forschungsvorhaben werden hES-Zellen dagegen lediglich als „gold standard“ genutzt, um bestimmte Eigenschaften von hiPS-Zellen anhand eines Referenzmaterials bewerten zu können. Dies setzt voraus, dass die jeweils interessierende Fragestellung an hES-Zellen bereits geklärt und daher die entsprechenden Eigenschaften von hES-Zellen umfänglich bekannt sind. Aus diesen Projekten wird kein eigenständiger Erkenntnisgewinn über hES-Zellen erwartet; die Hochrangigkeit ergibt sich hier ausschließlich aus dem prognostizierten Wissenszuwachs über hiPS-Zellen.

Die Anzahl und die Thematiken der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben zeigen, dass in Deutschland weiterhin ein Interesse an der Forschung unter Verwendung von hES-Zellen besteht. Auch nach mehr als 15 Jahren internationaler Forschung an diesen Zellen sind wichtige Fragen zur Biologie von hES-Zellen und deren *In-vitro*-Differenzierungspotential nicht abschließend geklärt. So sind Protokolle für die effiziente *In-vitro*-Gewinnung reifer und funktionell aktiver gewebetypischer Zellen für viele Zelltypen auch derzeit noch nicht verfügbar. Offene Fragen bestehen beispielsweise auch nach den molekularen Grundlagen von Differenzierungsentscheidungen bei der Entwicklung menschlicher Gewebe und zur Rolle bestimmter Faktoren für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz sowie für den Übergang zur Differenzierung. Diese Fragen spiegeln sich auch in den im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben wider. Dabei erfolgt die geplante Entwicklung geeigneter Protokolle für die Bereitstellung spezifischer menschlicher Zelltypen teils auch mit der Absicht, humane Zellmodelle zu etablieren, die – entweder bereits im aktuellen Vorhaben oder aber erst in Zukunft – für weitere wichtige Fragestellungen in der Erforschung molekularer Ursachen von Erkrankungen des Menschen, für die Identifizierung von Arzneimittel-*targets* bzw. neuer Wirkstoffe und für die frühzeitige Einschätzung von Arzneimittelrisiken genutzt werden sollen. Ein aus der künftigen Nutzung dieser Zellmodelle erwarteter bzw. prognostizierter Erkenntnisgewinn wurde bei der Bewertung der Hochrangigkeit der Forschungsvorhaben grundsätzlich berücksichtigt.

Einige der genehmigten Forschungsvorhaben werden auch mit dem Ziel durchgeführt, zur Schaffung von Grundlagen für die Anwendung von aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen in künftigen Gewebeersatztherapien beizutragen. Dabei stehen Therapien des Diabetes mellitus, des Morbus Parkinson sowie von Läsionen des Rückenmarks im Mittelpunkt des Interesses. Auch die im aktuellen Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben zielen zwar nicht unmittelbar auf die Durchführung von klinischen Studien; die Genehmigungsinhaber wollen vielmehr Vorgehensweisen entwickeln, um die für klinische Anwendungen benötigten Zellen in der erforderlichen Menge, Reinheit und Qualität zur Verfügung stellen zu können, und die entsprechenden *proof-of-concept*-Experimente unter Nutzung geeigneter Versuchstiermodelle durchführen. Das Ziel, Grundlagen für weitere solcher Studien schaffen zu wollen, ist angesichts der internationalen Entwicklung auf diesem Gebiet von hoher Relevanz und rechtfertigt weiterhin die Zuerkennung von Hochrangigkeit.

Ferner lässt sich auch für den siebten Berichtszeitraum konstatieren, dass die Verwendung von hES-Zellen in der Mehrzahl der genehmigten Forschungsvorhaben weiterhin primär der Gewinnung eines eigenständigen Erkenntnisgewinns über die Eigenschaften von hES-Zellen und aus diesen abgeleiteten Zellen bzw. über die Charakteristika humaner pluripotenter Stammzellen insgesamt dient. Eine in der Vergangenheit von Einigen prognostizierte zunehmende, überwiegende oder gar ausschließliche Verwendung von hES-Zellen als Referenzmaterial („gold standard“) in der Forschung mit hiPS-Zellen ist in Deutschland derzeit nicht erkennbar. Dies steht in Einklang mit der Entwicklung der Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen auf internationaler Ebene, wo ein starker Trend zur Diversifizierung der Forschung mit hES- und hiPS-Zellen erkennbar ist (Kobold et al., 2015).

### 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 in Tierversuchen“ vorgeklärt worden sind. Auch

für die im siebten 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 Forschergruppen 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.

Die Vorklärungen, die vom Antragsteller darzulegen sind, müssen gemäß § 5 Nummer 2 Buchstabe a StZG dem Wortlaut nach in auf tierischen (also nicht-menschlichen) Zellen basierenden *In-vitro*-Modellen oder in Tierversuchen erfolgt sein. Bei Verlassen des StZG im Jahr 2002, also vor nahezu 14 Jahren, lagen nur wenige Studien über hES-Zellen vor; es wurde zu dieser Zeit als erforderlich angesehen, dass die jeweils interessierende Fragestellung vor einem Übergang zur Nutzung von hES-Zellen bereits so weit wie möglich in anderen biologischen Modellen als hES-Zellen untersucht sein sollte. Damit sollte u. a. die wissenschaftliche Schlüssigkeit des Vorhabens sichergestellt und gewährleistet werden, dass das Forschungsvorhaben nach allgemein anerkannten Bewertungsmaßstäben der Wissenschaft und Technik einen sinnvollen und folgerichtigen Fortgang zuvor erfolgter Arbeiten, die zu diesem Zeitpunkt i. Allg. in tierischen Zellen oder in Tierversuchen durchgeführt wurden, darstellt. Zugleich soll das Vorklärungserfordernis gewährleisten, dass hES-Zellen nicht für Forschungsansätze verbraucht werden, die bereits unter Nutzung von tierischen Zellkulturen oder im Tierversuch nicht erfolgreich waren.

Zum Zeitpunkt der Verabschiedung des StZG war eine Vorklärung im Tiermodell oder in tierischen Zellen regelmäßig erforderlich; seither haben jedoch die Kenntnisse über humane embryonale Stammzellen infolge der sich weltweit fulminant entwickelnden Forschung auf diesem Feld stark zugenommen. Während zu Anfang des Jahres 2002 (also zum Zeitpunkt der Formulierung des Stammzellgesetzes) lediglich ca. 20 Originalpublikationen aus der internationalen Forschung über hES-Zellen vorlagen, waren es am Ende des Berichtszeitraumes nach Kenntnis der Genehmigungsbehörde wenigstens 4800. Etliche grundsätzliche Fragestellungen zu hES-Zellen, die zu Beginn der Forschung an diesen Zellen eine Vorklärung an tierischen Zellen aus wissenschaftlicher Sicht tatsächlich erforderlich erscheinen ließen, sind mittlerweile geklärt. In der gegenwärtigen Forschung an hES-Zellen – sowohl in Deutschland als auch auf internationaler Ebene – geht es nun vorrangig um die Klärung sehr viel stärker detaillierter Forschungsfragen auf der Grundlage eines bereits bestehenden umfangreichen Wissens über hES-Zellen. Schon in den Erfahrungsberichten über die vergangenen beiden Berichtszeiträume wurde darauf hingewiesen, dass es bereits nach damals vorhandenem Kenntnisstand für die Mehrzahl der Forschungsfragen keinen für die Vorklärung relevanten Erkenntnisgewinn mehr versprach, Vorversuche „in *In-vitro*-Modellen mit tierischen Zellen oder in Tierversuchen“ zu fordern. Zu einer Vielzahl von Fragestellungen liegen mittlerweile umfangreiche Kenntnisse aus Forschungen an hES-Zellen, aber auch aus anderen Zelltypen vor, die eine höhere Aussagekraft im Hinblick auf die Vorklärung der jeweiligen wissenschaftlichen Fragestellung haben, als sie Voruntersuchungen an tierischen Zellen oder in Tierversuchen liefern könnten. Auch für den aktuellen Berichtszeitraum lagen für die Mehrzahl der Fragestellungen, die in den genehmigten Forschungsvorhaben untersucht werden, bereits weit über einen grundlegenden *proof-of-concept* hinausgehende Erkenntnisse an hES-Zellen vor, was Darlegungen zur Vorklärung an tierischen Zellen oder Tiermodellen aus Sicht der Genehmigungsbehörde entbehrlich macht. Das gilt beispielsweise für jene Vorhaben, in denen Differenzierungsprotokolle weiterentwickelt und optimiert werden sollen. Hier liegen regelmäßig bereits jeweils zahlreiche Arbeiten vor, in denen entsprechende Protokolle spezifisch für hES-Zellen entwickelt worden sind und im Rahmen der genehmigten Arbeiten lediglich weiter optimiert oder beispielsweise der jeweils genutzten hES-Zell-Linie angepasst werden sollen. Die Forderung, diese Protokolloptimierungen beispielsweise zunächst an embryonalen Stammzellen der Maus vorzunehmen, bevor die Verwendung von hES-Zellen zur Beantwortung dieser wissenschaftlichen Fragestellung genehmigt werden kann, ist aus wissenschaftlicher Sicht grundsätzlich nicht sinnvoll.

Auch auf ein weiteres Problem, das sich im Hinblick auf das Erfordernis der Vorklärung der Forschungsfragen an tierischen Zellen oder im Tierversuch regelmäßig ergibt, wurde bereits in vergangenen Berichten hingewiesen. Eine detaillierte Untersuchung der Fragestellungen, die an hES-Zellen geklärt werden sollen, kann – wenn sie unter Nutzung tierischer Zellen erfolgt – in vielen Fällen nicht zur Vorklärung der jeweiligen wissenschaftlichen Fragestellungen beitragen, da bereits bekannt ist, dass sich tierische und menschliche Zellen in den jeweils relevanten Eigenschaften erheblich unterscheiden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Untersuchungen an tierischen Zellen auf menschliche Zellen ist in solchen Fällen nicht möglich; entsprechende Voruntersuchungen würden keine Hinweise darauf liefern, ob die Untersuchung der jeweiligen Fragestellung an hES-Zellen zu ähnlichen Resultaten führen würde, und wären folglich hinsichtlich einer Vorklärung irrelevant. Dies betrifft beispielsweise Projekte, in denen die molekularen Grundlagen der Pluripotenz menschlicher ES-Zellen untersucht werden sollen; hier bestehen teils erhebliche speziesspezifische Unterschiede, die zum Teil erst im Zuge der Forschung an hES-Zellen selbst offenbar wurden. Zudem lassen sich auch spezifische Aspekte der molekularen

Grundlagen von Differenzierung, wie beispielsweise die Rolle bestimmter mikro-RNAs, im nicht-humanen Zellmodell teils nicht vorklären, da hier ebenfalls gewichtige spezies-spezifische Unterschiede bestehen können. Auch Forschungsvorhaben, in denen Zellmodelle für humane Krankheiten etabliert werden sollen, beispielsweise durch Ausschaltung der Expression bestimmter Gene, können im Mausmodell teilweise nicht sinnvoll vorgeklärt werden, da bereits vor der Antragstellung bekannt ist, dass entsprechende genetische Veränderungen in Zellen der Maus einen anderen zellulären Phänotyp als im Menschen zur Folge haben. Die an hES-Zellen geplanten Experimente zunächst an tierischen Zellen durchzuführen würde hier aller Voraussicht nach keinen für die Vorklärung der wissenschaftlichen Fragestellung relevanten Erkenntnisgewinn erbringen. Entsprechende Vorklärungen können daher nicht sinnvoll gefordert werden.

Insgesamt werden von der Genehmigungsbehörde 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. Das Erfordernis, dass die Forschungsfragen „so weit wie möglich“ an tierischen Zellen bzw. im Tierversuch untersucht sein sollen, wird weiterhin so verstanden, dass die Forschungsfragen nach dem *jeweils aktuellen* Stand des Wissens *hinreichend* vorgeklärt sein müssen. Angesichts des gegenwärtigen internationalen Forschungsstandes zu humanen pluripotenten Stammzellen und der Tatsache, dass die Schlüssigkeit eines Forschungsansatzes mittlerweile nicht selten allein mit dem bereits vorhandenen Kenntnisstand zu hES-Zellen begründet werden kann, erscheint dieses Verständnis dem Normzweck des § 5 Nummer 2 Buchstabe a besser zu entsprechen als eine wörtliche Auslegung. Folglich wurde auch im vergangenen Berichtszeitraum bei Darlegung „hinreichender“ Vorklärungen der wissenschaftlichen Fragestellungen, die im Übrigen ggf. auch an anderen menschlichen Zellen als hES-Zellen durchgeführt worden sein können, regelmäßig keine Notwendigkeit für die weitere Vorklärung derselben Fragestellung in „*In-vitro*-Modellen mit tierischen Zellen oder in Tierversuchen“ gesehen. Dieses Verständnis der Vorgaben des StZG steht zudem auch in Einklang mit den erheblichen Bemühungen, die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren. Aspekte des Tierschutzes sind bei der Prüfung des Vorliegens einer hinreichenden Vorklärung der Forschungsfrage allerdings kein zulässiger Grund, als erforderlich angesehene Voruntersuchungen in Tierversuchen nicht zu verlangen.

### **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 ggf. Alternativen zur Nutzung von hES-Zellen bestehen und ob hinreichende Belege dafür existieren, dass die Forschungsziele des Vorhabens auch unter ausschließlicher Nutzung anderer Zellen als hES-Zellen erreicht werden können.

In den Antragsverfahren wurde jeweils dargelegt, dass nach aktuellem Stand der Wissenschaft die Verwendung von hES-Zellen zur Erreichung der Forschungsziele erforderlich ist. Die jeweils formulierten Forschungsziele lassen sich nicht unter Nutzung tierischer Zellen erreichen. Dies ist zum einen in bereits bekannten spezies-spezifischen Unterschieden in den Eigenschaften der Zellen begründet, zum anderen in den jeweils formulierten Forschungszielen, beispielsweise die Bereitstellung von *humanem* Zellmaterial für künftige klinische Anwendungen, für pharmakologisch-toxikologische Fragestellungen mit Spezifität für den Menschen oder für die Etablierung von Zellmodellen für die Erforschung molekularer Grundlagen von Erkrankungen des Menschen, die an tierischen Zellen nicht erfolgen kann.

Ferner bestehen auch die im Bericht für den Zeitraum 2012 bis 2013 benannten Einschränkungen für nicht-pluripotente Zellen des Menschen fort, deren Nutzung als Alternative zu hES-Zellen in Erwägung gezogen werden kann. Primäre menschliche Zellen stehen vielfach nicht in der für die jeweilige Projektdurchführung erforderlichen Menge und reproduzierbaren Qualität zur Verfügung, somatische Stammzellen des Menschen sind in vielen Fällen schwer zugänglich, lassen sich in Kultur teils nur schlecht vermehren und haben bereits Entwicklungsstadien durchschritten, die in den entsprechenden Forschungsvorhaben analysiert werden sollen. Tumorzell-Linien und (immortalisierte) Zell-Linien aus abgetriebenen Föten weisen vielfach die für die Projektdurchführung erforderlichen biologischen Eigenschaften nicht auf, und fötale Stammzellen des Menschen, die sich grundsätzlich nur aus abgetriebenen Föten gewinnen lassen, können – wie primäre menschliche Zellen – i. Allg. nicht in der benötigten Menge und in gut reproduzierbarer Qualität gewonnen werden.

Seit der ersten Beschreibung humaner iPS-Zellen am Ende des Jahres 2007 ist für jeden Antrag insbesondere zu überprüfen, ob das formulierte Forschungsziel ggf. unter ausschließlicher Verwendung von hiPS-Zellen erreicht werden kann, da hES- und hiPS-Zellen ähnliche Eigenschaften aufweisen. Hierbei wird das Gesetz durch die

Genehmigungsbehörde weiterhin so ausgelegt, dass die bloße Vermutung, dass die jeweils zu klärenden Forschungsfragen ggf. auch durch ausschließliche Nutzung von hiPS-Zellen beantwortet werden könnten, für eine Versagung der Genehmigung nicht hinreichend ist. Vielmehr müssten zum Zeitpunkt der Entscheidung über den entsprechenden Antrag bereits Forschungsergebnisse vorliegen, die belegen, dass die Forschungsziele mit anderen Zellen (hier: hiPS-Zellen) tatsächlich erreichbar sind. Andernfalls ist die Versagung der Genehmigung nicht gerechtfertigt.

Wie auch im vergangenen Berichtszeitraum sollen in mehreren der im aktuellen Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben Fragestellungen untersucht werden, für deren Beantwortung bislang keine Daten aus pluripotenten Stammzellen des Menschen vorliegen, also weder aus Untersuchungen mit hES- noch mit hiPS-Zellen. Dies betrifft beispielsweise die Entwicklung von *In-vitro*-Modellen für Krankheiten wie das Angelman-Syndrom, das Opitz-Syndrom oder die polyzystische Nierenerkrankung. Hier sollen Zellmodelle auf der Grundlage pluripotenter Stammzellen des Menschen entwickelt werden, wobei hES- und hiPS-Zellen ggf. parallel genutzt werden sollen. Gerade bei Krankheiten, deren genetische Ursachen gut verstanden sind, bieten hES-Zellen die Möglichkeit, die Krankheit durch gezielte genetische Veränderung der Zellen und deren Differenzierung in den betroffenen Zelltyp vor einem isogenen Hintergrund zu modellieren und anschließend einen Vergleich mit entsprechenden hiPS-Zell-basierten Modellen aus erkrankten Patienten durchzuführen. In anderen Forschungsvorhaben sollen molekulare Grundlagen von Pluripotenz und Differenzierungsentscheidungen ergründet werden, die bislang ebenfalls nicht oder nur in Ansätzen an pluripotenten Stammzellen des Menschen untersucht worden sind, so dass keine ausreichenden Hinweise für die Identität von hES- und hiPS-Zellen in den hierfür relevanten Eigenschaften vorliegen, wie beispielsweise für die Rolle von lncRNAs bei der kardialen Differenzierung, die molekularen Grundlagen der Segregation von mesodermaler Differenzierung und Entwicklung in Richtung Trophoblast oder die Frage nach den Zielgenen eines spezifischen Transkriptionsfaktors bei der Entwicklung der Präeklampsie. Für wiederum andere Fragestellungen gibt es in der Literatur teils widersprüchliche Angaben darüber, ob und inwieweit sich hES- und hiPS-Zellen hier gleichen oder ob teils erhebliche Unterschiede bestehen. Dies betrifft beispielsweise jene Projekte, in denen die molekularen Grundlagen insbesondere der pankreatischen Differenzierung untersucht und verbesserte Protokolle für die *In-vitro*-Differenzierung entwickelt werden sollen. Es ist weiterhin ungeklärt, ob die teils beobachteten Unterschiede zwischen hES- und hiPS-Zellen hier in einer generell geringeren Differenzierungsfähigkeit von hiPS-Zellen begründet sind oder aber durch Unterschiede in den genutzten Zell-Linien sowie in den Vorgehensweisen verursacht werden. Es ist weiterhin Gegenstand solcher Forschungsvorhaben, durch vergleichende Untersuchungen an hES- und hiPS-Zellen zu klären, ob sich beide Typen pluripotenter Stammzellen des Menschen 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 jener Forschungsfragen, für die hES-Zellen ausschließlich als Referenzmaterial zur Überprüfung von für pluripotente Zellen charakteristische Eigenschaften verwendet werden sollen, werden weiterhin hES-Zellen benötigt. Schließlich gibt es auch Fragestellungen, die voraussichtlich grundsätzlich nicht unter Verwendung von hiPS-Zellen gelöst werden können, wie jene nach der Rolle von p53 zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz in menschlichen Zellen, da die Reprogrammierung somatischer Zellen offenbar eine Blockade des *p53/Arf*-Signalweges voraussetzt.

Es sei erneut darauf hingewiesen, dass trotz der intensiven Nutzung von hiPS-Zellen in der internationalen Forschung und ihrer unbestrittenen Eignung für zahlreiche Fragestellungen in der wissenschaftlichen Literatur weiterhin teils uneinheitliche Befunde darüber vorliegen, inwieweit hES- und hiPS-Zellen tatsächlich identisch sind. hiPS-Zellen weisen eine erhebliche Variabilität in ihrem Differenzierungsvermögen auf, was durch die Methode der Reprogrammierung, den für die Reprogrammierung genutzten somatischen Zelltyp und ein vermutlich durch unvollständige Reprogrammierung bedingtes epigenetisches Gedächtnis von hiPS-Zellen verursacht sein kann. Auch Fragen zur genetischen und epigenetischen Stabilität von hiPS-Zellen sind weiterhin offen, so dass es insbesondere im Hinblick auf eine künftige klinische Nutzung pluripotenter Stammzellen des Menschen weiterhin gerechtfertigt ist, die damit verbundenen wissenschaftlichen Fragestellungen unter Nutzung von hES-Zellen anzugehen, wie es auch in einigen der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben vorgesehen ist.

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

Die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES), die von der Bundesregierung zum 1. Juli 2014 zum fünften 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 Genehmigungserweiterungen für bereits in der Vergangenheit bewilligte Forschungsvorhaben sind, die gesetzlichen Voraussetzungen nach § 5 StZG als erfüllt und die Forschungsvorhaben als in diesem Sinne 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 2014 bis 31. Dezember 2014 (12. Tätigkeitsbericht der ZES) und für den Zeitraum vom 1. Januar 2015 bis 31. Dezember 2015 (13. 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 2014 und 2015 umfassende siebte Erfahrungsbericht der Bundesregierung zur Durchführung des Stammzellgesetzes (StZG) gibt einen Überblick über die aktuellen Entwicklungen in der Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) und mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) sowie über aktuelle Entwicklungen bei anderen Arten von biomedizinisch einsetzbaren Stammzellen. Es werden nur die für diesen Bericht relevanten fachlichen Grundlagen dargestellt. Für allgemeine Aspekte wird auf die vorherigen Berichte verwiesen.

In den ersten drei Erfahrungsberichten der Bundesregierung zur Durchführung des StZG (Bundestagsdrucksachen 15/3639, 16/4050 und 16/12956) wurden die Rahmenbedingungen, Ergebnisse und Ausblicke der Grundlagenforschung und mögliche zukünftige Einsatzgebiete von humanen embryonalen und adulten Stammzellen in der modernen Medizin sowie Perspektiven eines möglichen therapeutischen Einsatzes dieser Zellen beschrieben. Der Fokus der Berichte lag dabei auf der Charakterisierung, der Standardisierung und dem experimentellen Einsatz humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen). Für den Berichtszeitraum 2008/2009 wurde im vierten Erfahrungsbericht (Drucksache 17/4760) die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) breit dargestellt und auf die Unterschiede zwischen hiPS- und hES-Zellen sowie innerhalb der hES-Zellen eingegangen. Im fünften Bericht (Drucksache 17/12882) wurde unter anderem auf die Entwicklung von *In-vitro*-Testmethoden für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen sowie auf die Entwicklung von stammzellbasierten Therapien eingegangen. Im sechsten Erfahrungsbericht für den Berichtszeitraum 2012/2013 (Drucksache 18/4900) wurde 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.

Im vorliegenden siebten Erfahrungsbericht werden die neuen Forschungsaktivitäten zu diesen Entwicklungen vertieft dargestellt und der Fokus insbesondere auf die Differenzierung von hES-Zellen in dreidimensionalen Aggregaten bzw. Organoiden gerichtet.

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

Weiterhin werden weltweit neue hES-Zelllinien generiert, so dass die Zahl der verfügbaren hES-Zelllinien kontinuierlich ansteigt. Eine Veröffentlichung des Human Pluripotent Stem Cell Registry ([hpscereg.eu](http://hpscereg.eu)) spricht von mehr als 3000 hES-Zelllinien, die zwischenzeitlich generiert wurden (Seltmann et al., 2016). Dieses Register wurde 2007 als das Europäische humane embryonale Stammzellregister mit Förderung durch die Europäische Kommission gegründet. Zum Stichtag 12. Januar 2016 waren dort 685 hES-Zelllinien und 120 hiPS-Zelllinien registriert. Wie im letzten Bericht bereits dargestellt, unterhalten auch die US-amerikanischen National Institutes of Health (NIH) ein Register, in dem die für die Forschung mittels NIH-Förderung zugelassenen hES-Zelllinien zusammengestellt sind. Im Jahr 2014 wurden dort 60 neue Linien registriert, im Jahr 2015 wurden weitere 48 Linien aufgenommen. 62 der 108 in den beiden Jahren neu registrierten Linien wurden von Embryonen gewonnen, die im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik als auffällig identifiziert und zur Generierung humaner ES-Zellen eingesetzt wurden. Etwas im Gegensatz zu diesem Anstieg an verfügbaren neuen hES-Zellen lässt sich

allerdings weiterhin eine Fokussierung der internationalen Forschung auf eine überschaubare Anzahl von Standard- bzw. Referenz-hES-Zelllinien 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 und daher die Verwendung von gut charakterisierten Linien naheliegend erscheint.

Dieser Trend zeigt sich erneut auch bei der Forschung an hES-Zellen in Deutschland. So wurden in allen 17 während des aktuellen Berichtszeitraumes (2014/2015) genehmigten Anträgen nach dem Stammzellgesetz auch jeweils die Einfuhr und Verwendung einiger der ersten von James Thomson etablierten hES-Zellen genehmigt. Allerdings sollen nur in vier der genehmigten Vorhaben ausschließlich diese sogenannten WiCell-Linien verwendet werden. In der Mehrzahl der genehmigten Vorhaben sollen weitere hES-Zelllinien zum Einsatz kommen. Hierbei wird überwiegend auf sehr etablierte Quellen für neuere hES-Zelllinien zurückgegriffen: Harvard Medical School (USA), 9 Genehmigungen; ES International (Singapur), 9 Genehmigungen; University of Newcastle (UK), 4 Antragsteller; Technion (Israel), 3 Genehmigungen; University of Sheffield (UK), 3 Genehmigungen.

In Bezug auf die Kultivierung von hES- und hiPS-Zellen haben im Berichtszeitraum zwar keine grundlegenden Weiterentwicklungen stattgefunden, doch finden durch die Verfügbarkeit optimierter Zellkultur-Medien zunehmend solche Kulturbedingungen Anwendung, die ohne Ko-Kultivierung mit Nährzellen auskommen. Somit scheint gegenwärtig absehbar, dass sich chemisch-definierte, xenogenfreie Medien zur Kultivierung humaner pluripotenter Stammzellen zum Referenzsystem entwickeln.

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

Im Folgenden sind einige wichtige Bereiche der Forschung an hES-Zellen während des Berichtszeitraums 2014 bis 2015 dargestellt.

#### **2.3.1 Erkenntnisse aus dem Vergleich von humanen ES- und Maus-ES-Zellen und zu bestimmenden Merkmalen pluripotenter Stammzellen**

Die in den vorangehenden Stammzellberichten dargestellten Erkenntnisse zu humanen ES- und Maus-ES-Zellen haben sich wissenschaftlich dergestalt weiter verfestigt, dass eine Vergleichbarkeit der unter Standard-Bedingungen generierten und kultivierten hES-Zellen allenfalls mit murinen Epiblast-Stammzellen zu postulieren ist. Beide Stammzellpopulationen befinden sich dabei im Stadium der „bestimmten Pluripotenz“ („*primed pluripotency*“) und sind von der Aktivierung bzw. Hemmung sehr ähnlicher Signalkaskaden zur Aufrechterhaltung ihrer Selbsterneuerungs- und vollständigen Differenzierungsfähigkeit abhängig. Somit sind hES-Zellen in der Zellkultur eher mit murinen Zellen des entwicklungsbiologisch späteren Epiblast-Stadiums als mit herkömmlichen ES-Zellen der Maus vergleichbar. Die Kultivierung muriner ES-Zellen resultiert nämlich in Zellen, die im Vergleich zu hES-Zellen deutlich unterschiedliche Charakteristika aufweisen. Ihre „naïve“ Pluripotenz liegt wesentlich näher am entwicklungsbiologisch früheren Embryoblasten-Stadium; es ähnelt also eher dem Pluripotenz-Stadium der inneren Zellmasse einer Blastozyste vor der Einnistung. Die Unterscheidung der naïven von der bestimmten Pluripotenz hat unter anderem deswegen Relevanz, weil murine Epiblast-Stammzellen (bestimmte Pluripotenz) weniger effizient zur Bildung von Chimären und im Gegensatz zu murinen ES-Zellen (naïve Pluripotenz) nicht zur Entwicklung von Keimzellen beitragen. In neueren Arbeiten aus dem aktuellen Berichtszeitraum konnte nun gezeigt werden, dass das Stadium der naïven Pluripotenz auch reproduzierbar in humanen pluripotenten Stammzellen erreicht werden kann. Zellkulturbedingungen, die eine Propagierung solcher humanen, naïven ES-Zellen erlauben, wurden in den Arbeitsgruppen um Thorold Theunissen & Rudolf Jaenisch (Cambridge, MA, USA), Zsuzsanna Izvák (Berlin) sowie Austin Smith (Cambridge, UK) erarbeitet (Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Wang et al., 2014b). In der Arbeit von Theunissen et al. wurden zudem vorher publizierte, wenig reproduzierbare Zellkulturbedingungen mit den von ihnen neu entwickelten direkt verglichen und als weniger geeignet zur Unterstützung naïver hES- oder hiPS-Zellen beschrieben. Auch in der Arbeit von Takashima et al. wurden sehr robuste Zellkulturbedingungen etabliert; diese Arbeit wird mittlerweile von einer großen Zahl an Folgepublikationen als Referenz angeführt, so dass die Propagierung von hES- und hiPS-Zellen im Stadium der naïven Pluripotenz zwischenzeitlich als etabliert gelten kann. Weitgehend unklar ist bisher allerdings, warum die unter unterschiedlichen Kulturbedingungen kultivierten bzw. generierten naïven Zellen doch erhebliche Unterschiede in ihren Charakteristika und insbesondere ihrer Genexpression aufweisen bzw. was diese Unterschiede für die Funktion und das Differenzierungspotential dieser Zellen bedeuten.

### 2.3.2 Unterschiede zwischen hES-Zelllinien und zwischen hES- und hiPS-Zellen

Weiterhin lassen sich generell markante Unterschiede zwischen verschiedenen hES-Zelllinien, zwischen verschiedenen hiPS-Zelllinien und zwischen hES- und hiPS-Zelllinien feststellen. Diese Unterschiede können auf verschiedenen Verfahren zur Etablierung der hES-Zellen bzw. zur Generierung der hiPS-Zellen beruhen, während der weiteren Propagierung infolge unterschiedlicher Zellkulturbedingungen aufgetreten sein oder durch eine verschieden stark ausgeprägte, von den somatischen Ausgangszellen stammende epigenetische Restprägung der hiPS-Zellen bedingt sein. Im Berichtszeitraum wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eingehend untersucht, wie sich verschiedene Verfahren zur Generierung humaner pluripotenter Stammzellen auf das Ausmaß an genetischen und epigenetischen Veränderungen in den Stammzellen auswirken. Die Arbeitsgruppe um Pamela Robey (NIH, Bethesda, MD, USA) hat dazu neurale Vorläuferzellen aus hES-Zellen etabliert und diese somatischen Zellen wieder in hiPS-Zellen reprogrammiert (Mallon et al., 2014). Diese hiPS-Zellen waren daher mit den Ausgangs-hES-Zellen genetisch identisch (syngen), so dass genetische Unterschiede für eine etwaige unterschiedliche Ausprägung der Pluripotenzeigenschaften nicht verantwortlich sein konnten. Interessanterweise konnten keine signifikanten Unterschiede im Genexpressionsprofil sowie im Profil der DNA-Methylierung, einem wesentlichen epigenetischen Merkmal, zwischen den hES-Zellen und den syngen hiPS-Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden von einer umfangreichen Arbeit aus der Gruppe von Konrad Hochedlinger (Boston/Cambridge, MA, USA) unterstützt, in der gezeigt wurde, dass es keine konsistenten Unterschiede in der Genexpression bzw. im DNA-Methylierungsprofil zwischen hES- und hiPS-Zellen gibt (Choi et al., 2015). Die vormals beschriebenen Unterschiede zwischen hES- und hiPS-Zellen sind stattdessen am ehesten auf andere Einflüsse zurückzuführen, beispielsweise auf die Reprogrammierungsmethode oder auf den speziellen genetischen Hintergrund der unterschiedlichen Linien. Dass die Reprogrammierungsmethode einen sehr wesentlichen Einfluss haben kann, zeigt eine Arbeit der Gruppe von Shoukrat Mitalipov (Portland, OR, USA), in der nicht nur hiPS-Zellen mit hES-Zellen aus *In-Vitro*-Fertilisations-Embryonen (IVF-hES-Zellen), sondern auch mit Kerntransfer-Embryonen (NT-hES-Zellen) verglichen wurden (Ma et al., 2014). Das Kerntransfer-Verfahren mit humanen Spender-Oozyten wird in einigen wenigen Laboren technisch erfolgreich für die Ableitung von Kerntransfer (nuclear transfer, NT)-hES-Zellen eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass das durchschnittliche Ausmaß an subchromosomalen Veränderungen bei allen drei Zelltypen vergleichbar war, wobei auch einzelne Zelllinien identifiziert werden konnten, die keine detektierbaren Veränderungen aufwiesen. Allerdings zeigten die hiPS-Zellen im Vergleich mit den IVF-hES-Zellen und auch mit den NT-hES-Zellen vermehrt Auffälligkeiten bei der DNA-Methylierung. Die Autoren schlussfolgerten, dass das Kerntransfer-Verfahren als das der iPS-Zell-Generierung überlegene Reprogrammierungsverfahren angesehen werden kann. Diese Schlussfolgerung wird allerdings von der Arbeitsgruppe um Dieter Egli (New York, USA) nicht unterstützt, die zeigen konnte, dass mit etwas veränderten experimentellen Bedingungen keine manifesten Unterschiede zwischen hiPS-Zellen und hES-Zellen der gleichen Ausgangszellquelle feststellbar waren (Johannesson et al., 2014).

Somit lässt sich der gegenwärtige wissenschaftliche Erkenntnisstand dahingehend zusammenfassen, dass die Unterschiede im Genexpressionsprofil und im DNA-Methylierungs-Profil zwischen pluripotenten Stammzellen verschiedener Spender tendenziell beträchtlicher sind als zwischen verschiedenen Stammzelllinien desselben Spenders, die mit unterschiedlichen Verfahren hergestellt wurden.

### 2.3.3 Genetische Anomalien in hES- und hiPS-Zellen

Die Integrität des Erbgutes einer Zelle ist von großer Bedeutung für den Erhalt der normalen Zellfunktionen. Chromosomale Veränderungen können genauso wie kleinere Mutationen zum Verlust einzelner Zellfunktionen, zum Zelltod oder zu sogenannten malignen Entartungen, also zur Bildung von Tumorzellen, führen (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. Dies kann zur Loslösung aus dem Zellverband und damit zur Bildung von Metastasen führen. Ähnlich wie Tumorzellen können auch genetisch veränderte Stammzellen ein erhöhtes Vermehrungspotential aufweisen und sich so in Stammzellkulturen gegenüber „normalen“ Zellen durchsetzen. Dieses Phänomen wird insbesondere relevant, wenn für therapeutische Zwecke, z. B. für das sogenannte „*Tissue Engineering*“, die Herstellung großer Zellmengen notwendig ist. Wie schon im sechsten Stammzellbericht diskutiert wurde, kommen genetische Veränderungen einzelner Zellen auch natürlicherweise in verschiedenen Körpergeweben (z. B. in der Leber) vor und sind nicht zwingend mit dem Verlust von Zellfunktionen verbunden (Shuga et al., 2010). Auch ist die Neigung zu genetischen Anomalien in verschiedenen Zelltypen durchaus unterschiedlich stark ausgeprägt. So ist zum Beispiel seit vielen Jahren bekannt, dass kultivierte Endothelzellen, also Zellen, die die Blutgefäße auskleiden, in größerem Maße zu chromosomalen Anomalien neigen als zum Beispiel Bindegewebszellen (Johnson et al., 1992; Nichols et al.,

1987). Inwieweit auch die Neigung zu kleineren Mutationen, wie beispielsweise Austausch oder Einfügung bzw. Verlust einzelner Basenpaare, zelltypabhängig ist, ist bisher nicht detailliert mit Daten belegt. In jedem Fall hat die Untersuchung der Entstehung, der Anreicherung, der Verbreitung und der Auswirkung von genetischen Anomalien in pluripotenten Stammzellen für das Verständnis von der Zellfunktion und der Tumorbildung höchste Bedeutung, insbesondere im Hinblick auf therapeutische Anwendungen.

Im folgenden werden drei Klassen von Mutationen getrennt voneinander betrachtet, da hier große Unterschiede bezüglich Entstehung, Vorkommen und therapeutischer Relevanz bestehen: große chromosomale Anomalien, kleine subchromosomale Anomalien und Mutationen des mitochondrialen Genoms.

### 2.3.3.1 Vorkommen und Entstehung chromosomaler Anomalien in Stammzellen

In Zellen finden sich unterschiedliche Typen numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen, sogenannte Polyploidien (Vermehrung ganzer Chromosomensätze), Aneuploidien (Verlust oder Duplikation einzelner Chromosomen), sowie Translokationen (Integration in ein anderes Chromosom), Inversionen, Deletionen oder Duplikationen von Chromosomenfragmenten. Solche chromosomalen Anomalien können auf unterschiedliche Art und Weise entstehen. Hier spielen Fehler im Vorfeld einer Zellteilung genauso eine Rolle wie die fehlerhafte Trennung von Chromatiden. So können numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen durch fehlerhafte Trennung von Chromatiden während der Zellteilung verursacht werden (Burrell et al., 2013; Ozeri-Galai et al., 2012). Strukturelle Chromosomenaberrationen können außerdem durch Brüche an einem oder mehreren Chromosomen bedingt sein, denen eine fehlerhafte Reparatur folgt. Derartige Brüche können z. B. durch ionisierende Strahlung oder chemische Mutagene verursacht werden. Numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen treten aber auch im Zusammenhang mit der alterungsbedingten Verkürzung der Chromosomenenden, der sogenannten Telomere, auf. Telomerfreie Enden unterschiedlicher Chromosomen können fusionieren; bei nachfolgenden fehlerhaften Zellteilungen entstehen neue Brüche, Chromosomen werden ungleich auf Tochterzellen verteilt, was zur Entwicklung von Aneuploidien oder, durch Abbruch der Zellteilung, zu Polyploidien führen kann (Pampalona et al., 2012; Pampalona et al., 2010). In somatischen Zellen ist die Aktivierung eines Zellzyklus-Checkpoints der primäre Kontrollmechanismus, um zu verhindern, dass entsprechende Zellen weitere Anomalien ausbilden und zu Tumorzellen entarten. ES-Zellen und iPS-Zellen scheinen diesen Kontrollmechanismus aufgrund der schnellen Zellteilungsrate nicht zu nutzen. Stattdessen wird hier der programmierte Zelltod (Apoptose) als alternativer Schutzmechanismus aktiviert (Desmarais et al., 2012; Desmarais et al., 2016).

Eine weitere Ursache für die Entstehung struktureller Chromosomenveränderungen in humanen pluripotenten Stammzellen ist die Mobilisierung endogener Retrotransposons, die als Folge des Reprogrammierungsvorgangs in der Mehrzahl der bisher daraufhin untersuchten humanen pluripotenten Stammzelllinien stattfindet (Arokium et al., 2014; Klawitter et al., 2016). Es konnte gezeigt werden, dass resultierende Neuinsertionen solcher transponierbaren Elemente (TEs) die Expression betroffener Gene der Wirtzelle beeinflussen können (Klawitter et al., 2016). Obwohl anhand von Patientenblutproben nachgewiesen wurde, dass genomische Rekombinationsereignisse zwischen TEs stattfinden und zu chromosomalen Translokationen führen können (Robberecht et al., 2013), ist noch unklar, ob TEs für chromosomale Aberrationen in pluripotenten Stammzellen verantwortlich sind.

In einer ganzen Reihe von Studien wurde von chromosomalen Veränderungen in Langzeitkulturen von embryonalen Stammzellen und iPS-Zellen berichtet (Lund et al., 2012; Ronen and Benvenisty, 2012); siehe auch fünfter und sechster Stammzellbericht). Typischerweise wird das verstärkte Auftreten von Anomalien des Karyotyp bei einer hohen Anzahl von Passagen der Zellkultur beobachtet (Draper et al., 2004 61; International Stem Cell Initiative et al., 2011 63; Liu et al., 2014 45). Ob derartige chromosomale Veränderungen überwiegend schon aus dem zugrundeliegenden Embryo stammen oder erst während der Zellkultur entstehen und nachfolgend aufgrund von Wachstumsvorteilen in der Zellkultur angereichert werden (Mitalipova et al., 2005 62), ist noch nicht abschließend geklärt.

Nach aktuellem Kenntnisstand scheinen keine generellen Unterschiede bezüglich der Häufigkeit karyotypischer (mikroskopisch erkennbarer) Veränderungen zwischen ES- und iPS-Zellen zu bestehen (Taapken et al., 2011). Allerdings sind beim Auftreten genetischer Veränderungen in iPS-Zellen, wie es schon in den letzten beiden Berichten kurz dargestellt wurde, möglicherweise weitere (als für ES-Zellen bekannte) Mechanismen von Bedeutung. Auch wurde in einer (allerdings bisher nicht reproduzierten) Studie von unterschiedlichen Aneuploidieraten in iPS-Zellen berichtet, die mit unterschiedlichen nicht-integrierenden Vektoren hergestellt worden waren (Schlaeger et al., 2015). Nicht abschließend geklärt ist außerdem, ob Anomalien des Karyotyp in iPS-Zellen in der Mehrzahl aus den Ursprungszellen stammen, ob sie während der Reprogrammierung entstehen

und erst in der Stammzellkultur angereichert und sichtbar werden oder ob sie erst während der Stammzellkultur entstehen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob iPS-Zellen, die aus Spenderzellen älterer Patienten mit verkürzten Telomeren hergestellt wurden, möglicherweise vermehrt chromosomale Aberrationen aufweisen. Weltweit werden diese Fragen derzeit intensiv untersucht.

### 2.3.3.2 Kleine (submikroskopische) Mutationen in Stammzellen

Wie schon in den vorhergehenden Berichten dargestellt, sind die zelleigenen DNA-Reparatur- bzw. Schutzmechanismen zur Vermeidung solcher kleineren Mutationen in pluripotenten Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zelllinien offenbar besonders stark ausgebildet. Es gibt derzeit keine Hinweise auf eine übermäßige Anreicherung kleinerer Mutationen in pluripotenten Stammzellen (Rouhani et al., 2016; Tichy, 2011). Wie schon in den vorhergehenden Berichten dargestellt, sind die zelleigenen DNA-Reparatur- bzw. Schutzmechanismen zur Vermeidung solcher kleineren Mutationen in pluripotenten Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zelllinien offenbar besonders stark ausgebildet. Es gibt derzeit keine Hinweise auf eine übermäßige Anreicherung kleinerer Mutationen in pluripotenten Stammzellen (Rouhani et al., 2016; Tichy, 2011). Zur Häufigkeit kleinerer (Deletionen, Insertionen und Punktmutationen, sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) und mittelgroßer Veränderungen (Copy Number Variations, CNVs) in ES-Zellen im Vergleich zu iPS-Zellen gibt es bisher keine einheitliche und erst recht keine solide Datenlage. Johannesson et al. berichten von einer vergleichbaren Rate von SNVs in iPS-Zellen und über Kerntransfer hergestellten ES-Zellen, während über Parthenogenese hergestellte ES-Zellen eine signifikant geringere Zahl von SNVs zeigten. Ma et al. zeigen vergleichbare CNV-Zahlen in iPS-Zellen und über Kerntransfer hergestellten ES-Zellen (Johannesson et al., 2014; Ma et al., 2014).

Subpopulationen von ES-Zellen scheinen, genauso wie Subpopulationen somatischer Zellen, auch submikroskopische strukturelle Aberrationen, CNVs in Form eines Mosaiks zu enthalten (Jacobs et al., 2014). Solche CNVs sind mikroskopisch nicht sichtbar, können aber eine erhebliche Ausdehnung haben und sind über die Technik der sogenannten „array-based comparative genome hybridisation“ (aCGH) detektierbar. Zwischen hES-Zellen, die mittels Kerntransfer hergestellt wurden, und iPS-Zellen scheint es bzgl. der Häufigkeit von CNVs keine signifikanten Unterschiede zu geben (Ma et al., 2014). Zudem liegen Hinweise darauf vor, dass in Maus-iPS-Zellen auch Replikationsstress während der Kultivierung für die Bildung von CNVs von Bedeutung ist. Im Hinblick auf SNPs wurden hingegen keine Unterschiede zwischen iPS- und ES-Zellen, die mittels Kerntransfer hergestellt wurden, nachgewiesen (Johannesson et al., 2014). Allerdings waren in beiden Zelltypen mehr *De-novo*-Mutationen detektierbar als in parthenogenetischen ES-Zellen (Johannesson et al., 2014). Ob für die erhöhte Zahl von Mutationen der Prozess der somatischen Reprogrammierung ursächlich ist, ist noch ungewiss.

Der Mechanismus der Entstehung kleiner kerngenomischer Mutationen ist bekanntermaßen ein anderer als bei der Entstehung großer chromosomaler Anomalien. Kleinere genetische Veränderungen, z. B. Insertionen, Deletionen oder der Austausch einzelner Basenpaare, können spontan entstehen oder sind Folge des Einflusses von mutagenen Substanzen oder von Strahlung. Während solche DNA-Schäden in pluripotenten Stammzellen durch zelleigene Reparaturmechanismen schnell repariert werden, ist die Fehlerrate bei solchen Reparaturprozessen in Abhängigkeit vom verwendeten zellulären Reparaturmechanismus durchaus nicht unerheblich. So geht man von einer durchschnittlichen Mutationsrate von  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  pro Gen und Zellteilung für humane Zellen aus (Araten et al., 2005). Wenn man eine Zahl von ca. 25.000 proteinkodierenden humanen Genen zugrundelegt, hieße dies, daß es statistisch bei jeder vierzigsten bis vierhundertsten Zellteilung zu einer Mutation in einem proteinkodierenden Gen kommt. Basierend auf dieser Kalkulation kann davon ausgegangen werden, daß bereits während der Embryonalentwicklung zahlreiche Mutationen entstehen, die dann bereits in einem Teil der  $10^{13}$  bis  $10^{14}$  Zellen eines Neugeborenen existieren (Bianconi et al., 2013; Frank, 2010). Selbst iPS-Zellen, die aus neonatalen Zellquellen wie Nabelschnurblut hergestellt werden, enthalten demnach bereits eine große Zahl von genetischen Veränderungen, die nicht von den Eltern vererbt worden sind. Bisherige Daten lassen in Übereinstimmung damit auch vermuten, dass die Häufigkeit kleinerer genetischer Veränderungen in iPS-Zellen und die Variationsbreite zwischen einzelnen iPS-Zellklonen eines Spenders höher ist als in ES-Zellen, die aus frühen Embryonen gewonnen worden sind (Ben-David and Benvenisty, 2011).

Letztendlich ist auch immer noch ungeklärt, ob der Prozess der Reprogrammierung somatischer Zellen selbst mutagen ist und folglich Mutationen erzeugt (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011; Sugiura et al., 2014). Möglicherweise ist die große Mehrheit der in iPS-Zellen detektierbaren genomischen Varianten auch schon in mehr oder weniger großen Subpopulationen der Ursprungszellen vorhanden (Gore et al., 2011; Young et al., 2012) und erleichtert die Zugänglichkeit der somatischen Zellen für eine Reprogrammierung im

Sinne eines Selektionsvorteils. Auch gibt es unverändert keine Hinweise auf Unterschiede in der Häufigkeit und Art von genetischen Veränderungen infolge des Einsatzes unterschiedlicher Reprogrammierungsmethoden (Bhutani et al., 2016), sowie in Abhängigkeit von den verwendeten Ausgangszelltypen, vom Alter des Spenders oder von der Zahl der Zellteilungen *in vitro* vor Reprogrammierung (Ronen and Benvenisty, 2012). Völlig unklar ist auch weiterhin, welche Anomalien im Hinblick auf den Verlust von Zellfunktionen oder auf das Risiko einer Tumorbildung überhaupt von Bedeutung sind. Vermutlich werden aber zukünftige Studien mehr Klarheit hierzu bringen. Entsprechende Erkenntnisse sollten dann auch Grundlage für die weitere Optimierung von Reprogrammierungsprotokollen mit dem Ziel sein, genetische Schäden und epigenetische Veränderungen zu vermeiden (Barrilleaux and Knoepfler, 2011).

### 2.3.3.3 Mutationen des Mitochondriengenoms

Neben dem Kerngenom spielt auch das Genom der in der Zelle enthaltenen Mitochondrien, der „Kraftwerke der Zelle“, eine große Rolle für die Zellfunktion. Es sind eine ganze Reihe von genetisch bedingten Erkrankungen bekannt, die auf Mutationen des mitochondrialen Genoms beruhen, so z. B. das Kearns-Sayre Syndrom, die Lebersche Optikusatrophie (LHON) oder das multisystemische MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*). Aber auch verschiedene alterungsbedingte Erkrankungen wie z. B. Parkinson, Alzheimer oder Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) haben vermutlich eine mitochondriale Komponente (Chinnery, 1993).

Die Mutationsrate des Mitochondriengenoms scheint etwa zehn- bis zwanzigfach höher zu sein als die des Kerngenoms (Wallace, 1994). Je nach Zelltyp kann eine Zelle jedoch einige wenige bis tausende Mitochondrien besitzen. Mutierte und nicht mutierte Mitochondrien koexistieren häufig in derselben Zelle. Erst wenn ein bestimmter Anteil mutierter Mitochondrien vorliegt, führt dies zur Erkrankung (Rossignol et al., 2003). In den meisten Geweben gesunder Individuen konnte bisher keine Akkumulation mitochondrialer Mutationen nachgewiesen werden. Allerdings sind besonders in alternden Geweben mit geringer Zellteilungsaktivität wie Gehirn, Herz und Skelettmuskel häufig große Deletionen des mitochondrialen Genoms nachweisbar. Dies wirft die Frage auf, ob iPS-Zellen, die aus Spenderzellen älterer Patienten gewonnen wurden, möglicherweise erhöhte Mutationsfrequenzen in ihren Mitochondrien tragen. Erhöhte Anteile an mutierten Mitochondrien könnten Auswirkungen nicht nur auf die zelluläre Funktionalität (Cherry et al., 2013; Zweigerdt et al., 2014), sondern möglicherweise auch auf die Tumorentstehung haben (Chatterjee et al., 2006). Schon 2011 wurde gezeigt, dass humane iPS-Zellen unterschiedlichste Mutationen des mitochondrialen Genoms aufweisen (Prigione et al., 2011). In einer anderen Publikation wurde von einem gehäuften Auftreten von Deletionen im Mitochondrien-Genom humaner embryonaler Stammzellen berichtet (Van Haute et al., 2013).

### 2.3.4 Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen

Wie schon in den vorhergehenden Stammzellberichten dargestellt wurde, ist das Einbringen fremder Gensequenzen bzw. die gezielte Veränderung des Genoms von hES-Zellen und anderen pluripotenten Stammzellen von großer Bedeutung für die Klärung grundlegender entwicklungsbiologischer Fragestellungen, für die Entwicklung pharmakologischer und toxikologischer Testsysteme und für potentielle klinische Anwendungen von Stammzellderivaten. Dabei werden die „klassischen“ Gentransfer-Methoden, die zu einer zufälligen Integration des Transgens in das Genom der Wirtszelle mit den damit verbundenen Nachteilen (vgl. auch fünfter Stammzellbericht) führen, zunehmend von alternativen Methoden abgelöst, die diese Nachteile nicht oder nur in geringem Maße haben.

So sind – alternativ zu klassischen gentechnischen Modifikationen – nunmehr Technologien verfügbar, mit denen ausgewählte Proteine für einen begrenzten Zeitraum in der Zelle produziert werden können, ohne dass dafür das Erbgut der Zielzelle modifiziert zu werden braucht (synthetische mRNAs, microRNAs, RNA-Viren; vgl. auch fünfter und sechster Stammzellbericht). Verwandte Methoden (Transfektion mit sogenannten siRNAs oder shRNAs) lassen sich ebenfalls für eine weitgehende Ausschaltung der Aktivität spezifischer Gene nutzen.

Stark zunehmende Verbreitung finden unterdessen neue Methoden der „Genom-Editierung“, mit denen eine gezielte und effiziente Modifikation des menschlichen Genoms, auch in humanen pluripotenten Stammzellen, über sogenannte Designernukleasen möglich ist (Merkert and Martin, 2016).

### 2.3.4.1 Verfahren zur Genom-Editierung in pluripotenten Stammzellen

Auf den sogenannten „Designernukleasen“ basierende Methoden sind grundsätzlich geeignet, um krankheits-spezifische Mutationen in iPS-Zellen zu korrigieren, die aus Patienten mit genetischen Erkrankungen isoliert wurden. Sie finden aber auch Anwendung, wenn aus Wildtyp-iPS-Zellen spezifische Mutationen für die Entwicklung von *In-vitro*-Krankheitsmodellen eingebracht werden sollen (Sterneckert et al., 2014).

So wurden Protokolle entwickelt, mit denen eine gezielte und effiziente Modifikation des Genoms auch in humanen pluripotenten Stammzellen möglich ist (vgl. auch sechster Stammzellbericht (Kim and Kim, 2014)). Die Effizienz dieser neuen Genmodifikationstechnologien ist dabei in hES- und iPS-Zellen prinzipiell vergleichbar. Entsprechende Verfahren haben in den letzten Jahren rasant an Bedeutung gewonnen, und die Zusammenführung von iPS-Technologie mit den neuen Genom-Editierungs-Technologien wird als Schlüsseltechnologie für die Wirkstoffforschung und die Toxikologie, aber auch für die Regenerative Medizin, betrachtet (Merkert and Martin, 2016). Mit Hilfe von Designer-Nukleasen können therapeutische Transgene, genauso wie z. B. fluoreszierende Reportergene, die ein automatisiertes Wirkstoffscreening oder den Nachweis von Zellen nach Transplantation im Tiermodell ermöglichen, gezielt an spezifische Stellen im Genom pluripotenter Zellen eingebracht werden. Auch ist unterdessen eine rückstandslose Korrektur von Mutationen oder das Einbringen krankheitsassoziiierter Mutationen möglich, um nur einige der vielfältigen Anwendungen zu nennen (Merkert et al., 2014). Die Genom-Editierung von krankheitsspezifischen iPS-Zellen wurde unterdessen, insbesondere im Bereich der seltenen Erkrankungen, schon vielfach erfolgreich für die Entschlüsselung von Krankheitsmechanismen eingesetzt (Sterneckert et al., 2014).

Die unterschiedlichen „Designer-Nukleasen“ besitzen zum einen eine Komponente, die einen Strangbruch in die DNA einfügt, zum anderen eine Erkennungsdomäne, die dafür sorgt, dass der gezielte Schnitt im DNA-Strang nur an einer ganz bestimmten Nukleotidsequenz stattfindet. Bislang sind drei maßgebliche Typen von Nukleasen für die gezielte gentechnische Modifikation pluripotenter Stammzellen verfügbar: Zink-Finger-Nukleasen, TALE- (Transcription activator like effector) Nukleasen und das CRISPR/Cas9-System.

Sowohl die TALE-Nukleasen als auch das CRISPR/Cas9-System sind in Baukastensystemen für akademische Forschergruppen verfügbar. Beide Systeme sind relativ einfach zu konstruieren und mit begrenztem Arbeitsaufwand herstellbar (Gaj et al., 2013). Auch wenn die Anwendung in pluripotenten Stammzellen, in Abhängigkeit vom geplanten genomischen Lokus und der „Targeting“-Strategie, nicht trivial ist (Hendriks et al., 2016; Merkert and Martin, 2016), wurden TALENs und vor allem das CRISPR/Cas-System bereits vielfach sehr erfolgreich in ES- und iPS-Zellen eingesetzt (Ding et al., 2013; Mali et al., 2013). Die Zink-Finger-Nuklease-Technologie (ZFN-Technologie) hat in den letzten Jahren aufgrund des hohen Aufwands für die Entwicklung zielspezifischer ZFNs hingegen kontinuierlich an Bedeutung verloren.

Darüber hinaus werden die genannten Technologien nicht nur zur Veränderung des Zielgenoms genutzt, sondern auch, um die Expression von Genen gezielt an- und abzuschalten. Dazu werden Erkennungssequenzen, wie sie in Designernukleasen genutzt werden, nicht an DNA-schneidende Enzyme gekoppelt, sondern an Faktoren, die in der Lage sind, das Ablesen („die Transkription“) von DNA zu hemmen oder zu aktivieren (Polstein et al., 2015). Dafür kann z. B. die Cas9-Nuklease des CRISPR-Cas-Systems mit Transkriptions-Repressoren oder -Aktivatoren gekoppelt werden (Gilbert et al., 2013).

### 2.3.4.2 Entwicklung von Keimzellen aus Stammzellen

Wie oben dargestellt, lassen sich mit Hilfe von Designer-Nukleasen relativ effizient genetisch veränderte hES- und hiPS-Zellen herstellen. Aus solchen genetisch modifizierten humanen pluripotenten Stammzellen sollten sich prinzipiell auch entsprechend genetisch modifizierte Zellen der Keimbahn generieren lassen, doch steht der experimentelle Beleg für diese Hypothese noch aus. Im Berichtszeitraum wurden von verschiedenen Gruppen Protokolle zur Differenzierung von primordialen Keimzellen aus hES- oder hiPS-Zellen publiziert (Irie et al., 2015; Sasaki et al., 2015; Sugawa et al., 2015). Die dabei entstandenen Zellen weisen allerdings noch nicht die Reife auf, die für einen Einsatz als funktionale Gameten zur Generierung von Fertilisations-Embryonen erforderlich wäre. Darüber hinaus wird kontrovers diskutiert, ob aus Stammzellen im Stadium der bestimmten Pluripotenz (*primed pluripotency*, siehe 2.3.1.) überhaupt funktionelle Keimzellen abgeleitet werden können, weil diese in ihren Eigenschaften eher den Epiblast-Stammzellen der Maus gleichen, die keine Keimbahnkompetenz aufweisen. Deswegen wird postuliert, dass eine erfolgreiche Generierung von Keimzellen eher aus Stammzellen im Stadium der naiven Pluripotenz gelingen kann. Anscheinend lassen sich jedoch auch aus hES- bzw. hiPS-Zellen, die nicht im Stadium der naiven Pluripotenz kultiviert wurden, Keimbahn-Vorläuferzellen gewinnen.

Diese *human primordial germ cell-like cells* (hPGCLC) entsprechen am ehesten sehr frühen primordialen Keimzellen des Menschen, wobei anzumerken ist, dass die jeweiligen molekularen Untersuchungen der nach den jeweiligen Protokollen differenzierten Zellen zeigen, dass die Keimzellendifferenzierung in der Maus und beim Menschen sehr unterschiedlich reguliert wird. Dementsprechend lässt sich aus der Tatsache, dass aus Maus-ES-Zellen hergestellte Keimbahnzellen die Meiose komplett durchlaufen und sich zu befruchtungsfähigen Spermatozoiden entwickeln, die erfolgreich zur künstlichen Befruchtung eingesetzt werden konnten (Zhou et al., 2016), nicht unmittelbar ableiten, dass dies auch mit hES- oder hiPS-Zellen gelingen könnte.

### 2.3.5 Generierung von chimären Tieren durch Embryoaggregation mit ES- / iPS-Zellen

Die Möglichkeit, therapeutisch nutzbare Zellen, Gewebe und Organe über die Aggregation eines nicht-humanen Embryos mit humanen pluripotenten Zellen in Nutztieren herzustellen, wurde erstmals mit der Entwicklung eines iPS-abgeleiteten Rattenpankreas in der Maus offensichtlich (Kobayashi et al., 2010). Bei solchen Inter-Spezies-Chimären werden Empfängerembryonen *in vitro* mit pluripotenten Spender-Zellen einer anderen Spezies aggregiert, wobei sich die hinzugefügten Zellen in die innere Zellmasse der sich entwickelnden Blastozyste integrieren und es somit zu einer Weiterentwicklung des Embryos als Chimäre über das Fötalstadium bis zur Geburt kommen kann. Derartig hergestellte chimäre Zellkonstrukte könnten zukünftig darüber hinaus auch für Testsysteme in der Wirkstoffforschung oder Toxikologie verwendet werden (Yoshizato and Tateno, 2013).

Die Technologie der Embryoaggregation ist also ähnlich wie die der intrauterinen Zelltransplantation in fötale Schafe (Almeida-Porada et al., 2004) ein Versuch, humanisierte Organe im Nutztier züchten zu können. Weil bei der Embryoaggregation Master-Regulatoren für bestimmte Organsysteme in den Empfänger-Embryonen künstlich stillgelegt werden können, kann ggf. eine wesentlich höhere Effizienz zur Generierung (teil-)humanisierter Organe erreicht werden. Für die Herstellung humaner Transplantate über Embryoaggregation wird wegen der ähnlichen Organgrößen derzeit das Schwein favorisiert. Technologien zur Chimärenbildung im Schwein wurden zumindest insoweit etabliert, als dass die innere Zellmasse von Schweine-Blastozysten erfolgreich in (entwicklungsdefiziente) parthenogenetische (über „Jungferzeugung“ hergestellte) (Schweine)Embryonen übertragen wurde, was zur effizienten Entwicklung chimärer Föten führte (Nakano et al., 2013).

Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen, chimäre Schweine herzustellen, bei denen humane Zellen während des Fötalstadiums nachweisbar waren. Hier mögen Spezies-Inkompatibilitäten auf molekularer Ebene genauso wie unterschiedliche Wachstumskinetiken von humanen und porzinen Zellen eine Rolle spielen. Die Tatsache, dass bereits erfolgreich ES-Zell-Chimären in Javaneraffen hergestellt werden konnten (Chen et al., 2015), weist darauf hin, dass eine Chimärenbildung, die auf pluripotenten humanen Zellen basiert, technisch möglich sein sollte. Jüngere Arbeiten deuten allerdings darauf hin, dass für die Chimärenbildung unter Verwendung pluripotenter Stammzellen möglicherweise „naïve“ hES-Zellen (s. 2.3.1), die den ES-Zellen der Maus vergleichbar sind, besser geeignet sind als die klassischen Epiblast-artigen humanen pluripotenten Stammzellen (Wu et al., 2015).

### 2.4 Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen

Im Berichtszeitraum hat sich die Ansicht verfestigt, dass es unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus keine somatischen Zellen gibt, die Eigenschaften pluripotenter Zellen besitzen, also ähnlich wie embryonale Stammzellen funktionelle Derivate aller drei Keimblätter und Keimzellen bilden können. Nicht unerwähnt bleiben sollte aber der Forschungsskandal um die angebliche Generierung sogenannter STAP-Zellen (*stimulus-triggered acquisition of pluripotency*-Zellen). Ein japanisch-amerikanisches Autorenteam hatte Daten vorgestellt, die eine Induktion von Pluripotenz in somatischen Zellen nach Stimulation durch Stressoren, wie durch einen unphysiologisch niedrigen pH-Wert, belegen sollten (Obokata et al., 2014). Diese Daten waren unmittelbar nach ihrer Publikation in der Zeitschrift *Nature* bereits höchst umstritten, und es kamen schnell erhebliche Zweifel an der Reproduzierbarkeit des technisch einfachen Zellkultur-Verfahrens auf. Aufgrund vielfacher experimenteller Verwechslungen wurde die Arbeit im Juli 2014 zurückgezogen, und es scheint erwiesen, dass eine Vielzahl der präsentierten Daten mit Maus-ES-Zellen produziert wurde (Konno et al., 2015) und dass das STAP-Phänomen nicht reproduzierbar ist (De Los Angeles et al., 2015).

In Bezug auf Organ(system)-spezifische Stammzellen wird gegenwärtig hinterfragt, ob das aus der Hämatopoese abgeleitete Paradigma einer hierarchischen Kaskade von Stammzellen und Vorläuferzellen tatsächlich auf alle Organe anwendbar ist (Clevers, 2015) oder ob es auch andere endogene Zellersatzmechanismen gibt, die nicht einer solchermaßen strengen Ordnung unterliegen. Als Beispiel dafür könnte u. a. die Leber angesehen werden, wo es unter physiologischen Bedingungen vermutlich keine Zellen gibt, die als ruhende Stammzellen eine organotypische Funktion ausüben. Allerdings lassen sich in neuen dreidimensionalen Zellkulturverfahren bi-potente



Vorläuferzellen propagieren, die sich klonal selbst erneuern können und die sich zu Cholangiozyten und Hepatozyten differenzieren lassen (Huch et al., 2015). Mit ähnlichen Konzepten wird gegenwärtig an der Möglichkeit gearbeitet, weitere multipotente Zellpopulationen anderer Organsysteme für *In-vitro*-Studien in der Zellkultur vermehren zu können.

#### 2.4.1 Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus PID-Embryonen

Die Generierung von hES-Zellen aus Embryonen, die im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik (PID) nicht für die Übertragung auf die Patientin ausgewählt wurden, hat in den vergangenen Jahren international wieder an Bedeutung für die Erforschung von Entwicklungsdefekten und die Etablierung von Krankheitsmodellen gewonnen. Im amerikanischen Register der für eine NIH-Förderung zugelassenen hES-Zelllinien finden sich einige Anbieter, die solche Erkrankungs-spezifischen Zellen anbieten. Die Firma Genea Biocells bietet ca. 70 hES-Zelllinien für mehr als 30 Erkrankungen an, von denen ca. 45 bereits im NIH-Register geführt werden und deren Herstellung und Charakteristika in wissenschaftlichen Fachartikeln zum Teil publiziert wurden (Dumevska et al., 2016). Weitere größere Sammlungen derartiger Zellen bieten das Tel Aviv Sourasky Medical Center mit ca. 45 hES-Zelllinien und das King's College London mit ca. 20 Linien, die auch im NIH-Register aufgeführt sind

#### 2.4.2 Gewinnung von Stammzellen aus Keimzellen und deren Vorläuferzellen

Über die vorangehenden Stammzellberichte hinaus haben sich im Berichtszeitraum nur wenige neue wissenschaftliche Erkenntnisse hinsichtlich der Gewinnung von Stammzellen aus Keimzellen oder deren Vorläuferzellen ergeben. Die Erkenntnisse stammen überwiegend aus der Maus (Oliveros-Etter et al., 2015; Tanaka et al., 2015). Eine Übersichtsstudie über das Entwicklungspotenzial primordialer Keimzellen der Maus zeigte zudem, dass eine Injektion dieser Zellen in eine Blastozyste oder ihre Aggregation mit einem Embryo nicht zur Entstehung chimärer Tiere führte (Leitch et al., 2014). Diese Arbeit legt daher nahe, dass die *In-vitro*-Generierung pluripotenter Stammzellen aus primordialen Keimzellen kein physiologisches Korrelat hat, sondern wohl erst aufgrund der Pluripotenz-fördernden Zellkulturbedingungen induziert wird. Dies ist deswegen bemerkenswert, weil damit die Möglichkeit einer Pluripotenz-Induktion ohne gezielte Modulation von Transkriptionsfaktor-Netzwerken durch Expression von Reprogrammierungsfaktoren zumindest für murine Zellen aufgezeigt wird. In diesem Zusammenhang ist berichtenswert, dass die unterschiedliche Interpretation der Daten zur Generierung humaner pluripotenter Stammzellen aus adultem Hodengewebe zwischenzeitlich zum Zurückziehen der entsprechenden bereits im Jahr 2008 in Nature publizierten Arbeit geführt hat (Nature-Editors, 2014).

#### 2.4.3 Fötale Stammzellen

In gegenwärtigen Berichtszeitraum haben sich keine wesentlichen neuen Erkenntnisse zu den stammzellbiologischen Eigenschaften und zur Anwendung fötaler Stammzellen ergeben. Wie in den letzten Berichten dargestellt wurde, gibt es weiterhin Studien, u. a. für den Morbus Parkinson, in denen auch die Transplantation fötaler Stammzellen zu therapeutischen Zwecken evaluiert wird.

#### 2.4.4 Fortschritte in der Reprogrammierung von Körperzellen

Wie schon in den letzten Stammzellberichten dargestellt wurde, konnte unterdessen die Reprogrammierung von Körperzellen bzw. Herstellung von iPS-Zellen (Takahashi et al., 2007), auch im Hinblick auf klinische Anwendungen daraus hergestellter Zellprodukte, weiter verbessert werden (Buganim et al., 2013). Mittlerweile konnte auch eine beträchtliche Zahl deutscher Forschergruppen die Herstellung und Kultur humaner iPS-Zellen erfolgreich etablieren. Von großer Bedeutung war dabei sicherlich die Möglichkeit, humane embryonale Stammzellen als „Goldstandard“ nutzen zu können.

Unterdessen scheint die anfänglich geringe Effizienz der Reprogrammierung nicht mehr limitierend für die Herstellung von iPS-Zellen zu sein, und verschiedene nicht- oder minimalinvasiv zu gewinnende Zelltypen (z.B. Blutzellen, Haarwurzelzellen und sogar aus Urin isolierbare Zellen) stehen als Zellquelle zu Verfügung. Die Nutzung integrierender Reprogrammierungsvektoren stellt zwar in vielen akademischen Laboren immer noch die Standard-Reprogrammierungstechnologie dar. Neuere Ansätze, die die Herstellung nicht-transgener iPS-Zellen ermöglichen, wurden jedoch kontinuierlich weiterentwickelt, liefern qualitativ hochwertige iPS-Zellen und stehen mittlerweile kommerziell zur Verfügung. Verschiedene Hersteller bereiten auch GMP-kompatible Produkte zur Herstellung klinisch einsetzbarer iPS-Zelllinien vor. Eine gute vergleichende Übersicht zu Techniken für die Herstellung von iPS-Zellen bietet die Publikation von (Schlaeger et al., 2015).

Weiterhin nicht endgültig beantwortet sind Fragen zur genetischen und epigenetischen Integrität von iPS-Zellen aus unterschiedlichen Zellquellen im Vergleich zu embryonalen Stammzellen. Dies schließt auch das mitochondriale Genom ein. Da Veränderungen des mitochondrialen Genoms für Alterungsprozesse und eine ganze Reihe von Erkrankungen relevant sind, stellt sich die Frage, ob iPS-Zellen von älteren Spendern möglicherweise einen qualitativ minderwertigen Pool an Mitochondrien besitzen. Auch aufgrund solcher weiterhin ungeklärten Fragen zur Qualität und Verwendbarkeit von iPS-Zellen sind hES-Zellen in vielen Forschungsprojekten immer noch als Referenzmaterial unverzichtbar.

#### 2.4.5 Transprogrammierung und Transdifferenzierung

Das Konzept der Programmierung von Zellen lässt sich auch auf andere induzierte Umwandlungsprozesse anwenden. Zum einen wird gelegentlich auch die gerichtete Differenzierung (pluripotenter) Stammzellen in funktionale somatische Zellen als Vorwärts-Programmierung bezeichnet, wenn diese durch forcierte Expression von Genen für gewebetypische Transkriptionsfaktoren angestoßen wird. Die Kombination aus Reprogrammierung und Differenzierung in einem Verfahren lässt sich somit auch als Transprogrammierung verstehen: ein somatischer Zelltyp wird durch Umprogrammierung seiner Genregulation direkt in einen anderen Zelltyp umgewandelt. Dass eine solche Umwandlung, beispielsweise von Bindegewebs- in Muskelzellen oder von Monozyten in Granulozyten, also innerhalb des gleichen Keimblatts möglich ist, wurde schon in den 1990er Jahren erforscht (Graf, 2011). Die Arbeiten von Marius Wernig (Stanford, USA) aus dem Jahr 2010 zeigten durch die Umwandlung von Fibroblasten (Mesoderm) in neuronale Zellen (Ektoderm) erstmals, dass eine solchermaßen forcierte Umprogrammierung auch über Keimblatt-Grenzen hinaus möglich ist (Vierbuchen et al., 2010). In den jeweiligen Kontrollexperimenten konnte gezeigt werden, dass der neu generierte Zelltyp weder als Kontamination in den Ausgangszellen vorlag, noch dass er lediglich durch die Zusammensetzung der zelltyp-spezifischen Nährlösung induziert wurde. Somit ist eine aktive Programmierung durch das jeweilige Set an Transkriptionsfaktoren klar belegt. Wie in den vorangegangenen Berichten dargestellt wurde, wurde eine solche Transprogrammierung mittlerweile für viele verschiedene Zelltypen beschrieben, unter anderem für Neurone, neuronale Stammzellen, Herzmuskelzellen, Leberzellen und hämatopoetische Zellen (Pfaff and Cantz, 2013). Unklar blieb dabei, inwieweit durch Transprogrammierung erzeugte Zellen therapeutische Anwendung finden können und ob eine Transprogrammierung auch mit Hilfe nicht-inserierender viraler Vektoren erreicht werden kann. Durch Letzteres könnte vor allem das Risiko einer zufälligen Integration von DNA-Sequenzen in das Genom (insertionelle Mutagenese) vermindert werden. Zwischenzeitlich konnte gezeigt werden, dass zumindest eine Transprogrammierung in neurale Vorläuferzellen (Wang et al., 2013) und in Leberzellen (Kim et al., 2015) auch mit Hilfe nicht-inserierender episomaler Expressionskonstrukte möglich ist.

Bezüglich einer möglichen therapeutischen Applikation transprogrammierter Zellen werden gegenwärtig zwei Szenarien diskutiert. Das erste Szenario umfasst die direkte Transprogrammierung einer großen Anzahl von Spenderzellen *in vitro* und deren nachfolgende Transplantation. Der Vorteil gegenüber iPS-Zell-basierten Protokollen läge darin, dass ein solches Zelltransplantat in verhältnismäßig kurzer Zeit (ca. 20 Tage) hergestellt werden könnte, weil die Expansion der anfänglich wenigen iPS-Zellen zu ausreichenden Zellmengen sowie der langwierige Differenzierungsprozess entfielen. Allerdings erlaubt dieses Szenario keine rigiden Qualitätskontrollen, wie sie bei einer klonal expandierten Zelllinie möglich sind, so dass beispielsweise genetische Anomalien in einer heterogenen Gesamtzellpopulation kaum feststellbar sind. Ein zweites Szenario umfasst eine Applikation der Transprogrammierungsfaktoren direkt im Organismus, so dass beispielsweise Bindegewebszellen im fibrotischen Herzinfarktgewebe sich wieder zu funktionellen Herzmuskelzellen entwickeln könnten. Allerdings wird dabei gegenwärtig die Effizienz der *In-Vivo*-Transprogrammierung, die Funktionalität der entstehenden Zellen und die Sicherheit der Applikationssysteme sehr kritisch diskutiert (Batty et al., 2016).

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

#### 2.5.1 Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen und 3D-Kultur Stammzell-abgeleiteter Organoide

Im aktuellen Berichtszeitraum sind weitere Verfeinerungen von Differenzierungsprotokollen für humane pluripotente Stammzellen erarbeitet worden. Dabei wurde der Fokus auf Reproduzierbarkeit und Anwendbarkeit der Protokolle auf verschiedene pluripotente Stammzelllinien sowie auf den Einsatz niedermolekularer Substanzen gerichtet. So konnte bereits eine ganze Reihe von aufwendig herzustellenden und damit teuren rekombinanten Proteinen durch kostengünstiger herzustellende Chemikalien als Differenzierungsfaktoren ersetzt werden.

Im Bereich der neuroektodermalen Differenzierung konnten Protokolle für weitere hochspezialisierte Zelltypen generiert werden, beispielsweise für eine Nährzell-freie Ableitung von Neuralleisten-Vorläuferzellen (Zeltner et al., 2014) oder für die Generierung Neuropeptid-sezernierender Hypothalamus-Neurone (Merkle et al., 2015). Außerdem gibt es Fortschritte in der Aufreinigung fehlregulierter Zellen früher Differenzierungsstadien, so dass Zellpopulationen mit wesentlich höherer Reinheit generiert werden können (Rodrigues et al., 2014).

Ähnliche Entwicklungen gibt es auch bei der Differenzierung entodermaler Zelltypen. Für die Generierung weiterer spezialisierter Zellen stehen nun beispielsweise auch Protokolle zur Differenzierung pluripotenter Stammzellen in Gallenwegszellen (Cholangiozyten) zur Verfügung (Dianat et al., 2014; Sampaziotis et al., 2015). In Bezug auf die Reproduzierbarkeit bzw. Robustheit von Differenzierungsprotokollen für unterschiedliche pluripotente Stammzelllinien wurden zudem verbesserte Strategien zur Aufreinigung der Zellpopulationen in frühen Differenzierungsstadien erarbeitet. So konnten Antikörper entwickelt werden, die spezifische Unterpopulationen des definitiven Entoderms erkennen und so zur Isolierung dieser Zellen eingesetzt werden können (Holtzinger et al., 2015). Eine Vielzahl von Arbeiten beschreibt außerdem die Weiterentwicklung entodermaler Differenzierungsprotokolle, wobei u. a. Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine, die nur unter hohem Aufwand in der benötigten Qualität produziert werden können, durch chemisch synthetisierte niedermolekulare Substanzen ersetzt wurden. Neben vielen Arbeiten zur optimierten Induktion des definitiven Entoderms mittels solcher Substanzen wurde im Berichtszeitraum ein Protokoll publiziert, das die Differenzierung von Leberzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen allein mit Hilfe verschiedener derartiger niedermolekularer Substanzen ermöglicht (Siller et al., 2015). Für die Insulin-produzierenden Betazellen des Pankreas wurde ein skalierbares Kultur- und Differenzierungssystem entwickelt, das die Generierung mehrerer hundert Millionen Inselzellen aus hES- bzw. hiPS-Zellen ermöglicht (Pagliuca et al., 2014).

Diese Entwicklung ist auch bei mesodermalen Differenzierungen weit fortgeschritten. So gibt es schon seit einigen Jahren Protokolle zur Gewinnung von Herzmuskelzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen unter komplett chemisch definierten Kulturbedingungen (Lian et al., 2013). Zudem konnten solche Protokolle auch für skalierbare Suspensionskulturen adaptiert werden (Kempf et al., 2015), so dass die Differenzierung auch sehr großer Zellmengen zu Kardiomyozyten technisch realisierbar scheint. Ähnlich lassen sich zwischenzeitlich auch Endothelzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen mit weiter entwickelten Protokollen differenzieren, die vollständig auf chemisch definierte Substanzen zurückgreifen (Bao et al., 2015). Bei der Differenzierung von hES- bzw. hiPS-Zellen in blutbildende, hämatopoetische Stammzellen gibt es insofern Fortschritte, als dass nunmehr die Interaktionen der zu differenzierenden Zellen mit Signalwegen der eigentlichen Zellnische, d. h. der natürlichen Umgebung im Gewebe, besser verstanden werden (Gori et al., 2015). Allerdings ist die Herstellung von hämatopoetischen Stammzellen, für die eine Langzeitrepopulation nachweisbar ist, noch nicht gelungen, weshalb Strategien zur direkten Umprogrammierung von Blutzellen besonders fokussiert entwickelt werden (Singbrant et al., 2015). Für mehr spezialisierte Zelltypen des Blutes konnten aber zwischenzeitlich deutlich robustere Differenzierungsprotokolle erarbeitet werden. Beispielsweise stehen nun Protokolle zur Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Granulozyten und Makrophagen (Lachmann et al., 2015) sowie auch zu Blutplättchen (Feng et al., 2014) oder T-Lymphozyten (Menon et al., 2015) zur Verfügung.

Ausgehend von den Arbeiten von Hans Clevers (Hubrecht Institut, Utrecht, Niederlande) zu intestinalen Stammzellen, die in Suspensionskultur selbstorganisierend dreidimensionale Darm-ähnliche zelluläre Hohlkörperchen, sogenannte Spheroide, bilden (Sato and Clevers, 2013), hat das Feld der Organoid-Kulturen im aktuellen Berichtszeitraum eine große Dynamik erfahren. So können vergleichbare Darm-Organoid-Kulturen auch aus hES- und hiPS-Zellderivaten generiert werden (Forster et al., 2014). Außerdem lassen sich ähnliche Kultursysteme auch für Vorläuferzellen der Leber etablieren, die in Spheroid-Kulturen genetisch stabil expandiert und nachfolgend weiter in Leber- bzw. Gallenwegszellen differenziert werden können (Huch et al., 2015). Ein anderer Ansatz, dreidimensionales Miniatur-Lebergewebe zu bilden, besteht darin, Leberzellen mit Endothel- und Bindegewebszellen gemeinsam zu kultivieren, bis sich dieses Zellgemisch selbstorganisierend zu einer dreidimensionalen Struktur wandelt. Dieses Leber-Organoid weist trotz gewisser Einschränkungen in relevantem Umfang Stoffwechseleigenschaften der Leber auf (Takebe et al., 2013). In ähnlicher Weise konnten in nachfolgenden Arbeiten auch Organoid-Kulturen aus Stammzell-abgeleiteten Nieren-, Bauchspeicheldrüsen-, Darm-, Herz-, Lungen- und Hirngewebe hergestellt werden (Takebe et al., 2015). Insbesondere die Herstellung neuraler Organoid-Kulturen hat, basierend auf den Arbeiten von Jürgen Knoblich (Wien, Österreich), eine sehr schnelle Verbreitung gefunden (Lancaster et al., 2013), weil sich dieses Kultursystem ideal zur Untersuchung entwicklungsbiologischer Mechanismen (Karus et al., 2014) und von Krankheitsmechanismen (Lancaster and Knoblich, 2014) eignet.

### 2.5.2 Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen

Wie schon im fünften und sechsten Stammzellbericht dargestellt, werden Patienten-abgeleitete iPS-Zellen vielfach für die Erforschung insbesondere genetisch bedingter Erkrankungen und der zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen verwendet. Humane iPS-Zellen teilen zwei für die Verwendung in Krankheitsmodellen wichtige Eigenschaften mit hES-Zellen. Das sind zum einen das unbegrenzte Vermehrungspotential und zum anderen die Fähigkeit, sich zu allen Zelltypen des menschlichen Körpers entwickeln zu können. Das unbegrenzte Vermehrungspotential erlaubt es, die für Testsysteme benötigten großen Zellmengen zu produzieren. Es ermöglicht zudem die Gewinnung großer Zellmengen aus einzelnen Zellen, deren Genom zuvor gezielt verändert wurde (Merkert and Martin, 2016). Die Herstellung gezielt genetisch modifizierter Zellklone ist aus zwei Gründen sehr bedeutsam: Es können sogenannte Reportergene an bestimmte Stellen im Genom platziert werden, die aktiviert werden wenn die Differenzierung zu einem gewünschten Zelltyp erfolgreich war. Wenn mit diesen Reportergenen noch eine Selektionsmöglichkeit verknüpft ist, wird eine Anreicherung von aus den Stammzellen differenzierten krankheitsrelevanten Zelltypen ermöglicht. Dies ist häufig auch von unschätzbarem Wert für die Durchführung automatisierter Tests, insbesondere in Hochdurchsatzverfahren. Genauso wichtig ist die Möglichkeit, krankheitsverursachende Mutationen in ES-Zellen oder iPS-Zellen von gesunden Spendern einzufügen. Damit können deren Auswirkungen auf die Zellstruktur und -funktion untersucht oder Mutationen in patientenspezifischen iPS-Zellen korrigiert und damit geeignete und notwendige Kontrollzelllinien für die Untersuchung genetischer Erkrankungen erzeugt werden.

Bis Ende 2015 wurden für eine Vielzahl von genetischen Erkrankungen patientenspezifische iPS-Zellen hergestellt und in vielen Fällen auch genetisch korrigiert. Darunter sind Erkrankungen, die die unterschiedlichsten Organe betreffen, z. B. neurodegenerative Erkrankungen einschließlich Augenerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Bluterkrankungen, Leber-basierte Stoffwechselerkrankungen, Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, Lungenerkrankungen oder auch Erkrankungen des muskuloskeletalen Systems. Eine gute Übersicht bietet hierzu z. B. der Übersichtsartikel von Sternecker et al. (Sternecker et al., 2014). In einer ganzen Reihe von Fällen konnten Stammzell-basierte Krankheitsmodelle neue Informationen zur Pathologie bzw. zum molekularen Mechanismus insbesondere genetischer Erkrankungen liefern. So wurden z. B. die Pathogenesemechanismen aufgeklärt, die einer Kardiomyopathie als Folge des mitochondrialen Barth-Syndroms (Wang et al., 2014a) oder einer genetisch bedingten Kalzifizierung der Aortenklappe (Theodoris et al., 2015) zugrunde liegen. Schon mit den bisherigen unter Verwendung pluripotenter Stammzellen gewonnenen Erkenntnissen zeichnet sich ein unschätzbare klinischer Nutzen dieser Zellen für das Verständnis monogenetischer, aber auch polygenetischer bzw. multifaktorieller Erkrankungen einschließlich Krebserkrankungen sowie für die Entwicklung neuer Therapien ab (Sternecker et al., 2014). Auch für die Entwicklung von Infektionsmodellen können pluripotente Stammzellen von großem Nutzen sein (Roelandt et al., 2012).

Viele der bisher publizierten Krankheitsmodelle beruhen auf zweidimensionalen Zellkulturen. Allerdings sind dreidimensionale Zellkultursysteme, einschließlich mittels Tissue Engineering hergestellter Gewebe (Hirt et al., 2014; Zweigerdt et al., 2014) und sogenannte Organoide (Lancaster and Knoblich, 2014), von weiter zunehmender Bedeutung für iPS-Zell-basierte Krankheitsmodelle (siehe 2.5.1). Auch wenn solche bioartifiziellen Gewebe und Organoide sicher nicht die Komplexität ganzer Organe nachbilden, eröffnen Organoidkulturen mit ihrer z. T. schon recht komplexen dreidimensionalen Struktur sicherlich die Möglichkeit, nicht nur molekulare, sondern auch funktionelle und physiologische Aspekte verschiedener Erkrankungen besser zu verstehen. Bislang wurde die Mehrheit der publizierten Stammzell-basierten Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen entwickelt. Allerdings werden im Ausland auch weiterhin hES-Zell-basierte Krankheitsmodelle entwickelt und verwendet, z. B. zur Untersuchung der Huntingtonschen Erkrankung (Nielis et al., 2013). Die verwendeten Zelllinien wurden in der Regel nach *In-vitro*-Fertilisation und Präimplantationsdiagnostik gewonnen. Da das deutsche StZG die Einfuhr solcher Stammzelllinien verbietet, sind derartige Arbeiten in Deutschland nicht durchführbar.

Alternativ hat sich auch die Möglichkeit eröffnet, bestimmte adulte Stamm- und Vorläuferzellen für Krankheitsmodelle und für die Herstellung von Organoiden zu verwenden. In Frage kommen hier vor allem adulte Stammzelltypen, die sich zum einen mit schwach invasiven Methoden isolieren und sich zum anderen in ausreichendem Umfang vermehren lassen. Das beste Beispiel sind hier die aus Darmbiopsien isolierbaren Stammzellen (Sato and Clevers, 2013). Diese lassen sich, fast wie von pluripotenten Stammzellen bekannt, in großem Umfang expandieren und bilden unter geeigneten Bedingungen Darm-ähnliche Organoide (Rookmaaker et al., 2015). Auch wenn ihr Expansionspotential begrenzt ist, wurden in ähnlicher Weise neurale Stammzellen zur Generierung von Neuro-Organoiden beschrieben (Sternecker et al., 2014). Weniger geeignet für die Herstellung von Organoiden - bzw. organotypische Testsysteme - sind dagegen adulte Stammzellen, die typischerweise multi-

oligo- oder unipotent sind. Anders als im Fall von ES- und iPS-Zellen kann hier in der Regel nur eine sehr begrenzte Zahl von Zelltypen hergestellt werden, was die Entwicklung von organotypischen Testsystemen (unter Nutzung solcher Zellen) stark einschränkt.

Ein gutes Beispiel für die Limitationen solcher auf adulten Stammzellen basierender Testsysteme ist die Mukoviszidose, eine genetisch bedingte Lungenerkrankung, die zwar ihre schwerste Ausprägung in der Lunge hat, aber durchaus auch schwere Funktionsstörungen in anderen Organen wie Darm, Leber oder Bauchspeicheldrüse verursacht. Testsysteme, die auf Darmstammzellen basieren, sind hervorragend geeignet, um Wirkstoffe zu identifizieren bzw. zu testen, die die Krankheitsausprägung im Darm abmildern können. Ob so identifizierte Wirkstoffe allerdings ähnliche Wirkungen in den anderen betroffenen Organen zeigen, ist offen. Aus pluripotenten Stammzellen können im Gegensatz dazu Zellen des Darmes genauso wie Zellen von Lunge, Leber und Pankreas hergestellt und für organotypische Testsysteme eingesetzt werden. Ein weiterer Nachteil adulter Stammzellen ist, dass es auch beim derzeitigen Stand der Technik der „Genom-Editierung“ in der Regel nicht möglich ist, weil es kaum gelingt Einzelzellklone zu expandieren, in denen gezielt spezifische Mutationen eingefügt bzw. korrigiert worden sind.

Auf ES- und iPS-Zellen basierende Testsysteme besitzen nicht zuletzt das Potential, tierexperimentelle Studien zu erheblichen Teilen zu ersetzen bzw. deren Anzahl zu reduzieren. Jedoch werden auf humanen Stammzellen basierende Testsysteme ebenso wie Tiermodelle nicht in der Lage sein, alle Merkmale und Funktionen des menschlichen Körpers abzubilden. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Verwendung von humanen Zellen und Organoiden vielfach zu qualitativ höherwertigen Testergebnissen führen wird als die Verwendung tierischer Zellen oder die Durchführung von Tierversuchen (O'Connor, 2013).

### 2.5.3 Pharmakologische / Toxikologische Substanztestung & Wirkstoffscreening

Unverändert stellt die Entwicklung stammzellbasierter *In-vitro*-Testmethoden für die Toxikologie und Arzneimittelentwicklung weltweit einen wichtigen Schwerpunkt der Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen dar. Es wird davon ausgegangen, dass auf humanen Stammzellen basierende Testsysteme mittelfristig zu einer Reduzierung von tierexperimentellen Studien führen können, insbesondere da eine im Vergleich mit Tierexperimenten höhere Datenqualität und bessere Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus erwartet wird. Dies gilt auch für derzeit verfügbare *In-vitro*-Systeme, die in der Regel auf tierischen Zellen, auf Tumorzelllinien oder immortalisierten (fötalen) Zellen beruhen. Vorteile von iPS-Zellen für das Wirkstoffscreening und die Toxikologie wurden bereits eingehend im sechsten Stammzellbericht erläutert.

Bei der Entwicklung von auf hES- und hiPS-Zellen basierenden *In-vitro*-Testsystemen sind derzeit große Fortschritte zu konstatieren. Dies beinhaltet sowohl Messungen an Einzelzellen, die Verwendung von Organoiden (Lancaster and Knoblich, 2014) als auch die Entwicklung von „Organ-on-a-Chip“-Modellen (Bhatia and Ingber, 2014). Derzeit befindet sich die Entwicklung von auf ES- und iPS-Zellen basierenden *In-vitro*-Testsystemen in einer Phase, in der nachgewiesen werden muss, dass sowohl die Qualität der humanen Stammzellen als auch die Funktionalität der zu analysierenden differenzierten Zellerivate gut reproduzierbare Messergebnisse bei kalkulierbaren und nicht zu hohen Kosten erlaubt. Ein entscheidendes Problem ist dabei derzeit noch, dass einmal etablierte Differenzierungsprotokolle aufwendig an individuelle pluripotente Stammzelllinien angepasst werden müssen.

Die Pharmaindustrie investiert derzeit in eigene Forschergruppen, die sich mit der Verwendung insbesondere patientenspezifischer iPS-Zellen für das Wirkstoffscreening beschäftigen, auch im Rahmen der Innovative Medicine Initiative (IMI, <https://www.imi.europa.eu/-Initiative>; insbesondere innerhalb des „STEMBANCC“-Konsortiums<sup>1</sup> (<http://stembancc.org>) oder der *European Bank for induced pluripotent stem cells* (EBiSC, <http://www.ebisc.org>). Auch wenn dabei von akademischen Partnern vielfach ES-Zellen für die Entwicklungsarbeit genutzt werden, sind für den industriellen Bereich diesbezüglich wenige öffentlich zugängliche Informationen vorhanden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklungen der kommenden Jahre darüber entscheiden werden, ob die pluripotente Stammzelltechnologie auf breiter Ebene Einzug in die industrielle Wirkstoffforschung, die pharmakologische Sicherheitsforschung und die Toxikologie halten wird. Entscheidend dafür wird die Entwicklung gut reproduzierbarer Differenzierungsprotokolle sein. Diese sollten möglichst auf chemisch definierten Substanzen zur Steuerung der Differenzierung basieren, die es ermöglichen müssen, mit begrenztem Aufwand bestimmte Zelltypen gleichbleibender Qualität aus unterschiedlichen ES bzw. iPS-Zelllinien zu generieren.

<sup>1</sup> Siehe auch [http://www.laborwelt.de/fileadmin/dateien\\_transkript/PDF/2013\\_07\\_tk-Spez\\_LB\\_Zellbasiertes-Screening\\_01.pdf](http://www.laborwelt.de/fileadmin/dateien_transkript/PDF/2013_07_tk-Spez_LB_Zellbasiertes-Screening_01.pdf)

## 2.5.4 Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Der Schwerpunkt der angewandten Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen liegt unverändert im Bereich der Krankheitsmodelle und der Wirkstoffforschung. Daneben wird allerdings weiterhin auf breiter Ebene die Entwicklung von Zelltherapiekonzepten vorangetrieben, teils noch experimentell in Kleintieren, in einigen Fällen jedoch auch schon in präklinischen Großtiermodellen (Chong and Murry, 2014)), in anderen Fällen werden klinische Studien vorbereitet, z. B. unter Herstellung von „Clinical Grade“ ES-Zell- & iPS-Zell-Produkten (ClinicalTrials.gov, NCT00353197, NCT02056613) bzw. schon durchgeführt.

Im Berichtszeitraum wurden auf internationaler Ebene acht weitere klinische Studien begonnen, die unter Nutzung von aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen erfolgen und die auf die Entwicklung von Therapien von altersbedingter Makula-Degeneration, ischämischen Herzerkrankungen, Diabetes mellitus und Morbus Parkinson gerichtet sind. Bereits im letzten Berichtszeitraum war eine klinische Studie abgeschlossen worden, so dass am Ende des siebten Berichtszeitraumes weltweit insgesamt 16 klinische Studien im Gange waren, von denen zwei die Langzeitbeobachtung von transplantierten Patienten zum Inhalt haben. Die erste durchgeführte klinische Studie, bei der in Japan aus hiPS-Zellen abgeleitete Zellen in Patienten übertragen wurden, wurde im Berichtszeitraum wegen möglicher Risiken für die Patienten ausgesetzt. Eine zweite Studie, die iPS-Zellderivate zur Behandlung der Altersbedingten Makula-Degeneration einsetzen will, wurde von einem britischen Team zwar im internationalen NIH-Studienregister angemeldet, hat aber im Berichtszeitraum noch keine Patienten eingeschlossen.

Ungeachtet dessen lässt sich feststellen, dass klinische Studien unter Nutzung von aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen außerhalb Deutschlands bereits in zunehmendem und nicht mehr unerheblichem Umfang durchgeführt werden. Auch für Deutschland ist die Durchführung klinischer Studien auf der Basis von hES-Zellen angesichts dieser Entwicklung keine nur hypothetische Option mehr.

Im Fokus steht unverändert vor allem die Verwendung von ES-Zell-abgeleitetem pigmentiertem Epithel für die Zelltherapie der Makula-Degeneration, einer Gruppe von Augenerkrankungen, die zur Erblindung führen (siehe auch den sechsten Stammzellbericht). Alle bisherigen Studien dienen primär der Risikoabschätzung. Bisher sind weder bei ES-Zell- noch bei iPS-Zell-abgeleiteten Transplantaten aus dem Zelltransplantat abgeleitete Tumore bekannt geworden. Folgende klinische Zelltherapie-Studien, die auf ES-Zellen bzw. iPS-Zellen basieren, sind von den verantwortlichen Behörden genehmigt worden und sind abgeschlossen, aktiv oder rekrutieren zurzeit Patienten (Quelle: ClinicalTrials.gov bzw. Webseite des RIKEN Instituts):

Studie	Kennnummer	Status	Land
<b>ES-Zellen</b>			
<b>Herzerkrankungen</b>			
Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure (ESCORT)	NCT02057900	Phase I study; first patients treated (Menasche et al., 2015), recruiting further patients	Frankreich
<b>Stoffwechselerkrankungen (Diabetes)</b>			
A Prospective, Multicenter, Open-Label, First-in-Human Phase 1/2 Study With Two Cohorts to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of Various Doses of VC-01™ Combination Product in Subjects With Type 1 Diabetes Mellitus	NCT02239354	Phase I / II study; recruiting	USA/Kanada
<b>Augenerkrankungen</b>			
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	Phase I study; completed, (Schwartz et al., 2015)	USA/UK

Studie	Kennnummer	Status	Land
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 Retinal Pigmented Epithelial (MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age-related Macular Degeneration(AMD)	NCT01674829	Phase I study; recruiting (exact status unknown)	Korea
Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy	NCT01345006	Phase I study; study completed (Schwartz et al., 2015)	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	Phase I study; study completed (Schwartz et al., 2015)	USA
Safety and Tolerability of MA09-hRPE Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy(SMD)	NCT01625559	Phase I study; active, not recruiting (exact status unknown)	Korea
A Study Of Implantation Of Retinal Pigment Epithelium In Subjects With Acute Wet Age Related Macular Degeneration	NCT01691261	Phase I study; active but not recruiting	UK
Study of Subretinal Implantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived RPE Cells in Advanced Dry AMD	NCT02590692	Phase I study; recruiting	USA
Subretinal Transplantation of Retinal Pigment Epitheliums in Treatment of Age-related Macular Degeneration Diseases	NCT02755428	Phase I study; recruiting	China
Long Term Follow Up of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE Cells in Stargardt Macular Dystrophy Patients	NCT02445612	Phase I study as Follow up study to NCT01345006	USA
Long Term Follow Up of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE Cells in Patients With AMD	NCT02463344	Phase I study as Follow up study to NCT01344993	USA
Safety and Efficacy Study of OpRegen for Treatment of Advanced Dry-Form Age-Related Macular Degeneration	NCT02286089	Phase I study; recruiting	USA
<b>iPS-Zellen</b>			
<b>Augenerkrankungen</b>			
Pilot safety study of iPSC-based intervention for wet-type AMD (source: <a href="http://www.riken-ibri.jp/AMD/english/">http://www.riken-ibri.jp/AMD/english/</a> )		Phase I study; one patient done, recruitment terminated in 2015	Japan
Production of iPSC Derived RPE Cells for Transplantation in AMD	NCT02464956	Study is not yet open for recruitment.	UK

Studie	Kennnummer	Status	Land
<b>parthenogenetisch hergestellte Zellen</b>			
<b>Neurologische Erkrankungen</b>			
A Single Arm, Open-Label Phase I Study to Evaluate the Safety and Tolerability of ISC-hpNSC Injected Into the Striatum and Substantia Nigra of Patients With Parkinson's Disease	NCT02452723	Phase I study; recruitment starting 03/2016	Australien

### 3 Schlussfolgerungen

In der aktuellen Berichtsperiode hat sich der potentielle Nutzen humaner embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen (hES- und hiPS-Zellen) für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Wirkstoffe weiter konkretisiert. So hat sich die Stammzellforschung in Deutschland weiter etabliert und zeigt eine zunehmende Vernetzung der verschiedenen partizipierenden Disziplinen. Es lässt sich zwischenzeitlich ein intensiviertes Zusammenwachsen verschiedener Forschungsprojekte zu übergeordneten Forschungsfeldern beobachten. Beispielhaft hierfür sind neue Technologien zur dreidimensionalen Kultivierung von Zellaggregaten, die eine hohe Relevanz für die Untersuchung von Tumorstammzellen, für Stamm- und Vorläuferzellen adulter Gewebe und für die Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen haben. Im internationalen Vergleich hat sich die wissenschaftliche Sichtbarkeit der Stammzellforschung in Deutschland gegenwärtig gut entwickelt, wobei durch starke Förderprogramme beispielsweise in Japan, den USA, Großbritannien und Schweden großer wissenschaftlicher Wettbewerb besteht.

Die Forschung mit pluripotenten Stammzellen erfährt neben der Grundlagenforschung zunehmende Bedeutung für die angewandte Forschung zu Krankheitsmechanismen und zur Testung bzw. Entwicklung neuer Wirkstoffe. Nach wie vor sind humane ES-Zellen auch bei solchen Fragestellungen häufig integraler Bestandteil der Experimente, weil sie als langjährig etablierte, gut vergleichbare und robuste Ergebnisse liefernde Zellressource große Bedeutung haben. Nach wie vor lässt sich eine recht heterogene Datenlage zur Vergleichbarkeit verschiedener pluripotenter Stammzellen feststellen, wobei es sich zwischenzeitlich so darstellt, dass die Hauptvarianz durch die unterschiedlichen genetischen Hintergründe sowie möglicherweise auch epigenetischen Unterschiede der verschiedenen hES- bzw. hiPS-Zellen begründet ist. Das etwas höhere Ausmaß an genetischen und epigenetischen Anomalien in hiPS-Zellen ist darüber hinaus durch sogenannte Mosaik in den Ausgangszellen erklärbar, wobei der Anteil epigenetischer Unterschiede, der durch unvollständige oder variierende Reprogrammierungsvorgänge verursacht wird, noch nicht abschließend zu erfassen ist.

Weiterhin lässt sich eine sehr dynamische Entwicklung auf dem Feld der Genom-Editierung in pluripotenten Stammzellen beobachten. Die relativ einfache Etablierung neuer Verfahren wie das CRISPR/Cas9-System ermöglicht es nun vielen Laboren, zielgenaue DNA-Modifikationen in hiPS- und hES-Zellen einzubringen. Insbesondere für Untersuchungen hiPS-abgeleiteter Zellmodelle für genetische Erkrankungen ermöglicht dieses Verfahren deutlich verbesserte Ergebnisse.

Nicht nur aufgrund dieser Entwicklung, sondern auch aufgrund neuer dreidimensionaler Kultursysteme zur Generierung Organ-ähnlicher Aggregate, die die Funktionalität des gewünschten Zelltyps deutlich authentischer abbilden, lässt sich eine steigende Verwendung von hES- und hiPS-Zellen beim Wirkstoffscreening erkennen. Dabei haben Arbeiten zur Anpassung der jeweiligen Differenzierungsprotokolle an größere Kulturvolumina einen zunehmend höheren Stellenwert, denn nur so ist es möglich, die notwendigen Zellzahlen für große Versuchsansätze zu erzeugen. Aber auch bei der präklinischen Evaluierung potentieller hES- oder hiPS-basierter Transplantate werden zukünftig Verfahren zur Erzeugung größerer Zellmengen unabdingbar werden.

Es kann festgestellt werden, dass es wichtige Fortschritte zum Verständnis von Ursache und Ausmaß genetischer und epigenetischer Veränderungen und zur sichereren Generierung und Propagierung von humanen iPS-Zellen gegeben hat. Hochinteressant erscheinen außerdem die Entwicklungen zur Optimierung von Differenzierungsprotokollen von hES- und hiPS-Zellen und zu Organoid-Kultursystemen sowie die Zusammenfassung von Reprogrammierung und Differenzierung im Sinne der Transprogrammierung somatischer Zellen, welche neue Forschungs- und Therapieoptionen in der Regenerativen Medizin eröffnen.



Bei den im Berichtszeitraum initiierten bzw. fortgeführten klinischen Studien im Ausland finden weiterhin fast ausschließlich von hES-Zellen abgeleitete Transplantate Verwendung. Nur in lediglich zwei Studien finden hiPS-Zellderivate Anwendung. Dabei ist die Rekrutierung der bereits begonnenen Studie in Japan im Berichtszeitraum unterbrochen worden, um das Studienprotokoll so zu überarbeiten, dass nicht mehr Patient-abgeleitete hiPS-Zellen, sondern statt dessen gut charakterisierte hiPS-Zellen aus einer Zellbank Verwendung finden sollen. Klinische Studien auf der Basis von hES-Zellen sind aufgrund der internationalen Entwicklung auch in Deutschland nicht mehr nur eine hypothetische Option.

In Deutschland wurde durch das Stammzellgesetz die Forschung mit hES-Zellen ermöglicht, ohne den durch das Embryonenschutzgesetz gewährleisteten Schutz menschlicher Embryonen einzuschränken. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Forschung mit hiPS-Zellen und hES-Zellen in Deutschland weiterhin mit sehr hoher Qualität erfolgt. Die bis Ende 2015 insgesamt erteilten 105 Genehmigungen für die Einfuhr und/oder Verwendung von hES-Zellen, von denen 17 im Berichtszeitraum für neue Forschungsvorhaben genehmigt worden sind, belegen, dass die durch das Stammzellgesetz eröffneten Möglichkeiten nach wie vor wahrgenommen werden, dass hES-Zellen weiterhin Grundlage innovativer Forschungsvorhaben sind und dass ein unvermindertes Interesse an Forschung unter Verwendung von hES-Zellen besteht.

#### 4 Zitierte Literatur

- Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., and Gray, J.W. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34, 369-376.
- Almeida-Porada, G., Porada, C.D., Chamberlain, J., Torabi, A., and Zanjani, E.D. (2004). Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 104, 2582-2590.
- Araten, D.J., Golde, D.W., Zhang, R.H., Thaler, H.T., Gargiulo, L., Notaro, R., and Luzzatto, L. (2005). A quantitative measurement of the human somatic mutation rate. *Cancer research* 65, 8111-8117.
- Arokium, H., Kamata, M., Kim, S., Kim, N., Liang, M., Presson, A.P., and Chen, I.S. (2014). Deep sequencing reveals low incidence of endogenous LINE-1 retrotransposition in human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 9, e108682.
- Bao, X., Lian, X., Dunn, K.K., Shi, M., Han, T., Qian, T., Bhute, V.J., Canfield, S.G., and Palecek, S.P. (2015). Chemically-defined albumin-free differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitor cells. *Stem Cell Res* 15, 122-129.
- Barrilleaux, B., and Knoepfler, P.S. (2011). Inducing iPSCs to escape the dish. *Cell Stem Cell* 9, 103-111.
- Batty, J.A., Lima, J.A., Jr., and Kunadian, V. (2016). Direct cellular reprogramming for cardiac repair and regeneration. *Eur J Heart Fail* 18, 145-156.
- Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11, 268-277.
- Bhatia, S.N., and Ingber, D.E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 32, 760-772.
- Bhutani, K., Nazor, K.L., Williams, R., Tran, H., Dai, H., Dzakula, Z., Cho, E.H., Pang, A.W., Rao, M., Cao, H., *et al.* (2016). Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods. *Nature communications* 7, 10536.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., *et al.* (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of human biology* 40, 463-471.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., and Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nature reviews Genetics* 14, 427-439.
- Burrell, R.A., McClelland, S.E., Endesfelder, D., Groth, P., Weller, M.C., Shaikh, N., Domingo, E., Kanu, N., Dewhurst, S.M., Gronroos, E., *et al.* (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 494, 492-496.
- Chatterjee, A., Mambo, E., and Sidransky, D. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* 25, 4663-4674.
- Chen, Y., Niu, Y., Li, Y., Ai, Z., Kang, Y., Shi, H., Xiang, Z., Yang, Z., Tan, T., Si, W., *et al.* (2015). Generation of Cynomolgus Monkey Chimeric Fetuses using Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 116-124.
- Cherry, A.B., Gagne, K.E., McLoughlin, E.M., Baccei, A., Gorman, B., Hartung, O., Miller, J.D., Zhang, J., Zon, R.L., Ince, T.A., *et al.* (2013). Induced pluripotent stem cells with a mitochondrial DNA deletion. *Stem cells* 31, 1287-1297.
- Chinnery, P.F. (1993). Mitochondrial Disorders Overview. In *GeneReviews(R)*, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J.H. Bean, T.D. Bird, C.T. Fong, H.C. Mefford, R.J.H. Smith, *et al.*, eds. (Seattle (WA)).
- Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliacuzzi, G.M., Lim, H., Choi, I.Y., Ferrari, F., Tsankov, A.M., Pop, R., *et al.* (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotechnol* 33, 1173-1181.
- Chong, J.J., and Murry, C.E. (2014). Cardiac regeneration using pluripotent stem cells--progression to large animal models. *Stem Cell Res* 13, 654-665.
- Clevers, H. (2015). STEM CELLS. What is an adult stem cell? *Science* 350, 1319-1320.
- De Los Angeles, A., Ferrari, F., Fujiwara, Y., Mathieu, R., Lee, S., Lee, S., Tu, H.C., Ross, S., Chou, S., Nguyen, M., *et al.* (2015). Failure to replicate the STAP cell phenomenon. *Nature* 525, E6-9.

- Desmarais, J.A., Hoffmann, M.J., Bingham, G., Gagou, M.E., Meuth, M., and Andrews, P.W. (2012). Human embryonic stem cells fail to activate CHK1 and commit to apoptosis in response to DNA replication stress. *Stem cells* 30, 1385-1393.
- Desmarais, J.A., Unger, C., Damjanov, I., Meuth, M., and Andrews, P. (2016). Apoptosis and failure of checkpoint kinase 1 activation in human induced pluripotent stem cells under replication stress. *Stem cell research & therapy* 7, 17.
- Dianat, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Steichen, C., Desterke, C., Leclerc, P., Raveux, A., Combettes, L., Weber, A., Corlu, A., and Dubart-Kupperschmitt, A. (2014). Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology* 60, 700-714.
- 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.
- Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 53-54.
- Dumevska, B., Chami, O., McKernan, R., Goel, D., Peura, T., and Schmidt, U. (2016). Derivation of Genea016 human embryonic stem cell line. *Stem Cell Res* 16, 24-28.
- Feng, Q., Shabrani, N., Thon, J.N., Huo, H., Thiel, A., Machlus, K.R., Kim, K., Brooks, J., Li, F., Luo, C., *et al.* (2014). Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 817-831.
- Forster, R., Chiba, K., Schaeffer, L., Regalado, S.G., Lai, C.S., Gao, Q., Kiani, S., Farin, H.F., Clevers, H., Cost, G.J., *et al.* (2014). Human intestinal tissue with adult stem cell properties derived from pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2, 838-852.
- Frank, S.A. (2010). Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Somatic evolutionary genomics: mutations during development cause highly variable genetic mosaicism with risk of cancer and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 Suppl 1, 1725-1730.
- 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.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., *et al.* (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451.
- 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.
- Gori, J.L., Butler, J.M., Chan, Y.Y., Chandrasekaran, D., Poulos, M.G., Ginsberg, M., Nolan, D.J., Elemento, O., Wood, B.L., Adair, J.E., *et al.* (2015). Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 125, 1243-1254.
- Graf, T. (2011). Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* 9, 504-516.
- Hendriks, W.T., Warren, C.R., and Cowan, C.A. (2016). Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell* 18, 53-65.
- Hirt, M.N., Hansen, A., and Eschenhagen, T. (2014). Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circulation research* 114, 354-367.
- Holtzinger, A., Streeter, P.R., Sarangi, F., Hillborn, S., Niapour, M., Ogawa, S., and Keller, G. (2015). New markers for tracking endoderm induction and hepatocyte differentiation from human pluripotent stem cells. *Development* 142, 4253-4265.
- Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Versteegen, M.M., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S.A., de Ligt, J., *et al.* (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160, 299-312.
- 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. *Nat Biotechnol* 29, 1132-1144.
- Irie, N., Weinberger, L., Tang, W.W., Kobayashi, T., Viukov, S., Manor, Y.S., Dietmann, S., Hanna, J.H., and Surani, M.A. (2015). SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell* 160, 253-268.
- Jacobs, K., Mertzaniidou, A., Geens, M., Thi Nguyen, H., Staessen, C., and Spits, C. (2014). Low-grade chromosomal mosaicism in human somatic and embryonic stem cell populations. *Nature communications* 5, 4227.
- Johannesson, B., Sagi, I., Gore, A., Paull, D., Yamada, M., Golan-Lev, T., Li, Z., LeDuc, C., Shen, Y., Stern, S., *et al.* (2014). Comparable frequencies of coding mutations and loss of imprinting in human pluripotent cells derived by nuclear transfer and defined factors. *Cell Stem Cell* 15, 634-642.
- Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R., Hill, R., Bradt, C., Mueller, S.N., Levine, E.M., and Nichols, W.W. (1992). Karyotypic and phenotypic changes during in vitro aging of human endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 150, 17-27.
- Karus, M., Blaess, S., and Brustle, O. (2014). Self-organization of neural tissue architectures from pluripotent stem cells. *J Comp Neurol* 522, 2831-2844.
- Kempf, H., Kropp, C., Olmer, R., Martin, U., and Zweigerdt, R. (2015). Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Nat Protoc*, *in press*.
- Kim, H., and Kim, J.S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature reviews Genetics* 15, 321-334.
- Kim, J., Kim, K.P., Lim, K.T., Lee, S.C., Yoon, J., Song, G., Hwang, S.I., Scholer, H.R., Cantz, T., and Han, D.W. (2015). Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Scientific reports* 5, 15706.
- Klawitter, S., Fuchs, N.V., Upton, K.R., Munoz-Lopez, M., Shukla, R., Wang, J., Garcia-Canadas, M., Lopez-Ruiz, C., Gerhardt, D.J., Sebe, A., *et al.* (2016). Reprogramming triggers endogenous L1 and Alu retrotransposition in human induced pluripotent stem cells. *Nature communications* 7, 10286.
- Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.S., Usui, J., Knisely, A.S., *et al.* (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142, 787-799.
- Kobold, S., Guhr, A., Kurtz, A., and Loser, P. (2015). Human embryonic and induced pluripotent stem cell research trends: complementation and diversification of the field. *Stem Cell Reports* 4, 914-925.
- Konno, D., Kasukawa, T., Hashimoto, K., Itoh, T., Suetsugu, T., Miura, I., Wakana, S., Carninci, P., and Matsuzaki, F. (2015). STAP cells are derived from ES cells. *Nature* 525, E4-5.
- Lachmann, N., Ackermann, M., Frenzel, E., Liebhaber, S., Brenning, S., Happle, C., Hoffmann, D., Klimenkova, O., Luttge, D., Buchegger, T., *et al.* (2015). Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem Cell Reports* 4, 282-296.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345, 1247125.
- 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., Okamura, D., Durcova-Hills, G., Stewart, C.L., Gardner, R.L., Matsui, Y., and Papaioannou, V.E. (2014). On the fate of primordial germ cells injected into early mouse embryos. *Dev Biol* 385, 155-159.

- 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. *Nat Protoc* 8, 162-175.
- Liu, P., Kaplan, A., Yuan, B., Hanna, J.H., Lupski, J.R., and Reiner, O. (2014). Passage number is a major contributor to genomic structural variations in mouse iPSCs. *Stem cells* 32, 2657-2667.
- Lund, R.J., Narva, E., and Lahesmaa, R. (2012). Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 13, 732-744.
- Ma, H., Morey, R., O'Neil, R.C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M.D., Hariharan, M., Nery, J.R., Castanon, R., Sabatini, K., *et al.* (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 511, 177-183.
- 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* 339, 823-826.
- Mallon, B.S., Hamilton, R.S., Kozhich, O.A., Johnson, K.R., Fann, Y.C., Rao, M.S., and Robey, P.G. (2014). Comparison of the molecular profiles of human embryonic and induced pluripotent stem cells of isogenic origin. *Stem Cell Res* 12, 376-386.
- Menasche, P., Vanneau, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., *et al.* (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *European heart journal* 36, 2011-2017.
- Menon, T., Firth, A.L., Scripture-Adams, D.D., Galic, Z., Qualls, S.J., Gilmore, W.B., Ke, E., Singer, O., Anderson, L.S., Bornzin, A.R., *et al.* (2015). Lymphoid regeneration from gene-corrected SCID-X1 subject-derived iPSCs. *Cell Stem Cell* 16, 367-372.
- Merkert, S., and Martin, U. (2016). Targeted genome engineering using designer nucleases: State of the art and practical guidance for application in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 16, 377-386.
- Merkert, S., Wunderlich, S., Bednarski, C., Beier, J., Haase, A., Dreyer, A.K., Schwanke, K., Meyer, J., Gohring, G., Cathomen, T., *et al.* (2014). Efficient designer nuclease-based homologous recombination enables direct PCR screening for footprintless targeted human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2, 107-118.
- Merkle, F.T., Maroof, A., Wataya, T., Sasai, Y., Studer, L., Eggan, K., and Schier, A.F. (2015). Generation of neuropeptidergic hypothalamic neurons from human pluripotent stem cells. *Development* 142, 633-643.
- Mitalipova, M.M., Rao, R.R., Hoyer, D.M., Johnson, J.A., Meisner, L.F., Jones, K.L., Dalton, S., and Stice, S.L. (2005). Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 19-20.
- Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M., Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., *et al.* (2013). Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. *PLoS One* 8, e61900.
- Nature-Editors (2014). Retraction: Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 512, 338.
- Nichols, W.W., Buynak, E.B., Bradt, C., Hill, R., Aronson, M., Jarrell, B.E., Mueller, S.N., and Levine, E.M. (1987). Cytogenetic evaluation of human endothelial cell cultures. *Journal of cellular physiology* 132, 453-462.
- Niclis, J.C., Pinar, A., Haynes, J.M., Alsanie, W., Jenny, R., Dottori, M., and Cram, D.S. (2013). Characterization of forebrain neurons derived from late-onset Huntington's disease human embryonic stem cell lines. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 37.
- O'Connor, M.D. (2013). The 3R principle: advancing clinical application of human pluripotent stem cells. *Stem cell research & therapy* 4, 21.
- Obokata, H., Wakayama, T., Sasai, Y., Kojima, K., Vacanti, M.P., Niwa, H., Yamato, M., and Vacanti, C.A. (2014). Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 505, 641-647.
- Oliveros-Etter, M., Li, Z., Nee, K., Hosohama, L., Hargan-Calvopina, J., Lee, S.A., Joti, P., Yu, J., and Clark, A.T. (2015). PGC Reversion to Pluripotency Involves Erasure of DNA Methylation from Imprinting Control Centers followed by Locus-Specific Re-methylation. *Stem Cell Reports* 5, 337-349.

- Ozeri-Galai, E., Bester, A.C., and Kerem, B. (2012). The complex basis underlying common fragile site instability in cancer. *Trends in genetics : TIG* 28, 295-302.
- Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gurtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D., and Melton, D.A. (2014). Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell* 159, 428-439.
- Pampalona, J., Frias, C., Genesca, A., and Tusell, L. (2012). Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. *PLoS genetics* 8, e1002679.
- Pampalona, J., Soler, D., Genesca, A., and Tusell, L. (2010). Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes, chromosomes & cancer* 49, 368-378.
- Pfaff, N., and Cantz, T. (2013). From Skin to Blood: A New Member Joins the iClub. *Cell Stem Cell* 13, 131-133.
- Polstein, L.R., Perez-Pinera, P., Kocak, D.D., Vockley, C.M., Bledsoe, P., Song, L., Safi, A., Crawford, G.E., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015). Genome-wide specificity of DNA binding, gene regulation, and chromatin remodeling by TALE- and CRISPR/Cas9-based transcriptional activators. *Genome research* 25, 1158-1169.
- Prigione, A., Lichtner, B., Kuhl, H., Struys, E.A., Wamelink, M., Lehrach, H., Ralser, M., Timmermann, B., and Adjaye, J. (2011). Human induced pluripotent stem cells harbor homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA mutations while maintaining human embryonic stem cell-like metabolic reprogramming. *Stem cells* 29, 1338-1348.
- Robberecht, C., Voet, T., Zamani Esteki, M., Nowakowska, B.A., and Vermeesch, J.R. (2013). Nonallelic homologous recombination between retrotransposable elements is a driver of de novo unbalanced translocations. *Genome research* 23, 411-418.
- Rodrigues, G.M., Matos, A.F., Fernandes, T.G., Rodrigues, C.A., Peitz, M., Haupt, S., Diogo, M.M., Brustle, O., and Cabral, J.M. (2014). Integrated platform for production and purification of human pluripotent stem cell-derived neural precursors. *Stem Cell Rev* 10, 151-161.
- Roelandt, P., Obeid, S., Paeshuyse, J., Vanhove, J., Van Lommel, A., Nahmias, Y., Nevens, F., Neyts, J., and Verfaillie, C.M. (2012). Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *Journal of hepatology* 57, 246-251.
- Ronen, D., and Benvenisty, N. (2012). Genomic stability in reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 22, 444-449.
- Rookmaaker, M.B., Schutgens, F., Verhaar, M.C., and Clevers, H. (2015). Development and application of human adult stem or progenitor cell organoids. *Nature reviews Nephrology* 11, 546-554.
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J.P., and Letellier, T. (2003). Mitochondrial threshold effects. *The Biochemical journal* 370, 751-762.
- Rouhani, F.J., Nik-Zainal, S., Wuster, A., Li, Y., Conte, N., Koike-Yusa, H., Kumasaka, N., Vallier, L., Yusa, K., and Bradley, A. (2016). Mutational History of a Human Cell Lineage from Somatic to Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS genetics* 12, e1005932.
- Sampaziotis, F., Cardoso de Brito, M., Madrigal, P., Bertero, A., Saeb-Parsy, K., Soares, F.A., Schrupf, E., Melum, E., Karlsen, T.H., Bradley, J.A., *et al.* (2015). Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nat Biotechnol* 33, 845-852.
- Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohta, H., Moritoki, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., *et al.* (2015). Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 178-194.
- Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340, 1190-1194.
- Schlaeger, T.M., Daheron, L., Brickler, T.R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., *et al.* (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol* 33, 58-63.
- Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.P., Davis, J.L., Heilwell, G., Sporn, M., *et al.* (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment

- epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* *385*, 509-516.
- Seltmann, S., Lekschas, F., Muller, R., Stachelscheid, H., Bittner, M.S., Zhang, W., Kidane, L., Seriola, A., Veiga, A., Stacey, G., *et al.* (2016). hPSCreg--the human pluripotent stem cell registry. *Nucleic Acids Res* *44*, D757-763.
- 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., Naumovska, E., and Sullivan, G.J. (2015). Small-molecule-driven hepatocyte differentiation of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* *4*, 939-952.
- Singbrant, S., van Galen, P., Lucas, D., Challen, G., Rossi, D.J., and Daley, G.Q. (2015). Two new routes to make blood: Hematopoietic specification from pluripotent cell lines versus reprogramming of somatic cells. *Exp Hematol* *43*, 756-759.
- Sternecker, J.L., Reinhardt, P., and Scholer, H.R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nature reviews Genetics* *15*, 625-639.
- Sugawa, F., Arauzo-Bravo, M.J., Yoon, J., Kim, K.P., Aramaki, S., Wu, G., Stehling, M., Psathaki, O.E., Hubner, K., and Scholer, H.R. (2015). Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile. *EMBO J* *34*, 1009-1024.
- Sugiura, M., Kasama, Y., Araki, R., Hoki, Y., Sunayama, M., Uda, M., Nakamura, M., Ando, S., and Abe, M. (2014). Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells. *Stem Cell Reports* *2*, 52-63.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-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.
- 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.
- Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficuz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., *et al.* (2014). Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* *158*, 1254-1269.
- Takebe, T., Enomura, M., Yoshizawa, E., Kimura, M., Koike, H., Ueno, Y., Matsuzaki, T., Yamazaki, T., Toyohara, T., Osafune, K., *et al.* (2015). Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell* *16*, 556-565.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., *et al.* (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* *499*, 481-484.
- Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara, M., Hirose, M., Ogura, A., and Shinohara, T. (2015). Pluripotent cell derivation from male germline cells by suppression of *Dmrt1* and *Trp53*. *J Reprod Dev* *61*, 473-484.
- Theodoris, C.V., Li, M., White, M.P., Liu, L., He, D., Pollard, K.S., Bruneau, B.G., and Srivastava, D. (2015). Human disease modeling reveals integrated transcriptional and epigenetic mechanisms of NOTCH1 haploinsufficiency. *Cell* *160*, 1072-1086.
- Theunissen, T.W., Powell, B.E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D.A., Reddy, J., Fan, Z.P., Maetzel, D., Ganz, K., Shi, L., *et al.* (2014). Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* *15*, 471-487.
- 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. *Nat Biotechnol* *31*, 20-23.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* *463*, 1035-1041.
- Wallace, D.C. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8739-8746.

- Wang, G., McCain, M.L., Yang, L., He, A., Pasqualini, F.S., Agarwal, A., Yuan, H., Jiang, D., Zhang, D., Zangi, L., *et al.* (2014a). Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nature medicine* 20, 616-623.
- Wang, J., Xie, G., Singh, M., Ghanbarian, A.T., Rasko, T., Szvetnik, A., Cai, H., Besser, D., Prigione, A., Fuchs, N.V., *et al.* (2014b). Primate-specific endogenous retrovirus-driven transcription defines naive-like stem cells. *Nature* 516, 405-409.
- Wang, L., Wang, L., Huang, W., Su, H., Xue, Y., Su, Z., Liao, B., Wang, H., Bao, X., Qin, D., *et al.* (2013). Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods* 10, 84-89.
- Wu, J., Okamura, D., Li, M., Suzuki, K., Luo, C., Ma, L., He, Y., Li, Z., Benner, C., Tamura, I., *et al.* (2015). An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* 521, 316-321.
- Yoshizato, K., and Tateno, C. (2013). A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection: where to next? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 9, 1419-1435.
- 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.
- Zeltner, N., Lafaille, F.G., Fattahi, F., and Studer, L. (2014). Feeder-free derivation of neural crest progenitor cells from human pluripotent stem cells. *J Vis Exp*.
- Zhou, Q., Wang, M., Yuan, Y., Wang, X., Fu, R., Wan, H., Xie, M., Liu, M., Guo, X., Zheng, Y., *et al.* (2016). Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. *Cell Stem Cell* 18, 330-340.
- Zweigerdt, R., Gruh, I., and Martin, U. (2014). Your Heart on a Chip: iPSC-Based Modeling of Barth-Syndrome-Associated Cardiomyopathy. *Cell Stem Cell* 15, 9-11.