

Fünfter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes (Berichtsjahre 2010 u. 2011)

Inhaltsverzeichnis

1. PRÜFUNG UND GENEHMIGUNG VON ANTRÄGEN AUF EINFUHR UND VERWENDUNG MENSCHLICHER EMBRYONALER STAMMZELLEN ZU FORSCHUNGSZWECKEN	3
1.1. Berichtsauftrag und Berichtszeitraum	3
1.2. Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren	3
1.3. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 4 StZG	15
1.4. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG	16
1.5. Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung	22
2. STAND DER FORSCHUNG MIT PLURIPOTENTEN MENSCHLICHEN STAMMZELLEN	24
2.1. Einleitung	24
2.2. Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien	25
2.3. Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen	25
2.3.1. Erkenntnisse aus dem Vergleich von humanen ES- und Maus-ES-Zellen.....	26
2.3.2. Unterschiede zwischen hES-Zelllinien.....	27
2.3.3. Bestimmende Merkmale pluripotenter Stammzellen.....	28
2.3.4. Vergleichbarkeit bzw. Unterschiede zwischen ES- und iPS-Zellen.....	28
2.3.5. Genetische Veränderungen in embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen.....	30
2.3.6. Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen	31
2.4. Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen	33
2.4.1. Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus Blastomer-Biopsien	33
2.4.2. Kerntransfer-Verfahren.....	34
2.4.3. Gewinnung von Stammzellen ausgehend von Keimzellen und deren Vorläuferzellen.....	34
2.4.4. Fötale Stammzellen	35
2.4.5. Fortschritte in der Reprogrammierung von Körperzellen	35
2.4.6. Transdifferenzierung.....	37

2.5. Entwicklung von Therapien und Testmethoden mit hES- und hiPS Zellen	38
2.5.1. Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen.....	38
2.5.2. Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen.....	41
2.5.3. Pharmakologische / Toxikologische Substanztestung & Wirkstoffscreening	41
2.5.4. Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen	42
3. SCHLUSSFOLGERUNGEN	44
4. GLOSSAR	46
Ausgewählte Internetadressen	48
5. ZITIERTE LITERATUR	49

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

1.1. Berichtsauftrag und Berichtszeitraum

Dieser Erfahrungsbericht erfolgt aufgrund von § 15 des Gesetzes zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG) vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), zuletzt geändert durch das Gesetz zur Änderung des StZG vom 14.08.2008 (BGBl. I S. 1708). Er umfasst den Zeitraum vom 1. Januar 2010 bis zum 31. Dezember 2011 (fünfter Berichtszeitraum).

1.2. Genehmigte Anträge und Genehmigungsverfahren

1.2.1 Überblick über die im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Im vorangegangenen Berichtszeitraum (1. Januar 2008 bis 31. Dezember 2009; vierter Berichtszeitraum) waren im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten **25** Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und/oder Verwendung humaner ES-Zellen genehmigt worden. Für **drei** weitere Anträge, die in diesem Zeitraum gestellt worden waren, war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2009 noch nicht abgeschlossen.

Im aktuellen Berichtszeitraum wurden im Zusammenhang mit inhaltlich eigenständigen Projekten **20** Anträge auf Genehmigung der Einfuhr und Verwendung bzw. Genehmigung der Verwendung humaner embryonaler Stammzellen gemäß § 6 StZG an das Robert Koch-Institut (RKI) als zuständige Genehmigungsbehörde gestellt. Ferner waren **drei** Anträge aus dem vierten Berichtszeitraum anhängig. **19** dieser insgesamt **23** Anträge wurden im Berichtszeitraum genehmigt, wobei für einen Antrag aufgrund der gemeinsamen Antragstellung durch zwei Wissenschaftler zwei getrennte identische Genehmigungen erteilt wurden. Insgesamt ergingen folglich **20** Genehmigungen nach dem Stammzellgesetz. Zu **einem** Antrag war das Genehmigungsverfahren am 31. Dezember 2011 noch nicht abgeschlossen; im Falle von **drei** Anträgen ist die Bearbeitung auf Wunsch der Antragsteller bis auf weiteres ausgesetzt worden.

Die im Berichtszeitraum erteilten 20 Genehmigungen für neue, eigenständige Vorhaben ergingen an **18** Personen bzw. Institutionen, von denen **zwei** bereits im Besitz wenigstens einer zuvor erteilten Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen waren; an einigen Institutionen ist weiterhin mehr als eine Forschergruppe mit hES-Zell-For-

sung befasst. Insgesamt wurden somit bis zum Ende des Berichtszeitraumes Genehmigungen für die Verwendung von hES-Zellen in insgesamt **69** Forschungsvorhaben erteilt. Ein im Jahr 2006 genehmigtes Vorhaben wurde im Berichtszeitraum zum Abschluss gebracht; am Ende des Berichtszeitraumes bestanden folglich Genehmigungen für die Durchführung von **68** Forschungsvorhaben unter Verwendung von hES-Zellen, die von **53** Arbeitsgruppen an **39** Institutionen durchgeführt werden.

Für mehrere bereits genehmigte Vorhaben wurden die Genehmigungen im Berichtszeitraum erweitert. In **vier** Fällen wurden zusätzliche experimentelle Arbeiten an hES-Zellen beantragt, die thematisch zwar nahe an den bislang genehmigten Verwendungen von hES-Zellen lagen, jedoch über die zuvor genehmigten Forschungsarbeiten deutlich hinausgingen, so dass es einer erneuten Prüfung des Vorliegens der Kriterien des § 5 StZG und damit auch einer erneuten Prüfung und Bewertung durch die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES) bedurfte. Für **neun** genehmigte Projekte wurde die Einfuhr weiterer humaner ES-Zellen beantragt und genehmigt, die zusätzlich zu schon importierten hES-Zellen für bereits genehmigte Zwecke verwendet werden sollen. Die Einträge im Register nach § 11 StZG auf den Internetseiten des Robert Koch-Instituts wurden für die entsprechenden Genehmigungen jeweils angepasst.

1.2.2. Angaben zu den im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben

Bis zum 31.12.2009 (Ende des vierten Berichtszeitraumes) waren 49 Genehmigungen nach dem StZG erteilt worden.

Die insgesamt **50.** Genehmigung für die Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen erging am 13.01.2010 an das Zentrum für Biologische Signalstudien (BIOSS) der Universität Freiburg. Gegenstand der Forschungsarbeiten ist zunächst die Klärung der Fragestellung, ob das Chromatin humaner embryonaler Stammzellen – ähnlich wie es in mES-Zellen beobachtet wurde – strukturelle und dynamische Besonderheiten aufweist und inwieweit dynamische Veränderungen des Chromatins von hES-Zellen zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustands dieser Zellen beitragen. Im Projekt soll ferner untersucht werden, wie sich die Wechselwirkungen bestimmter Kernproteine mit der chromosomalen DNA und damit die Eigenschaften des Chromatins im Verlaufe der Reprogrammierung somatischer Zellen des Menschen zu humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) verändern. Es soll insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob durch Ermittlung spezifischer Veränderungen in der Organisation des Chromatins (insbesondere in der Mobilität ausgewählter DNA-bindender Proteine) der Grad des Voranschreitens des Reprogrammierungsprozesses somatischer Zellen in einen pluripotenten Zustand bestimmt werden kann. Aus dem Vorhaben sind voraussichtlich sowohl neue Erkenntnisse über

Grundlagen der Pluripotenz menschlicher Zellen als auch über molekulare Vorgänge bei der Reprogrammierung somatischer Zellen zu erwarten.

Die **51.** Genehmigung wurde am 02.02.2010 erteilt, Genehmigungsinhaber ist die Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Gegenstand des Forschungsvorhabens ist die Differenzierung von hES-Zellen in Zellen von Blutgefäßen (endotheliale Zellen), die genaue Analyse des Differenzierungsprozesses sowie die umfassende Charakterisierung der differenzierten Zellen, was mit der Gewinnung neuer wesentlicher Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen endothelialer Differenzierung beim Menschen verbunden sein kann. In parallelen Untersuchungen soll vergleichend zu hES-Zellen das endotheliale Differenzierungspotential von hiPS-Zellen untersucht und die Frage geklärt werden, ob und inwieweit aus hiPS-Zellen abgeleitete Zellen in Tiermodellen für Gefäßerkrankungen therapeutische Effekte, insbesondere hinsichtlich der Gefäßneubildung, vermitteln können. Aus den Forschungsarbeiten werden neue Erkenntnisse darüber erwartet, ob hiPS-Zellen ein mit hES-Zellen vergleichbares Potential haben, *in vitro* Endothelzellen bilden zu können, die nach der Transplantation in Mausmodelle funktionsfähige Endothelien bilden, wie es bereits für hES-Zellen beschrieben worden ist.

Inhaberin der am 09.03.2010 erteilten **52.** Genehmigung nach dem StZG ist die Max-Planck-Gesellschaft, Institut für molekulare Biomedizin, Münster. Die genehmigten Forschungsarbeiten zielen auf die Erarbeitung verbesserter Protokolle für die Differenzierung von hES-Zellen in funktionsfähige Nerven- und Herzmuskelzellen. Dabei sollen auf neuen zellbiologischen Erkenntnissen beruhende Methoden für die Bereitstellung von terminal differenzierten dopaminergen Neuronen und Motoneuronen entwickelt und durch genetische Modifikation der hES-Zellen und deren Differenzierung Zellmodelle für bestimmte neurodegenerative Erkrankungen etabliert werden. Weiterhin sollen verschiedene Protokolle für die Herzzell-Differenzierung humaner ES-Zellen vergleichend evaluiert und optimiert werden. Die aus hES-Zellen differenzierten kardialen Zellen sollen dann auf ihre Eignung zur Anwendung in *In-vitro*-Modellen für die Untersuchung toxischer Wirkungen zugelassener Arzneimittel und potentieller Wirkstoffe am menschlichen Herzen hin untersucht werden. Ferner sollen hES-Zellen auch für Vergleichszwecke in Untersuchungen zur neuronalen und kardialen Differenzierung von (krankheitsspezifischen) hiPS-Zellen genutzt werden. Aus dem Projekt wird ein vertieftes Verständnis der molekularen Grundlagen von Differenzierungsprozessen menschlicher Zellen, die Bereitstellung optimierter Differenzierungsprotokolle sowie ein Beitrag zur Entwicklung verbesserter *In-vitro*-Zellkulturmodelle für die Krankheits- und Arzneimittelforschung erwartet. Ferner werden sich voraussichtlich neue Erkenntnisse über Gemeinsamkeiten und Unterschiede von hES- und hiPS-Zellen bezüglich ihres neuronalen und kardialen Differenzierungspotentials gewinnen lassen.

Die **53.** Genehmigung erging am 28.04.2010 an Herrn Dr. Bühring, Universität Tübingen, und wurde für Arbeiten unter Nutzung von hES-Zellen zu Vergleichszwecken bei der Charakterisierung von Oberflächen-Antigenen auf humanen adulten spermatogonialen Stammzellen (haGSCs) erteilt. Die Oberflächenmoleküle auf diesen nach damaligem Kenntnisstand potentiell pluripotenten Zellen sollen mit auf hES-Zellen befindlichen Oberflächenmolekülen verglichen und mit immunologischen Methoden charakterisiert werden. Die Präsenz spezifischer Oberflächenmoleküle auf haGSCs könnte zur Anreicherung dieser Zellen aus Populationen von Ausgangszellen genutzt werden. Das Projekt wird im Zusammenhang mit den Arbeiten zur vergleichenden Charakterisierung von hES-Zellen und haGSCs durchgeführt, die Gegenstand der mit der 35. Genehmigung vom 18.12.2008 bewilligten Forschungsarbeiten sind.

Die **54.** Genehmigung wurde am 08.06.2010 an Herrn Prof. Dr. Saric, Universität Köln, erteilt. Das Forschungsvorhaben beschäftigt sich mit der Untersuchung von Vorgängen, die sich auf zellulärer Ebene bei der Alterung (Seneszenz) humaner Zellen abspielen. Die Untersuchungen werden vor allem an mesenchymalen Stammzellen (MSCs) des Menschen durchgeführt, die in Kultur besonders schnell altern. hES-Zellen werden, da sie nicht der replikativen Seneszenz unterliegen, hier zu Kontrollzwecken verwendet. Die Vorgänge der Zellalterung sollen auch an aus MSCs hergestellten hiPS-Zellen untersucht werden, wozu hES-Zellen ebenfalls zu Vergleichszwecken benötigt werden. Die Untersuchungen sollen das Verständnis von den Prozessen der Zellalterung in MSCs vertiefen und Erkenntnisse darüber erbringen, welche Moleküle und Signalwege an Alterungsprozessen in somatischen Stammzellen beteiligt sind. Durch die Untersuchung der für die Alterung von MSCs relevanten Moleküle und Signalwege in hES-Zellen kann sich aus dem Projekt auch ein Erkenntnisgewinn darüber ergeben, wie Seneszenz in pluripotenten Stammzellen verhindert wird, was zu einem vertieften Verständnis von den molekularen Grundlagen von Pluripotenz beitragen kann. Erforscht werden soll auch, ob die für die Zellalterung verantwortlichen Veränderungen auf epigenetischer Ebene durch die Reprogrammierung vollständig rückgängig gemacht werden. Im Ergebnis der Forschungsarbeiten könnten somit ggf. verbesserte Strategien für die Erzeugung von hiPS-Zellen vorliegen.

Die **56.** und **57.** Genehmigung nach dem StZG ergingen am 30.11.2010 an Herrn Prof. Dr. Müller und Frau Prof. Dr. Sirén, die an unterschiedlichen Einrichtungen der Universität Würzburg tätig sind und für die Durchführung eines gemeinsam beantragten Forschungsvorhabens die Erteilung voneinander unabhängiger Genehmigungen beantragt hatten. Gegenstand der Forschungsarbeiten sind vergleichende Untersuchungen zur neuronalen Differenzierungsfähigkeit von humanen parthenogenetisch erzeugten pluripotenten Stammzellen (hpPS-Zellen) und hES-Zellen. Die differenzierten Zellen sollen nach ihrer umfassenden molekularen Charakterisierung auf ihre Fähigkeit hin überprüft werden, sich in

experimentell geschädigtes Nervengewebe von Nagern zu integrieren. Ein Hauptinteresse des Forschungsvorhabens liegt in der vergleichenden Untersuchung des Imprinting von Genen, die im Gehirn monoallelisch exprimiert werden, in den Ausgangszellen und aus diesen differenzierten neuronalen Zellen. Ferner sollen die immunologischen Eigenschaften von aus beiden Zelltypen abgeleiteten neuronalen Zellen vergleichend bewertet werden. Das Projekt kann zur Klärung der Frage beitragen, ob und in welcher Art und Weise sich das Fehlen eines paternalen Genoms in hpPS-Zellen auf die neuronale Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen bzw. auf die Eigenschaften der aus ihnen abgeleiteten neuronalen (Vorläufer)Zellen auswirkt. Hieraus werden Aufschlüsse über die Rolle des Imprinting in der neuronalen Entwicklung erwartet. Ferner dient das Projekt auch der Klärung der Fragestellung, ob sich aus hpPS-Zellen gewonnene neurale Zellen prinzipiell für zelltherapeutische Ansätze im Zentralnervensystem eignen und somit eine zu hES-Zellen alternative Zellquelle für die regenerative Medizin darstellen könnten.

Die **58.** Genehmigung nach dem StZG wurde ebenfalls am 30.11.2010 erteilt und erging an Herrn Prof. Dr. Fischer von der Universität Halle-Wittenberg. Die Forschungsarbeiten dienen der Klärung der Fragestellung, ob und inwieweit sich unter Nutzung von hES-Zellen ein Zellmodell für die Differenzierung von Fettzellen etablieren lässt und ob ein derartiges Modell geeignet sein könnte, die Wirkungen obesogener Substanzen auf die Fettzellendifferenzierung untersuchen zu können. Dabei soll die Wirkung hoher Konzentrationen an Glukose sowie bekannter und potentieller obesogener Substanzen beispielsweise auf das Epigenom, das Genexpressionsmuster und den Fettstoffwechsel in sich differenzierenden Fettzellen untersucht werden. Das Projekt kann zur Aufklärung der bislang wenig verstandenen Wirkmechanismen obesogener Substanzen im Menschen, insbesondere in den frühen Phasen seiner Entwicklung, beitragen und ggf. zu einem verbesserten Verständnis der molekularen Prozesse führen, die an der Auslösung von Stoffwechselkrankheiten wie Adipositas beteiligt sind. Ferner dienen die Forschungsarbeiten dem Ziel, Grundlagen für zellbasierte *In-vitro*-Testsysteme für die Untersuchung der Wirkung von potentiell obesogenen Substanzen auf sich entwickelnde Fettzellen zu schaffen, die der Überprüfung von Substanzen im Vorfeld ihres Inverkehrbringens auf eine mögliche obesogene Wirkung, insbesondere auf den sich entwickelnden menschlichen Fötus, dienen können.

Die am 27.11. 2011 erteilte **59.** Genehmigung nach dem StZG erging an Herrn Dr. Pruszk, Universität Freiburg. Das Forschungsvorhaben befasst sich mit verschiedenen Aspekten der Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen zu neuronalen Zellen. So sollen beispielsweise verschiedene neurale Sublinien, die während der neuronalen Differenzierung menschlicher Zellen auftreten, bezüglich der Präsenz von Oberflächenantigenen untersucht und klassifiziert werden. Ziel ist es, die Anwesenheit bestimmter Oberflächenmarker auf neuronalen (Vorläufer)Zellen mit spezifischen neuronalen Entwicklungspotentialen bzw. mit bestimmten

funktionellen Eigenschaften korrelieren zu können und ggf. neue Subpopulationen neuraler (Vorläufer)Zellen zu identifizieren. Ferner soll untersucht werden, welche Zell-Zell-Wechselwirkungen zwischen bestimmten Populationen neuraler (Vorläufer)Zellen beim weiteren Fortgang der Differenzierung bzw. bei der Reifung neuraler Zellen eine Rolle spielen. Weiterhin sollen auf der Grundlage hES-Zell-basierter Reporterzell-Linien Gene identifiziert werden, deren Produkte lösliche Faktoren sind und die intrazelluläre Signalkaskaden in sich neural differenzierenden Zellen auslösen. Auf diesem Wege identifizierte Faktoren sollen dann bezüglich ihrer Rolle in der neuronalen Differenzierung von hES-Zellen untersucht werden. Schließlich sollen auf Grundlage der Ergebnisse des Forschungsvorhabens dann optimierte Differenzierungsprotokolle insbesondere für die Gewinnung dopaminerger und GABAerger Neuronen etabliert und diese Typen neuraler Zellen in entsprechenden Tiermodellen für Schädigungen des Zentralnervensystems bezüglich ihrer Funktionalität überprüft werden. Die Untersuchungen sollen im weiteren auch auf hiPS-Zellen ausgedehnt werden. Aus dem Projekt werden u. a. neue Erkenntnisse über Eigenschaften neuraler Vorläuferzellen des Menschen, über die Rolle von Zell-Zell-Wechselwirkungen in der Neurogenese sowie über lösliche Faktoren erwartet, die über Oberflächenmolekül-vermittelte Signaltransduktion das Differenzierungsverhalten bestimmter neuraler (Vorläufer)Zellen beeinflussen und zur Bildung von spezifischen neuronalen Zelltypen beitragen können. Des Weiteren könnten im Ergebnis des Projektes verbesserte Protokolle für die Differenzierung in bestimmte neuronale Zelltypen vorliegen, die in der weiteren Perspektive sowohl für die Arzneimittelforschung als auch für die regenerative Medizin bedeutsam sein könnten.

Ebenfalls am 27.01.2011 wurde der Max-Planck-Gesellschaft, Institut für Infektionsbiologie, Berlin, die **60.** Genehmigung nach dem StZG erteilt. Gegenstand des genehmigten Vorhabens ist die Untersuchung von zellulären und molekularen Vorgängen eines erst kürzlich identifizierten Mechanismus der zellulären Immunantwort, der sog. extrazellulären Fallen, die von neutrophilen Granulozyten gebildet werden (*Neutrophile Extracellular Traps*, NETs). Dazu sollen humane neutrophile Granulozyten aus hES-Zellen differenziert, entsprechende Protokolle optimiert und die entstandenen Zellen umfassend charakterisiert werden. Ziel des Projektes ist es, Einblicke in die molekularen Grundlagen der Entwicklung neutrophiler Granulozyten zu erhalten und potentielle Subpopulationen dieser Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren. Ferner sind Untersuchungen geplant, die zum Verständnis jener molekularen Prozesse beitragen sollen, die in Zusammenhang mit der NET-Bildung stehen.

Die **61.** Genehmigung erging am 04.02.2011 an Herrn Dr. A. Kleger, Universitätsklinikum Ulm. Schwerpunkt der hier genehmigten Arbeiten ist die Entwicklung neuer Verfahren für die kardiale Differenzierung von hES-Zellen. In Zellen der Maus wurde durch Modulation der Aktivität Kalzium-aktivierbarer Kaliumkanäle (SK-Kanäle) eine deutliche Stimulation der kar-

dialen Differenzierung erreicht. Im genehmigten Vorhaben soll dieses Vorgehen nun auf hES-Zellen angewandt und dadurch eine Stimulation der kardialen Differenzierung bewirkt werden. Es wird erwartet, dass insbesondere kardiale Schrittmacherzellen entstehen, deren Differenzierung aus pluripotenten Stammzellen sich bislang als schwierig gestaltet hat. Ziel des Vorhabens ist es folglich, Protokolle für die kardiale Differenzierung humaner ES-Zellen zu etablieren, mit deren Hilfe kardiale Schrittmacherzellen von hoher Reinheit und gleichbleibender Qualität gewonnen werden können. Ferner soll der Beitrag spezifischer Isoformen der SK-Kanäle zur kardialen Differenzierung von hES-Zellen bestimmt und die Beteiligung intrazellulärer Signalwege an der Differenzierung zu Schrittmacherzellen aufgeklärt werden. Zudem sollen auch hiPS-Zellen hinsichtlich der Präsenz von SK-Kanälen und deren Rolle bei kardialen Differenzierungsvorgängen untersucht und mit hES-Zellen verglichen werden.

Gegenstand der **62.** Genehmigung, die am 04.02.2011 an die Evotec AG, Hamburg, erteilt wurde, ist die Aufklärung zellulärer und molekularer Prozesse, die an der Pathogenese der Huntingtonschen Krankheit (Chorea Huntington) beteiligt sind. Ferner sollen niedermolekulare Substanzen identifiziert werden, die die phänotypische Ausprägung der Merkmale des Chorea Huntington auf zellulärer Ebene beeinflussen können. Zunächst sollen hES-Zellen in jenen Typ neuraler Zellen differenziert werden, in dem der mit der Huntingtonschen Krankheit verbundene zelluläre Phänotyp am stärksten ausgeprägt ist (sog. *Medium-Spiny-Neuronen*, *MSN*), und die entsprechenden Differenzierungsprotokolle optimiert werden. Durch Transfer des Gens für mutiertes Huntingtin (mHtt) in aus hES-Zellen differenzierte neurale Vorläuferzellen und anschließende Differenzierung der genetisch veränderten Zellen zu MSN soll dann ein Zellmodell für Chorea Huntington etabliert werden, an dem verschiedene Aspekte dieser Krankheit untersucht werden sollen. Anschließend soll dieses Zellmodell zur Etablierung von Hochdurchsatzverfahren verwendet werden, mit deren Hilfe niedermolekulare Substanzen identifiziert werden sollen, die spezifische phänotypische Ausprägungen des Chorea Huntington auf zellulärer Ebene positiv beeinflussen können. Neben möglichen Erkenntnissen über Prozesse bei der Differenzierung von Zellen zu MSN können die genehmigten Arbeiten zu einem verbesserten Verständnis der molekularen Ursachen der Huntingtonschen Krankheit beitragen und ggf. Grundlagen für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zu ihrer Behandlung schaffen helfen.

Die **63.** Genehmigung wurde am 05.04.2011 an Frau PD Dr. B. Winner, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, erteilt. Mit den genehmigten Forschungsarbeiten werden zwei Zielstellungen verfolgt. Zum einen ist die Etablierung und Optimierung von Protokollen für die Gewinnung kortikospinaler Motoneuronen (*corticospinal motor neurons*, *CSMNs*) geplant, wobei letztlich ein auf humanen Zellen basierendes Modellsystem für diesen schwer zugänglichen Zelltyp geschaffen werden soll. Durch Überexpression von (spezifisch mutierten) Genen, deren Produkte eine Rolle bei der Pathogenese degenerativer Erkrankungen

von Motoneuronen spielen, sollen dann auf Grundlage von aus hES-Zellen gewonnenen Neuronen Zellmodelle für bestimmte Erkrankungen, wie beispielsweise die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder die hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP), geschaffen werden. Diese könnten künftig für Untersuchungen zur Pathogenese dieser Erkrankungen sowie die Entwicklung neuer Wirkstoffe genutzt werden. Zum anderen soll untersucht werden, ob und inwieweit sich hES-Zellen und hiPS-Zellen bezüglich ihres Differenzierungspotentials in spezifische Typen neuraler Zellen gleichen bzw. unterscheiden. Dazu sollen hES-Zellen und hiPS-Zellen parallel in verschiedene neurale Zelltypen differenziert und die entstehenden Zellpopulationen charakterisiert werden. Das Projekt kann bei erfolgreicher Durchführung insgesamt zu einem besseren Verständnis der neuralen Differenzierung, zur Schaffung relevanter zellulärer Krankheitsmodelle und zu neuen Erkenntnissen über die Eigenschaften pluripotenter Stammzellen des Menschen beitragen.

Die **64.** Genehmigung erging am 10.05.2011 an die Max-Planck-Gesellschaft, Institut für molekulare Biomedizin, Münster. Gegenstand der Forschungsarbeiten ist die Aufklärung molekularer Prozesse, die bei der Differenzierung zu weiblichen Keimzellen des Menschen ablaufen. Dazu sollen Protokolle für die Differenzierung von hES-Zellen zu primordialen Keimzellen (*primordial germ cells*, PGCs) entwickelt und optimiert werden. Im Folgenden sollen dann die frühen Prozesse der Follikelbildung und Meiose *in vitro* untersucht und daran beteiligte Signaltransduktionswege analysiert werden. Hierbei sollen insbesondere die Rolle von Genen, deren *knock out* im Mausmodell die Meiose und die Follikelbildung hemmen, bei der Entwicklung menschlicher Eizellen aufgeklärt werden. Humane PGCs sollen im weiteren auch mit Granulosazellen bzw. den somatischen Zellen der Ovarien neonataler Mäuse gemischt und als Aggregate *in vitro* kultiviert werden, um den Einfluss einer natürlichen Nische auf die Keimzellentwicklung nachzubilden. Ferner sollen diese Aggregate auch nach Transplantation unter die Nierenkapsel von Nacktmäusen hinsichtlich der Frage untersucht werden, ob und inwieweit diese Nische die weitere Entwicklung und Reifung humaner Oozyten begünstigt. Alle Untersuchungen sollen im Vergleich zwischen hES- und hiPS- Zellen erfolgen und dienen der Erweiterung von Kenntnissen über die Keimzellentwicklung beim Menschen.

Die **65.** Genehmigung wurde am 21.06.2011 dem GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH erteilt. Gegenstand der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Untersuchung des Einflusses verschiedener Typen ionisierender Strahlung auf hES-Zellen und deren frühe Differenzierung. Dabei soll u. a. die Wirkung ionisierender Strahlung unterschiedlicher Qualität auf die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit, die genetische Stabilität, den Zellzyklus und das Genexpressionsprofil undifferenzierter hES-Zellen bestimmt werden. Anschließend soll der Einfluss der Strahlung auf das frühe Differenzierungsvermögen von hES-Zellen untersucht und dann mögliche Konsequenzen einer Strahlenexposition für aus

hES-Zellen gewonnene kardiale Zellen sowie neurale Vorläuferzellen analysiert werden. Ziel der Forschung ist ein tieferes Verständnis von durch Strahlung ausgelöste molekulare Prozesse in sich differenzierenden Zellen. Die Forschungsergebnisse könnten ggf. künftig auch für die Einschätzung von Strahlenrisiken während der frühen Embryonalentwicklung des Menschen genutzt werden.

Die **66.** Genehmigung erhielt ebenfalls am 21.06.2011 Herr Prof. Dr. E. Bonifacio, Technische Universität Dresden. Ziel des Forschungsvorhabens ist die Entwicklung effizienter Methoden für die Differenzierung von hES-Zellen zu funktionsfähigen Insulin-produzierenden pankreatischen β -Zellen. In Weiterentwicklung etablierter Protokolle sollen hES-Zellen innerhalb eines dreidimensionalen Kultursystems zu Insulin-produzierenden pankreatischen Inseln bzw. inselartigen Strukturen differenziert und die dabei entstehenden pankreatischen Vorläuferzelltypen im Detail untersucht werden. Die *in vitro* hergestellten inselartigen Strukturen sollen dann in diabetische Mäuse transplantiert und ihre weitere Reifung und ihre Funktionsfähigkeit *in vivo* analysiert werden. Hierbei soll insbesondere der Einfluss der Kotransplantation humaner mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks auf die Überlebensfähigkeit und die Funktionalität des transplantierten pankreatischen Gewebes bestimmt werden. Neben hES-Zellen sollen auch hiPS-Zellen in den Untersuchungen eingesetzt werden, um zu klären, ob beide Zelltypen ein vergleichbares pankreatisches Differenzierungspotential aufweisen. Außer Erkenntnissen über molekulare Vorgänge bei der Differenzierung von hES-Zellen und hiPS-Zellen zu pankreatischen Strukturen soll das Vorhaben auch Erkenntnisse über deren mögliche Eignung für potentielle Gewebeersatztherapien erbringen und zielt in seiner weiteren Perspektive auf die Schaffung von Grundlagen für Gewebeersatztherapien des Diabetes mellitus.

Die **67.** Genehmigung erging am 30.06.2011 an die Lonza Cologne GmbH, Köln. Ziel der genehmigten Forschungsarbeiten ist die Etablierung humanspezifischer Testsysteme, die auf aus pluripotenten Zellen gewonnenen menschlichen Zellen basieren. Im Mittelpunkt steht dabei die Übertragung bereits etablierter zellbasierter Assays auf hES-Zellen und die anschließende gerichtete Differenzierung der Zellen in pharmakologisch relevante Zelltypen wie beispielsweise Hepatozyten oder Neuronen. Mit Hilfe dieser Zellen sollen dann Testsysteme entwickelt werden, mit denen die Wirkungen von (pharmakologisch wirksamen) Substanzen auf spezifische intrazelluläre Vorgänge einfach, effizient und im Hochdurchsatzverfahren bestimmt werden können. In diesem Zusammenhang sollen auch Verfahren für die Kultivierung und Differenzierung von hES-Zellen in Bioreaktoren unter Nutzung synthetischer Kulturmedien entwickelt werden, um Zellen in großer Menge und gleichbleibend hoher Qualität zur Verfügung stellen zu können. Alle Untersuchungen sollen im Vergleich zwischen hES- und hiPS-Zellen durchgeführt werden. Die genehmigten Arbeiten können zur Klärung der Frage beitragen, ob sich aus den mit den genannten Assays versehenen hES-Zellen

reife und funktionsfähige menschliche Zellen gewinnen lassen, ob die zellbasierten Assays in den aus hES-Zellen differenzierten Zellen relevante Aussagen zu Effekten von Wirkstoffen auf spezifische menschliche Zellen liefern können und ob sich diese Tests im Hochdurchsatzverfahren durchführen lassen. Dies sind wesentliche Voraussetzungen für die Entwicklung verbesserter, humanspezifischer zellulärer *In-vitro*-Testsysteme, die eine effiziente Identifizierung von Wirkstoffen ermöglichen und eine bessere Abschätzung von für den Menschen spezifischen Arzneimittelrisiken bereits in frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung erlauben könnten.

Inhaberin der **68.** Genehmigung, die am 06.10.2011 erteilt wurde, ist die Medizinische Hochschule Hannover (MHH). Im Rahmen der genehmigten Forschungsarbeiten soll untersucht werden, welchen genomischen Veränderungen hES-Zellen im Verlaufe ihrer Langzeitkultivierung unterliegen und wodurch diese bedingt werden. Es soll geklärt werden, ob und wie sich bestimmte Kulturbedingungen auf für die zelluläre Pluripotenz maßgebliche Eigenschaften und auf die genomische Integrität verschiedener Typen von hES-Zellen und – im direkten Vergleich mit diesen – von hiPS-Zellen auswirken. Es sollen ferner Strategien entwickelt werden, um die Akkumulation möglicher genomischer Veränderungen in pluripotenten Stammzellen während der Langzeitkultivierung zu verhindern. Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse sollen dann genutzt werden, um Protokolle für die Massenkultivierung von hES-Zellen in Suspensionskultur und in Bioreaktoren zu etablieren und zu optimieren, wobei deren genetische Integrität erhalten bleiben soll. Der im Vorhaben angestrebte Erkenntnisgewinn zur genetischen Stabilität von pluripotenten Stammzellen und nach Möglichkeiten zu deren Erhaltung hat für eine künftig angestrebte Verwendung von Derivaten pluripotenter Stammzellen in der Gewebeersatztherapie erhebliche Relevanz, ist aber auch für die Bereitstellung dieser Zellen in gleichbleibend hoher Qualität für *In-vitro*-Anwendungen von großer Bedeutung.

Die **69.** Genehmigung wurde am 06.10.2011 erteilt und erging an die CellGenix GmbH, Freiburg. Die Forschungsarbeiten zielen auf die Entwicklung von GMP-konformen Medien, Medienzusätzen und Wachstumsfaktoren für die Kultivierung von hES-Zellen sowie für deren Differenzierung in Hepatozyten. Dazu sollen die Komponenten der für die hES-Zell-Kultivierung verwendeten Medien schrittweise gegen unter GMP-Bedingungen hergestellte Komponenten ausgetauscht und anschließend die hES-Zellen in Richtung menschlicher Hepatozyten differenziert werden, wobei die dafür benötigten Wachstumsfaktoren ebenfalls schrittweise gegen die entsprechenden GMP-konformen Substanzen ausgetauscht werden sollen. Die Verfügbarkeit ausreichender Mengen transplantierbarer Hepatozyten in GMP-Qualität ist Voraussetzung für die künftig vorstellbare Anwendung dieser Zellen in der Gewebeersatztherapie, aber auch für die Bereitstellung von GMP-konformen Zellen hoher Qualität für *In-vitro*-Anwendungen. Zudem sollen die während des Forschungsvorhabens entwickelten Me-

dien und Medienzusätze auch für die Etablierung und Kultivierung von GMP-konformen hiPS-Zellen und deren hepatische Differenzierung genutzt werden.

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

Erweiterung der 16. Genehmigung nach dem StZG (erteilt am 21.03.2006, Erweiterung der Genehmigung am 11.03.2010). Gegenstand der zusätzlich genehmigten Arbeiten ist die Entwicklung und Erprobung eines experimentellen Ansatzes für die gezielte Zerstörung undifferenzierter embryonaler Stammzellen in Populationen bereits differenzierter Zellen, die aus hES-Zellen abgeleitet wurden. Dazu soll ein sogenanntes Suizid-Gen (hier: Thymidin-Kinase-Gen des Herpes-Simplex-Virus, HSV) unter Kontrolle des nur in pluripotenten (undifferenzierten) Stammzellen exprimierten Gens für den Transkriptionsfaktor oct4 in Verbindung mit dem Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP) in hES-Zellen eingeschleust werden. Zellklone, die das eingeschleuste Gen enthalten, sollen selektiert, angereichert und zu pankreatischen Beta-Zellen differenziert werden. Anschließend sollen verbliebene undifferenzierte Zellen durch Behandlung mit dem Nukleotid-Analogon Ganciclovir selektiv eliminiert werden. Der Ansatz soll auch auf die pankreatische Differenzierung von humanen hiPS-Zellen übertragen werden. Strategien zur Eliminierung verbliebener pluripotenter Zellen aus Populationen differenzierter Zellen können sowohl für die Bereitstellung reinerer Zellpopulationen für *In-vitro*-Anwendungen als auch für die Verminderung des potentiellen Tumorrisikos bei künftig vorstellbaren Gewebeersatztherapien von Bedeutung sein.

Erweiterung der 39. Genehmigung nach dem StZG (erteilt am 02.04.2009, Erweiterung der Genehmigung am 28.06.2011). U. a. im Ergebnis bisheriger Untersuchungen des Genehmigungsinhabers sowie neuer Literaturbefunde zu molekularen Grundlagen von Pluripotenz bei hES- und hiPS-Zellen ist davon auszugehen, dass Pluripotenz ein relativ stabiler Phänotyp einer Zelle ist, der jedoch in verschiedenen ineinander übergehenden Zuständen zu existieren scheint. Diese Zustände von Pluripotenz sollen im Rahmen der nun genehmigten Arbeiten näher bestimmt und ihre jeweilige Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Pluripotenz bzw. für den Übergang von einem pluripotenten in einen differenzierten Phänotyp analysiert werden. Dazu sollen u. a. die verschiedenen Zustände von Pluripotenz in menschlichen pluripotenten Stammzellen zunächst näher charakterisiert werden, Karten („maps“) des Transkriptoms, Epigenoms und Proteoms ausgewählter hES- und hiPS-Zell-Linien erstellt sowie ein Modell zur Vorhersage jener zellulären Zustände etabliert und verifiziert werden, in denen natürlicherweise ein irreversibler Weg von der Pluripotenz in Richtung der Differenzierung eingeschlagen wird. Ferner sollen Fragen nach der Umkehrbarkeit oder Endgültigkeit der Differenzierung zu bestimmten Zeitpunkten im frühen Differenzierungs-

geschehen beantwortet, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Regionen während der Differenzierung analysiert und der Ablauf der Differenzierung durch Hochdurchsatzmikroskopie sowie Videomikroskopie dokumentiert werden. Die Forschungsarbeiten dienen weiterhin dem Ziel, einen für alle pluripotenten Zellen des Menschen charakteristischen Phänotyp zu definieren und möglichst genau zu beschreiben sowie die Bedeutung verschiedener Spielarten dieses Phänotyps zu ergründen.

Erweiterung der 38. Genehmigung nach dem StZG (erteilt am 12.02.2009, Erweiterung der Genehmigung am 11.02.2011). Gegenstand der genehmigten Arbeiten ist, in Erweiterung bereits genehmigter Arbeiten zur kardialen Differenzierung von hES-Zellen, die Erzeugung von sog. bioartifiziellem Herzgewebe (*Bioartificial Cardiac Tissues, BCT*) aus hES-Zellen. Dazu sollen aus hES-Zellen neben Herzmuskelzellen auch andere im Herzen auftretende Zelltypen, beispielsweise endotheliale Zellen, gewonnen und zur Herstellung des BCT genutzt werden. Die Reifung der aus hES-Zellen gewonnenen kardialen Zellen soll im Rahmen von BCTs in einem miniaturisierten Bioreaktor erfolgen, wobei u. a. der Einfluss mechanischer und elektrischer Stimulation auf die Bildung und Reifung der BCTs getestet werden soll. Die Reifung der Zellen in den BCTs soll u. a. mittels mikroskopischer Beobachtung im Bioreaktor, über die Messung der kontraktile Kräfte (z. B. nach pharmakologischer Stimulation), durch elektrophysiologische Messungen sowie – nach Beendigung der Kultur – durch Analyse des Transkriptom und des Proteoms der Zellen erfolgen. Die reproduzierbare Gewinnung bioartifiziellem menschlichen Herzgewebes könnte mittelfristig zur Etablierung von *In-vitro*-Testsystemen für die Untersuchung kardialer Wirkungen und Nebenwirkungen von Pharmaka am menschlichen Herzen und – auf längere Sicht – auch zur Entwicklung von Gewebeersatztherapien zur Anwendung am Menschen beitragen.

Erweiterung der 2. Genehmigung nach dem StZG (erteilt am 27.01.2003, Erweiterung der Genehmigung am 15.12.2011). Gegenstand der genehmigten Arbeiten ist die Untersuchung von Rezeptoren im menschlichen Herzen, deren Gene zur Genfamilie der olfaktorischen Rezeptoren gehören und die während der Entwicklung von kardialen Zellen aus hES-Zellen exprimiert werden. Liganden, die an diese Rezeptoren binden, sollen identifiziert und bezüglich ihrer Wirkung auf sich entwickelnde Herzzellen charakterisiert werden. Zelluläre Signalübertragungswege, die infolge der Ligandenbindung in kardialen Zellen aktiviert bzw. gehemmt werden, sollen untersucht und so ein möglicher Einfluss olfaktorischer Rezeptorproteine auf die Entwicklung von Herzzellen bestimmt werden. Schwerpunkt der Arbeiten ist die Analyse des *Calcium Signalling* in aus hES-Zellen gewonnenen kardialen Zellen unter dem Einfluss von Liganden für olfaktorische Rezeptoren. Mit den genehmigten Arbeiten an hES-Zellen sollen Erkenntnisse über die mögliche Beteiligung von olfaktorischen Rezeptoren an der Entwicklung von Herzzellen gewonnen, kardial wirksame Liganden dieser Rezeptoren

identifiziert und charakterisiert und so die Kenntnisse über die kardialen Differenzierungsvorgänge beim Menschen erweitert werden.

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

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

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 humanen embryonalen Stammzell-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 Beibringung der Dokumentation darüber, dass die Voraussetzungen nach § 4 Abs. 2 Nr. 1 StZG vorliegen, nicht erforderlich. Im Berichtszeitraum wurden die Einfuhr und Verwendung von insgesamt 30 verschiedenen humanen embryonalen Stammzell-Linien genehmigt. Für 29 dieser Zell-Linien lag die nach § 6 Abs. 2 Nr. 3 StZG erforderliche Dokumentation am RKI bereits vor, für nur eine hES-Zell-Linie wurde im Berichtszeitraum die Einfuhr und Verwendung erstmals beantragt und nach Prüfung der entsprechenden Dokumentation genehmigt. Gründe nach § 4 Abs. 2 Nr. 2 StZG standen der Einfuhr und Verwendung der hES-Zellen jeweils nicht entgegen. Tatsachen, nach denen die Genehmigung entsprechend § 4 Abs. 3 StZG zu versagen wäre, waren jeweils nicht bekannt.

Seit dem Inkrafttreten des Gesetzes zur Änderung des Stammzellgesetzes vom 14.08.2008 (BGBl I S. 1708) besteht 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 31.12.2011 wurden die Einfuhr von **24** „neuen“ hES-Zell-Linien und ihre Verwendung in insgesamt **36** Forschungsvorhaben entweder im Zusammenhang mit der Genehmigung eines neuen Antrags oder im Rahmen der Erweiterung bereits bestehender Genehmigungen nach dem StZG genehmigt. Damit besteht für mehr als die Hälfte aller Forschungsvorhaben eine Genehmigung zur Verwendung von hES-Zell-Linien, deren Einfuhr und Verwendung erst mit der Änderung des Stammzellgesetzes ermöglicht wurde.

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

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

1.4. Erfüllung der Voraussetzungen nach § 5 StZG

Im Rahmen der Prüfung der Genehmigungsvoraussetzungen nach § 6 Abs. 4 Nr. 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

Wie auch in den vergangenen Berichtszeiträumen dient die Mehrzahl der in 2010 und 2011 genehmigten Forschungsarbeiten der Erreichung hochrangiger Forschungsziele für den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung. Dabei richtet sich der angestrebte Erkenntnisgewinn vor allem auf hES-Zellen selbst und hierbei insbesondere auf Fragen ihrer effizienten Kultivierung und gerichteten Differenzierung. Dies steht vermehrt in Zusammenhang mit Zielstellungen für eine angestrebte künftige Verwendung von hES-Zellen und ihren Derivaten, vorrangig für *In-vitro*-Anwendungen beispielsweise in der Arzneimittelentwicklung, aber auch – auf längere Sicht – für die künftige Nutzung im Rahmen von medizinischen Applikationen. Ferner dienen hES-Zellen auch als Vergleichsmaterial für die Charakterisierung von anderen (pluripotenten) Stammzellen des Menschen, beispielsweise hiPS-Zellen. Wie auch im vergangenen Berichtszeitraum lassen sich die vom RKI in 2010 und 2011 genehmigten Forschungsarbeiten thematisch verschiedenen Gruppen zuordnen, wobei auch thematische Überschneidungen vorkommen.

Erstens ist ein Teil der genehmigten Arbeiten darauf gerichtet, die Bedingungen der Kultivierung von hES-Zellen weiter zu optimieren. Dabei geht es vor allem um die Etablierung von Bedingungen für die Kultivierung und Differenzierung von hES-Zellen in größeren als im Labor üblichen Maßstäben, beispielsweise in Suspensionskultur oder in Bioreaktoren, sowie um die Standardisierung der Kultur- und Differenzierungsbedingungen unter Nutzung gut definierter und ggf. synthetischer Medien. Dies dient dem Ziel, hES-Zellen und deren differenzierte Derivate in großer Menge sowie in reproduzierbar hoher Qualität verfügbar zu machen und wird als Voraussetzung einer künftigen Nutzung von hES-Zellen für die pharmakologisch-toxikologische Forschung oder für medizinische Anwendungen angesehen. In diesem Zusammenhang ist das Augenmerk vor allem darauf gerichtet, eine hohe Stabilität der Zellkulturen zu gewährleisten, beispielsweise hinsichtlich der für zelluläre Pluripotenz cha-

rakteristischen Eigenschaften, bezüglich der genetischen Stabilität der hES-Zellen oder in Bezug auf das Glykosylierungsmuster zellulärer (Oberflächen)Proteine. Diese Untersuchungen werden üblicherweise primär an hES-Zellen durchgeführt und sollen im Anschluss teils auch auf hiPS-Zellen ausgedehnt werden, um zu stärker allgemeingültigen Aussagen über pluripotente Stammzellen des Menschen insgesamt zu gelangen.

Eine **zweite** Gruppe von Fragestellungen betrifft bestimmte Eigenschaften von hES-Zellen, beispielsweise Fragen nach ihrer Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (und damit im Zusammenhang stehend nach dem Vorkommen spezifischer DNA-Reparatur-Mechanismen), nach für hES-Zellen typischen Glykosylierungsmustern oder nach der Präsenz bestimmter Oberflächenantigene. Ferner sind auch Fragen nach molekularen Grundlagen der Pluripotenz menschlicher Zellen weiterhin Untersuchungsgegenstand. In diesen Vorhaben geht es vor allem darum, den Kenntnisstand über hES-Zellen selbst auszuweiten und darüber hinaus ggf. zu klären, ob und inwieweit hinsichtlich der jeweils interessierenden Eigenschaften Identität mit hiPS-Zellen besteht.

Drittens zielt ein Teil der genehmigten Forschungsarbeiten weiterhin darauf ab, die Bedingungen für die gerichtete Differenzierung von hES-Zellen in spezifische menschliche Zelltypen zu erforschen bzw. zu optimieren. Dabei steht die Differenzierung in kardiale und neuronale Zellen weiterhin im Vordergrund, aber auch die Differenzierung in hepatische Zellen, endotheliale Zellen, in weibliche Keimzellen sowie in Zellen des Pankreas und des Blutes ist Gegenstand von im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsarbeiten. Hierbei sollen einerseits Kenntnisse über Prozesse gewonnen werden, die auf zellulärer und molekularer Ebene während der Entwicklung dieser Zelltypen ablaufen, woraus ggf. Schlüsse auf entsprechende Vorgänge bei der Embryonalentwicklung sowie bei postnatalen regenerativen Prozessen im Menschen gezogen werden können. Andererseits sollen Methoden und Protokolle für die Differenzierung von hES-Zellen in den jeweiligen Zelltyp entwickelt und optimiert werden, um differenzierte menschliche Zellen in ausreichender Zahl und hoher Reinheit *in vitro* gewinnen und für die Beantwortung sich anschließender Forschungsfragen zur Verfügung stellen zu können. Solche Anschlussfragen beziehen sich dann beispielsweise auf die Funktionalität eines menschlichen Zelltyps nach Transplantation in Tiermodelle für bestimmte degenerative Erkrankungen als Voraussetzung für künftig vorstellbare Gewebeersatztherapien, auf Ursachen für Entwicklungsstörungen bei der Genese eines spezifischen Zelltyps oder auf die Eignung von aus hES-Zellen differenzierten Zellen für in *In-vitro*-Testsysteme zur Beantwortung pharmakologisch-toxikologischer Fragestellungen. Die in diesen Vorhaben entwickelten bzw. optimierten Protokolle sollen in vielen Fällen auch auf hiPS-Zellen angewandt werden, um festzustellen, ob und inwieweit sich das jeweilige Differenzierungsverhalten von hES- und hiPS-Zellen gleicht oder unterscheidet.

Viertens hat ein Teil der genehmigten Vorhaben ausdrücklich die Entwicklung von aus hES-Zellen abgeleiteten Zellmodellen für degenerative Erkrankungen des Menschen zum Gegenstand. Dabei geht es nicht um regenerative Ansätze zum Ersatz humanen Gewebes, sondern um die Bereitstellung von reproduzierbar herstellbaren und aussagefähigen Zellmodellen für schwere und teils unheilbare Erkrankungen des Menschen. Dies betraf im Berichtszeitraum Modelle für Chorea Huntington und verschiedene (erblich bedingte) Erkrankungen, die mit der Degeneration von Motoneuronen einhergehen. Anhand dieser Modelle könnten künftig einerseits Prozesse der Krankheitsentstehung auf zellulärer Ebene genauer untersucht und andererseits neue Ansätze für die Wirkstoffentwicklung erforscht bzw. validiert werden.

Fünftens beschäftigt sich ein kleinerer Teil der Vorhaben überwiegend mit Fragen nach bestimmten Eigenschaften von anderen Stammzellen des Menschen, und hES-Zellen werden hier vor allem oder ausschließlich als Referenzmaterial benötigt. Die Fragestellungen beziehen sich bei hiPS-Zellen auf Veränderungen im Chromatin während des Reprogrammierungsprozesses, bei (potentiell) pluripotenten spermatogonialen Stammzellen auf die Präsenz bestimmter Oberflächenantigene, bei parthenogenetisch erzeugten humanen pluripotenten Stammzellen insbesondere auf die Frage nach deren neuronaler Differenzierungskapazität sowie bei mesenchymalen Stammzellen des Menschen auf molekulare Grundlagen zellulärer Alterungsprozesse. Hier können zwar ggf. auch neue Erkenntnisse über hES-Zellen gewonnen werden, maßgeblich für die Zuerkennung der Hochrangigkeit der Forschungsziele war hierbei der jeweils angestrebte Erkenntnisgewinn über andere Typen menschlicher Stammzellen. In insgesamt vier von 21 im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben, die unter Nutzung von hES-Zellen erfolgen, und in keinem der im Berichtszeitraum inhaltlich erweiterten Vorhaben ist eine Nutzung von hES-Zellen ausschließlich oder überwiegend zu Vergleichszwecken vorgesehen.

Die Verwendung von hES-Zellen dient in der Mehrzahl der im Berichtszeitraum genehmigten Vorhaben folglich primär der Gewinnung eines eigenständigen Erkenntnisgewinns über hES-Zellen selbst oder über pluripotente Stammzellen i. allg., wobei in einer großen Anzahl von Projekten Untersuchungen zunächst an hES-Zellen durchgeführt und die Ergebnisse anschließend unter Nutzung von hiPS-Zellen für ein breiteres Spektrum pluripotenter Stammzellen des Menschen verifiziert werden sollen. Dies entspricht im Wesentlichen auch den Trends in der internationalen Forschung. Die Genehmigungstätigkeit der Jahre 2010 und 2011 ergibt keinen Hinweis darauf, dass hES-Zellen in Deutschland derzeit nur oder vorwiegend als „Goldstandard“ für Forschungen an hiPS-Zellen verwendet werden sollen.

In einem nicht unwesentlichen Anteil der im Berichtszeitraum genehmigten Forschungsvorhaben wurden neben Zielstellungen in der Grundlagenforschung (auch) Zielstellungen im Bereich der Schaffung von Grundlagen für neue therapeutische, diagnostische und präven-

tive Verfahren formuliert. Dabei fand auch der in Aussicht gestellte künftige wissenschaftliche Nutzen von auf hES-Zellen basierenden *In-vitro*-Zellkulturmodellen, deren Grundlagen in den genehmigten Vorhaben jeweils erarbeitet werden sollen, bei der Antragsbewertung Berücksichtigung. Zielstellungen im Bereich der Entwicklung von Grundlagen für neue *In-vitro*-Testverfahren, beispielsweise zur frühzeitigen Erkennung von Arzneimittelrisiken an einem isolierten Zelltyp, wurden in acht der genehmigten Vorhaben formuliert. Gegenwärtig handelt es sich dabei i. allg. um *proof of concept*-Experimente, die mit dem Ziel durchgeführt werden, die prinzipielle Eignung eines aus hES-Zellen differenzierten Zelltyps für bestimmte *In-vitro*-Anwendungen nachzuweisen. So wurde beispielsweise ein Vorhaben genehmigt, in dem der mögliche Einfluss von sog. obesogenen Substanzen auf frühe Prozesse der Fettzellendifferenzierung untersucht werden soll, woraus möglicherweise Rückschlüsse auf Ursachen einer Prädisposition für bestimmte Stoffwechselkrankheiten wie Adipositas gezogen werden könnten. Andere Forschungsvorhaben betreffen beispielsweise die Entwicklung von *In-vitro*-Testsystemen zur Identifizierung neuer Zielstrukturen für pharmakologische Interventionen bei degenerativen Erkrankungen, für die frühzeitige Erkennung möglicher Arzneimittelrisiken auf einen bestimmten Zelltyp oder für den Nachweis embryotoxischer Wirkungen bestimmter Noxen wie beispielsweise ionisierender Strahlung.

Forschungen an hES-Zellen mit dem Ziel der Bereitstellung verbesserter *In-vitro*-Testsysteme rechtfertigen die Verwendung von hES-Zellen auch weiterhin, da beispielsweise für pharmakologisch-toxikologische Forschungen derzeit häufig nur suboptimale Zellkultursysteme zur Verfügung stehen. Humanes Primärmaterial ist vielfach nicht oder nicht in ausreichender Menge und ausreichend reproduzierbarer Qualität verfügbar. Häufig verwendete primäre Zellen nicht-menschlichen Ursprungs können die für menschliche Zellen typischen Wirkungen von Arzneimitteln ggf. nicht oder nicht in ausreichendem Maße abbilden. Gegenwärtig verfügbare menschliche Zellen, beispielsweise immortalisierte (fötale) Zellen oder Tumorzell-Linien, weisen häufig nicht (mehr) die physiologischen Eigenschaften primärer Zellen auf, wie sie für die zuverlässige Testung von (Neben)Wirkungen von Arzneimitteln auf zellulärer Ebene benötigt werden. Die Entwicklung von auf menschlichen Zellen beruhenden *In-vitro*-Testsystemen, mit deren Hilfe humanspezifische Effekte und Nebeneffekte von Substanzen bereits frühzeitig in der Arzneimittelentwicklung aufgedeckt werden können, ist daher von großer Relevanz und kann sich unter Nutzung von hES-Zellen gegebenenfalls erfolgreich gestalten. Ferner wurde in mehreren Vorhaben die Hochrangigkeit der Forschungsziele auch damit begründet, im Zuge des Forschungsvorhabens mit humanen ES-Zellen Grundlagen für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze schaffen zu wollen. Solche Bestrebungen beziehen sich zum Teil weiterhin auch auf die Entwicklung von Strategien zur Bereitstellung von Zellmaterial für künftig vorstellbare regenerative Therapien, wie beispielsweise die Differenzierung von hES-Zellen zu pankreatischen Inseln. In den entsprechenden

Vorhaben wurden aber jeweils auch Zielstellungen im Bereich der Grundlagenforschung formuliert, die für die Zuerkennung von Hochrangigkeit maßgeblich waren.

Dagegen konnte das in einigen Anträgen neben anderen Forschungszielen, die auf die Gewinnung hochrangiger Erkenntnisse entsprechend § 5 Nr. 1 StZG gerichtet waren, explizit formulierte zusätzliche Anliegen, durch Entwicklung neuer *In-vitro*-Testsysteme zur Vermeidung oder Verringerung des Tierverbrauchs in der Forschung beitragen zu wollen, nicht als eigenständiger Hochrangigkeitsgrund für die Verwendung humaner embryonaler Stammzellen anerkannt werden, weil es sich dabei um kein Forschungsziel i. S. d. § 5 Nr. 1 StZG handelt.

Vorklärung der Forschungsfragen

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

Wie bereits in den vergangenen beiden Berichtszeiträumen wurde auch in den Jahren 2010 und 2011 sichtbar, dass sich Darlegungen zur Vorklärung bestimmter Forschungsfragen in einem Teil der Antragsverfahren erübrigen. Vielfach sind prinzipielle Fragestellungen (im Inland oder im Ausland) bereits an hES-Zellen geklärt worden, so dass eine zusätzliche oder vertiefende Voruntersuchung derselben Frage an tierischen Zellen zur Klärung der Plausibilität der Arbeit mit hES-Zellen nicht mehr erforderlich ist. Dies betraf beispielsweise Forschungsvorhaben, in denen die Bedingungen für die Differenzierung von hES-Zellen weiter optimiert werden sollen. Hier war die grundsätzliche Eignung von hES-Zellen für die Differenzierung in den entsprechenden Zelltyp bereits bekannt, und es sollten beispielsweise vertiefende Untersuchungen mit dem Ziel der weiteren Verbesserung der Differenzierungsbedingungen für menschliche Zellen durchgeführt werden. Darlegungen zu einer entsprechenden Vorklärung dieser Detailfragen an tierischen Zellen waren auf Grund der bereits erfolgten grundsätzlichen Vorklärung der Fragestellung an hES-Zellen verzichtbar. Ferner

kann eine detaillierte Untersuchung der für hES-Zellen vorgesehenen Fragestellung an tierischen Zellen, beispielsweise an murinen ES-Zellen, in bestimmten Fällen nicht zur Vorklärung der wissenschaftlichen Fragestellungen beitragen, wenn bereits bekannt ist, dass sich tierische und menschliche ES-Zellen in den jeweils relevanten Aspekten maßgeblich unterscheiden und Ergebnisse aus Untersuchungen an tierischen Zellen in den für das Forschungsvorhaben wesentlichen Punkten nicht auf menschliche Zellen übertragbar sind. Dies betrifft all jene Projekte, in denen die molekularen Grundlagen der Pluripotenz menschlicher ES-Zellen vertiefend untersucht werden sollen, da diese sich von anderen Spezies teils erheblich unterscheiden. Dasselbe gilt für Projekte, in denen Kulturbedingungen für humane pluripotente Stammzellen optimiert oder in denen der Einfluss von Umwelttoxinen auf pluripotente Stammzellen und deren Differenzierung evaluiert werden sollen. Auch für die Differenzierung in bestimmte Zelltypen ist mittlerweile hinlänglich gut bekannt, dass sich beispielsweise an murinen Zellen etablierte Protokolle nicht ohne weiteres auf humane Zellen übertragen lassen und folglich detaillierte Voruntersuchungen mit diesen Zellen zur Vorklärung der jeweiligen konkreten experimentellen Fragestellung an hES-Zellen teilweise nicht sinnvoll wären. Im Übrigen wird auf die entsprechenden Ausführungen im Erfahrungsbericht für die Jahre 2008 und 2009 verwiesen.

Erforderlichkeit der Verwendung von hES-Zellen

Entsprechend § 5 Nr. 2 b) StZG ist durch den Antragsteller darzulegen, dass der mit dem Forschungsvorhaben angestrebte wissenschaftliche Erkenntnisgewinn voraussichtlich nur unter Verwendung humaner embryonaler Stammzellen erreicht werden kann. Hier ist durch die Genehmigungsbehörde jeweils zu prüfen, ob Alternativen zur Nutzung humaner embryonaler Stammzellen bestehen und ob die Forschungsziele auch unter ausschließlicher Nutzung anderer Zellen als hES-Zellen erreicht werden können.

Im Hinblick auf die Erforderlichkeit der Verwendung von hES-Zellen war in den im Berichtszeitraum beantragten Forschungsvorhaben vor allem zu prüfen, ob und inwieweit die Forschungsziele ggf. unter ausschließlicher Nutzung von hiPS-Zellen bei Verzicht auf Nutzung von hES-Zellen zu erreichen sind. Viele Forschungsfragen, die Gegenstand der im Berichtszeitraum bewerteten Vorhaben sind, sind an hiPS-Zellen bislang noch nicht oder nur teilweise untersucht worden. Zur Klärung von Forschungsfragen sollen in einem großen Teil der im Berichtszeitraum genehmigten Projekte sowohl hES- als auch hiPS-Zellen verwendet werden, wobei im Rahmen des Forschungsvorhabens überhaupt erst geklärt werden soll, ob sich hiPS-Zellen bezüglich der jeweils an hES-Zellen zu untersuchenden Eigenschaft tatsächlich wie hES-Zellen verhalten oder ob und wenn ja welche Unterschiede bestehen. Ferner liegen in der Fachliteratur teils uneinheitliche Befunde zur Gleichartigkeit von hES- und hiPS-Zellen vor, beispielsweise hinsichtlich ihrer genetischen Stabilität, ihrer epigenetischen

Eigenschaften oder ihres Differenzierungsvermögens in bestimmte Zelltypen. Nach Auffassung des RKI ist die bloße Vermutung, dass in Blick genommene Forschungsfragen ggf. auch durch Untersuchungen an hiPS-Zellen beantwortet werden könnten, allein nicht hinreichend, um die Verwendung von hES-Zellen in diesem Forschungsvorhaben zu versagen. Vielmehr ist ein positiver Beleg dafür erforderlich, dass bereits nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft eine vergleichbare Eignung anderer Zellen als hES-Zellen, hier also hiPS-Zellen, für die Erreichung der Forschungsziele gegeben ist. Auch für Projekte oder Projektteile, in denen hES-Zellen ausschließlich Referenzmaterial zur Überprüfung von für pluripotente Zellen charakteristische Eigenschaften genutzt werden sollen, ist die Verwendung von hES-Zellen in jedem Fall erforderlich, da es sich bei hES-Zellen um den einzigen Zelltypen des Menschen handelt, der nach derzeitigem Kenntnisstand ohne Einschränkungen als pluripotent angesehen wird.

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

Die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES), die von der Bundesregierung zum 1. Juli 2011 zum vierten Mal berufen wurde, hat die gesetzliche Aufgabe, Anträge auf Einfuhr und Verwendung humaner embryonaler Stammzellen 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 Abs. 4 Nr. 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 19 im Berichtszeitraum genehmigten Anträge sowie der vier Genehmigungserweiterungen für bereits in der Vergangenheit befürwortete Forschungsvorhaben sind, die gesetzlichen Voraussetzungen nach § 5 StZG als erfüllt und die Forschungsvorhaben in diesem Sinne als ethisch vertretbar bewertet. Sie hat die Wahrnehmung ihrer Aufgaben in ihren Tätigkeitsberichten nach § 14 der ZES-Verordnung (ZESV) vom 18. Juli 2002 (BGBl. I S. 2663) für den Zeitraum vom 1. Dezember 2009 bis 30. November 2010 (8. Tätigkeitsbericht der ZES) und für den Zeitraum vom 1. Januar 2011 bis 31. Dezember 2011 (9. Tätigkeitsbericht der ZES) dargestellt. Die Tätigkeitsberichte sind unter anderem auf den Internetseiten des Bundesministeriums für Gesundheit veröffentlicht

http://www.bmg.bund.de/SharedDocs/Standardartikel/DE/AZ/S/Glossar_begriff-Stammzellgesetz.html).

2. Stand der Forschung mit pluripotenten menschlichen Stammzellen

2.1. Einleitung

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

Der erste Erfahrungsbericht der Bundesregierung zur Durchführung des Stammzellgesetzes (Drucksache 15/3639) beinhaltete die Rahmenbedingungen, Ergebnisse und Ausblicke der Grundlagenforschung und mögliche zukünftige Einsatzgebiete von embryonalen und adulten Stammzellen in der modernen Medizin bis einschließlich 2003. Im folgenden zweiten Erfahrungsbericht (Drucksache 16/4050) wurden wichtige seit dem ersten Bericht erzielte Fortschritte, Beispiele noch offener Fragen im Bereich der Forschung bis einschließlich 2005 sowie Perspektiven eines möglichen therapeutischen Einsatzes von embryonalen und adulten Stammzellen beschrieben. Der dritte Erfahrungsbericht befasste sich mit weiteren wissenschaftlichen Erkenntnissen bis einschließlich 2007, wobei die Charakterisierung, Standardisierung und der experimentelle Einsatz humaner embryonaler Stammzellen im Vordergrund standen. Im vierten Erfahrungsbericht wurde die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen ausführlich dargestellt und auf die Unterschiede zwischen hiPS-Zellen und hES-Zellen sowie zwischen verschiedenen hES-Zelllinien eingegangen.

Diese Unterschiede sind nicht nur für die Charakterisierung der jeweiligen pluripotenten Stammzelllinie, sondern vor allem für Untersuchungen von anwendungsorientierten Forschungsfragen weiterhin relevant und wurden, wie unten dargestellt, während des Berichtszeitraums 2010-2011 in vielen Laboren intensiv erforscht.

2.2. Bestand und Kultur der menschlichen embryonalen Stammzelllinien

Es ist weiterhin zu einem Anstieg der Anzahl international eingesetzter hES-Zelllinien gekommen, und es ist davon auszugehen, dass bis zum Ende des Berichtszeitraums mehr als 1000 hES-Zelllinien verfügbar waren. Von diesen sind knapp 700 im europäischen hES-Zell-Register <http://www.hescreg.eu/> aufgeführt. Da sich bisher keine substantiell neuen Bedingungen zur Ableitung der hES-Zellen und zur weiteren Kultivierung der Zellen durchgesetzt haben, ist weiterhin die Fokussierung der internationalen Forschung auf eine überschaubare Anzahl von Standard- bzw. Referenz-hES-Zelllinien zu beobachten. Dieser Trend lässt sich auch für die Forschung an hES-Zellen in Deutschland belegen. So wurden in den 20 weiteren, während des aktuellen Berichtszeitraums genehmigten Anträgen auf Import und Verwendung von hES-Zellen meist sowohl die ersten von James Thomson etablierten hES-Zellen, die so genannten WiCell-Linien, als auch neuere hES-Zelllinien von den Antragstellern für ihre Forschung benannt. Diese neueren Linien wurden nach dem 01.01.2001 aber vor dem 01.05.2007 generiert und sind somit nach der StZG-Novellierung stichtagskonform. Weiterhin werden von diesen neueren hES-Zelllinien diejenigen der Harvard Medical School (USA), der University of Newcastle (UK) oder des Karolinska-Instituts (Stockholm, Schweden) am häufigsten beantragt.

Für die Kultivierung von hES-Zellen und hiPS-Zellen wurden zwischenzeitlich verschiedene Zellkultur-Nährmedien kommerzialisiert und stehen auch für die Kultivierung dieser Zellen unter Xenogen-freien Bedingungen zur Verfügung. Weit verbreitet ist das TeSR-2[®]-Medium (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) beziehungsweise eine weitere von James Thomson veröffentlichte Rezeptur „Essential 8“ (Chen et al., 2011), die zwischenzeitlich über Life Technologies (Carlsbad, USA) vertrieben wird.

2.3. Aktuelle Aspekte zur Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen

hES-Zellen werden weiterhin im Wesentlichen für zwei Anwendungsbereiche eingesetzt. Auch wenn deutlich mehr Kenntnisse zu pluripotenten Zellen aus alternativen Quellen vorhanden sind, als dies noch vor 2 Jahren der Fall war, finden hES-Zellen unverändert in vergleichenden Studien Verwendung, da sie noch immer den „Goldstandard“ für die

Untersuchung von Selbsterneuerung, Pluripotenz und Differenzierbarkeit darstellen (s. auch 2.3.3). Daneben ist die Forschung an hES-Zellen auch weiterhin ein eigenständiges bedeutsames Forschungsgebiet: hES-Zellen werden nicht nur eingesetzt, um die menschliche Embryonalentwicklung und die frühesten Differenzierungs-Schritte während der Anlage der unterschiedlichen Gewebearten weiter zu erforschen. Auch für die Untersuchung mechanistischer Grundlagen der Pluripotenz, die derzeit nur in Ansätzen verstanden sind, ist die Verwendung von hES-Zellen unabdingbar (s. 2.3.3). Betont werden muss, dass hES-Zellen auch zur Etablierung neuer Methoden häufig am besten geeignet sind. So werden viele methodische Entwicklungen zum Gentransfer (s. 2.3.6), zur Massenzellkultur oder zur Optimierung von Differenzierungsprotokollen (s. 2.5.1) gegenwärtig noch überwiegend an hES-Zellen erarbeitet und anschließend auf andere Formen pluripotenter Stammzellen übertragen.

Im Folgenden sind einige wichtige Bereiche der Forschung an hES-Zellen während des Berichtszeitraums 2010-2011 dargestellt.

2.3.1. Erkenntnisse aus dem Vergleich von humanen ES- und Maus-ES-Zellen

Wie bereits im vierten Stammzellbericht dargestellt, unterscheiden sich Maus-ES-Zellen und hES-Zellen signifikant. Während die Eigenschaften von Maus-ES-Zellen näher an denen der Inneren Zellmasse einer Blastozyste (Prä-Implantationsembryo) liegen, entsprechen die hES-Zellen eher Zellen eines Embryos im Epiblast-Stadium (Post-Implantationsembryo). Diese Vergleiche beruhen – außer auf Genexpressions-Profilen und den Wirkungsweisen unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege – insbesondere auf Merkmalen wie der Inaktivierung eines X-Chromosoms, die in weiblichen Zellen erst ab dem Epiblast-Stadium auftritt. Diese Beobachtungen bekräftigen die Hypothese, dass *in vitro* zwei verschiedene Stadien von Pluripotenz vorliegen können: Die sogenannte *naïve Pluripotenz* (entsprechend der Situation in der inneren Zellmasse des Prä-Implantationsembryos) und die *bestimmte Pluripotenz* („primed pluripotency“; analog zum Epiblast-Stadium des Post-Implantationsembryos). Stammzellen im Stadium der *bestimmten Pluripotenz* können *in vivo* und *in vitro* Zelltypen aller drei Keimblätter bilden, aber scheinen in ihrer Fähigkeit zur Bildung von Keimzellen beeinträchtigt zu sein. Zwischenzeitlich sind weitere Arbeiten veröffentlicht, die aufzeigen, wie Stammzellen aus bestehenden Stammzelllinien aus dem Stadium der bestimmten Pluripotenz wieder in das Stadium der *naïven* Pluripotenz überführt werden können. Dabei ist eine Veränderung der Zellkulturbedingungen notwendig. Diese veränderten Bedingungen sind für die Aufrechterhaltung von *naïver Pluripotenz* notwendig, scheinen aber für hES-Zellen alleine nicht ausreichend zu sein. Die *naïve Pluripotenz* in

hES-Zellen konnte nur durch weitere Manipulation, wie etwa durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors Klf4, erreicht werden (Hanna et al., 2010a).

2.3.2. Unterschiede zwischen hES-Zelllinien

Verschiedene vergleichende Analysen häufig verwendeter hES-Zelllinien legen den Schluss nahe, dass sich das Differenzierungsverhalten und andere Eigenschaften der einzelnen Linien in der Zellkulturschale deutlich unterscheiden. Zum Teil scheinen diese Unterschiede in den verschiedenen Verfahren zur Ableitung der hES-Zelllinien begründet zu sein, doch scheinen auch Unterschiede in den Zellkulturbedingungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Insofern ist die fortlaufende Optimierung und Fortentwicklung der Zellkulturbedingungen nach wie vor ein wichtiger Forschungsgegenstand. So hat die Gruppe von James Thomson beispielsweise kürzlich ein weiteres Zellkulturmedium entwickelt, das chemisch vollständig definiert ist und - vor allem durch Verzicht auf Zusatz bestimmter Proteine - besser standardisierbar und kostengünstiger herstellbar sein sollte als bislang verwendete Medien (Chen et al., 2011). Dieses sogenannte E8-Medium erlaubt eine stabile und gut reproduzierbare Kultur von hES- und hiPS-Zellen. Außerdem wurde gezeigt, dass sich Vitronektin (ein rekombinant herstellbares Matrixprotein) besonders gut für die sog. *feeder cell*-freie Kultivierung von humanen pluripotenten Stammzellen eignet, also für eine Kulturmethode, die auf den Einsatz von Nährzellen tierischer oder menschlicher Herkunft verzichtet. Da alle Komponenten dieses Zellkultursystem zudem entsprechend den Standards Guter Medizinischer Praxis (GMP) und Guter Laborpraxis (GLP) herstellbar sind, könnte die beschriebene Kultivierungsmethode auch zur Ableitung und Kultivierung von pluripotenten Stammzellen genutzt werden, deren Derivate künftig für klinische Zwecke verwendet werden sollen.

Neben Optimierungen der Zellkulturmedien-Zusammensetzung sind auch Veränderungen der äußeren Zellkultur-Bedingungen im Berichtszeitraum eingehend untersucht worden. Insbesondere wurde dabei die Frage nach der Auswirkung des Sauerstoffgehaltes untersucht. Die Arbeitsgruppe von Rudolf Jaenisch konnte nicht nur zeigen, dass durch eine Absenkung des Sauerstoffgehalts in der Luft des Zellkultur-Brutschrankes auf unter 5% hES-Zellen aus bestehenden Zelllinien von der *bestimmten* in die *naïve Pluripotenz* überführt werden konnten, sondern auch, dass hES-Zellen mit naiver Pluripotenz aus Embryonen abgeleitet werden können, wenn die hES-Zellen kontinuierlich bei einem Sauerstoffgehalt von weniger als 5% kultiviert werden (Lengner et al., 2010). Die beiden auf diese Weise erzeugten hES-Zelllinien besitzen zwei aktive X-Chromosomen, während Zellen des gleichen Embryos, die nach der ersten Passage der Ausgangszellen mit 20% Sauerstoff kultiviert worden sind, bereits ein X-Chromosom inaktiviert haben. Diese neuen Zelllinien sind wahrscheinlich die ersten beschriebenen originären hES-Zelllinien, die Charakteristika der

naïven Pluripotenz aufweisen. Aufgrund des geltenden Stichtages können diese Stammzelllinien jedoch nicht nach Deutschland importiert werden.

In Analogie zu diesen Experimenten wurde auch versucht, hiPS-Zellen zu generieren, die Charakteristika der *naïven Pluripotenz* zeigen. Bisher sind jedoch nur „*naïve*“ hiPS-Zelllinien beschrieben worden, die allerdings noch auf eine anhaltende Expression der Reprogrammierungsfaktoren angewiesen sind und somit nicht alle Kriterien einer optimal reprogrammierten hiPS-Zelllinie aufweisen (Buecker et al., 2010; Li et al., 2009).

2.3.3. Bestimmende Merkmale pluripotenter Stammzellen

Wie oben dargestellt, wird zwischen zwei Stadien von Pluripotenz unterschieden: der *naïven Pluripotenz* und der *bestimmten Pluripotenz*. Für die Bestimmung der *naïven Pluripotenz* ist bei weiblichen Zellen das Vorhandensein zweier aktiver X-Chromosome das bestimmende Merkmal. Zudem besitzen *naïve* humane pluripotente Stammzellen eine andere Morphologie in der *In-vitro*-Kultur und benötigen andere Zellkulturbedingungen. Eine endgültige Unterscheidung von *naïver* und *bestimmter Pluripotenz* kann jedoch letztlich erst während der Entwicklung eines Organismus getroffen werden, da sich Zellen mit *naïver Pluripotenz* auch zu Keimzellen entwickeln können. Solche Untersuchungen stehen jedoch nur im Tiermodell zur Verfügung. In einer sehr beachteten Arbeit von Stadtfeld et al. wurde als weiteres Unterscheidungsmerkmal eine genomische Region identifiziert (Stadtfeld et al., 2010), deren epigenetische Markierungen Vorhersagen erlauben könnte, ob murine iPS-Zellen in der tetraploiden Embryoaggregation erfolgreich eingesetzt werden können. Gegenwärtig wird untersucht inwieweit die gleiche oder eine andere genomische Region Relevanz für die Charakterisierung humaner pluripotenter Stammzellen haben kann.

2.3.4. Vergleichbarkeit bzw. Unterschiede zwischen ES- und iPS-Zellen

Es ist weiterhin umstritten, wie ähnlich sich ES-Zellen und iPS-Zellen sind, bzw. ob insbesondere hiPS-Zellen tatsächlich nahezu identisch mit hES-Zellen sind.

Für murine iPS-Zellen lässt sich die Pluripotenz über tetraploide Embryoaggregation nachweisen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich aus iPS-Zellen alle Zelltypen bilden können (Hanna et al., 2008; Wu et al., 2011). Wegen entwicklungsbiologischer Unterschiede lassen diese Ergebnisse jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf humane Zellen zu.

Bei humanen Zellen wird aufgrund der Expression von so genannten Pluripotenzmarkern und der nachgewiesenen Differenzierbarkeit in Zellen aller drei Keimblätter davon ausgegangen, dass iPS-Zelllinien pluripotent sind, sofern diese vollständig reprogrammiert wurden (siehe auch Kap. 2.3.1-2.3.3).

Bei manchen als iPS-Zellen bezeichneten Zelllinien scheint die vollständige Entfernung bzw. das Neuanlegen epigenetischer Modifikationen der DNA nicht immer ausreichend zu gelingen, so dass bei diesen Zelllinien keine vollständige Reprogrammierung in das Stadium der Pluripotenz vorzuliegen scheint. Es existieren bisher noch keine Testsysteme, welche mit vertretbarem Aufwand zweifelsfrei zeigen, ob ein bestimmter iPS-Zellklon tatsächlich vollständig reprogrammiert ist. In frühen Passagen von iPS-Zellen liegen zum Teil noch Merkmale der Ursprungszellen vor (Chin et al., 2009; Chin et al., 2010; Ghosh et al., 2010; Marchetto et al., 2009), die jedoch nach bisherigen Erkenntnissen im Laufe der Kultur verlorengehen. Späte Passagen sind diesbezüglich kaum noch von embryonalen Stammzellen zu unterscheiden (Chin et al., 2009; Chin et al., 2010; Guenther et al., 2010).

Eine weitere Schwierigkeit ist durch die Tatsache bedingt, dass der Nachweis der Pluripotenz einer Zelllinie nicht gleichbedeutend mit der Differenzierungseffizienz und der Eignung dieser Linie für unterschiedliche Anwendungen ist. So lässt sich bei ES-Zellen und möglicherweise noch deutlicher bei iPS-Zellen beobachten, dass eine spezifische Zelllinie relativ effizient in bestimmte Zelltypen (z. B. Nervenzellen) differenziert, während andere Zelltypen (z. B. Herzmuskelzellen) kaum gebildet werden. Bei ES-Zellen wird angenommen, dass derartige Unterschiede u. a. schon zum Zeitpunkt der Isolierung in den Einzelzellen der inneren Zellmasse des betreffenden Embryos angelegt waren. Bei iPS-Zellen, bei denen sich der Eindruck vom Vorliegen einer noch größeren Variationsbreite durch jüngere Untersuchungen erhärtet, spielt es außerdem eine Rolle, dass die für die Reprogrammierung in die somatischen Zellen eingeführten Faktoren wieder effizient abgeschaltet werden. Allerdings ist dies nicht immer vollständig der Fall, und verbleibende Reprogrammierungsfaktoren können die spätere Differenzierung behindern (Mauritz et al., 2008; Ramos-Mejia et al., 2012).

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

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

2.3.5. Genetische Veränderungen in embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Die Integrität des Erbgutes einer Zelle ist von großer Bedeutung für den Erhalt der normalen Zellfunktionen. Genetische Anomalitäten kommen natürlicherweise in verschiedenen somatischen Geweben wie der Leber vor (Shuga et al., 2010). Andererseits können genetische Anomalitäten und Mutationen jedoch nicht nur zum Verlust einzelner Zellfunktionen und zum Zelltod führen, sondern auch zu so genannten malignen Entartungen, also zur Bildung von Tumorzellen. So sind ca. 90 % aller Tumore beim Menschen aneuploid, d.h. einzelne Chromosomen sind mehrfach vorhanden oder fehlen ganz (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.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass zelluläre Mechanismen, die dem Erhalt der genomischen Integrität dienen, in pluripotenten Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zelllinien besonders stark ausgebildet sind. Solche Studien belegen, dass der zelluläre Apparat, der für die Reparatur der DNS zuständig ist, ebenso wie Mechanismen zur Inaktivierung oder Ausschleusung erbgutschädigender Substanzen in humanen ES-Zellen besonders aktiv sind (Maynard et al., 2008). Im Vergleich zu vielen adulten Zellen sollte das Risiko einer malignen Entartung bei pluripotenten Stammzellen dementsprechend relativ gering sein.

Andererseits wird in einer Reihe von kürzlich publizierten Studien über die Entstehung chromosomaler Anomalitäten in Langzeitkulturen von embryonalen Stammzellen und iPSC-Zellen berichtet (Lefort et al., 2008; Lefort et al., 2009; Narva et al., 2010; Spits et al., 2008). Für embryonale Stammzellen geht man davon aus, dass derartige Anomalitäten während der Zeit in der Zellkultur entstehen. Ursache hierfür könnten Wachstumsvorteile von Stammzellen sein, die Mutationen und Anomalitäten (u.a. genetische Anomalitäten) aufweisen, die die Kontrolle der Zellvermehrung beeinträchtigen. Diese Zellen besitzen einen Vorteil gegenüber „normalen“ Stammzellen und können sich daher in Kultur durchsetzen. Darüber hinaus gibt es Befunde, die darauf hindeuten, dass es in ES-Zellen, anders als in somatischen Zellen, eine ungewöhnliche Toleranz gegenüber einem mehrfachen Chromosomensatz (Polyploidie), hervorgerufen durch unvollständige Zellteilungen, gibt (30). Die am häufigsten auftretenden Veränderungen in pluripotenten Stammzellen betreffen das Auftreten zusätzlicher Kopien der Chromosomen 12 und 17 sowie, etwas weniger häufig, des X-Chromosoms. Diese Veränderungen sind auch häufig in Keimbahntumoren anzutreffen (Lefort et al., 2009; Pera, 2004; Spits et al., 2008). Das deutet darauf hin, dass Bereiche dieser Chromosomen kritisch für Zellproliferation und Tumorentstehung sind.

Desweiteren wurden aber auch Trisomien der Chromosomen 1, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 20 und 22 in hES-Zellen beobachtet (Baker et al., 2007; Narva et al., 2010; Spits et al., 2008).

Das Problem des Auftretens genetischer Anomalitäten wird insbesondere bei der Herstellung großer Zellmengen, z. B. für das so genannte „Tissue Engineering“, relevant. Entsprechende Techniken zur Minimierung derartiger Kultur-bedingter Anomalitäten bzw. Protokolle zur strengen Qualitätskontrolle müssten daher entwickelt werden.

In iPS-Zellen spielen beim Auftreten genetischer Anomalitäten anscheinend auch noch andere Mechanismen eine Rolle (Boulting et al., 2011; Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011; Pasi et al., 2011). Es wird vermutet, dass die Frequenz genetischer Veränderungen hier höher ist als in ES-Zellen (Ben-David and Benvenisty, 2011). Einige kürzlich publizierte Studien deuten darauf hin, dass in iPS-Zellen nachgewiesene genetische Veränderungen entweder schon in der somatischen Ursprungszelle vorhanden waren oder auch durch den Reprogrammierungsprozess entstanden sind (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011). Möglicherweise begünstigt schon der Reprogrammierungsprozess selbst mit den dabei ablaufenden und bisher weitgehend unverstandenen epigenetischen Prozessen die Anreicherung seltener abnormaler Ursprungszellen. Auch kann es bisher nicht ausgeschlossen werden, dass während der Reprogrammierung vermehrt neue Mutationen entstehen. In diesem Zusammenhang erscheint es problematisch, dass Maßnahmen, die die Reprogrammierungseffizienz erhöhen, teilweise gleichzeitig auch in die DNA-Reparaturmechanismen der Zelle eingreifen (Marion et al., 2009), (Banito et al., 2009). Zwangsläufig muss also die weitere Optimierung von Reprogrammierungsprotokollen nicht nur auf höhere Effizienz, kürzere Reprogrammierungszeit und vollständige Reprogrammierung, sondern auch auf die Vermeidung genetischer Schäden und epigenetischer Anomalitäten gerichtet sein (Barrilleaux and Knoepfler, 2011).

2.3.6. Verfahren zur gezielten gentechnischen Modifikation embryonaler Stammzellen

Das Einbringen fremder Gensequenzen in hES-Zellen ist für unterschiedliche Fragestellungen und Anwendungen von wissenschaftlicher Bedeutung. So ist die stabile Integration von bestimmten Genabschnitten in das Stammzellgenom entscheidend für die Klärung grundlegender entwicklungsbiologischer Fragestellungen. Zum Beispiel kann durch gezieltes An- und Ausschalten („gain of function“, „loss of function“) bestimmter zu testender Gene die Rolle dieser Gene während der Embryonalentwicklung analysiert werden. Darüber hinaus sind hES-Zellen mit verschiedenen Genmarkern auch wichtige Hilfsmittel für die Entwicklung pharmakologischer und toxikologischer Testsysteme. Weiterhin könnten gezielte genetische Modifikationen zukünftig auch für potentielle klinische Anwendungen von Stammzellderivaten von sicherheitsrelevantem Nutzen sein. So werden gegenwärtig

Verfahren entwickelt, um einmal transplantierte Zellen nicht-invasiv im Körper nachweisen zu können, oder durch Aktivierung eines künstlichen Stoffwechsel-Systems absterben zu lassen. Letzteres könnte beispielsweise zum Einsatz kommen, falls eine unerwünschte Entstehung von Tumoren beobachtet wird oder transplantierte Zellen bei einer späteren Fehlfunktion wieder entfernt werden sollen.

Die klassischen Gentransfer-Methoden führen zu einer zufälligen Integration des Transgens in das Genom der Wirtszelle (vgl. auch Vierter Stammzellbericht). Dies birgt zum einen den Nachteil, dass die Aktivität des Transgens stark vom Integrationsort abhängig ist, und zum anderen das Risiko, dass das eingefügte Transgen zur Aktivierung benachbarter Krebsgene (Onkogene) und damit zur Entstehung von Tumorzellen führen kann. In jüngerer Vergangenheit konnten diesbezüglich Lösungsansätze entwickelt und in hES- und hiPS-Zellen umgesetzt werden.

Alternativ zu klassischen gentechnischen Modifikationen sind relativ junge Technologien relevant geworden, bei denen ausgewählte Proteine dauerhaft in der Zelle erhalten werden können, ohne das Erbgut der Zielzelle zu modifizieren. Von Bedeutung sind hier insbesondere Verfahren auf der Basis von RNA-Viren (Griesenbach et al., 2005), Einschleusung von künstlichen mRNAs (Tavernier et al., 2011) oder sogenannten microRNAs (Fiedler et al., 2012), oder aber das direkte Einbringen von Proteinen, die sogenannte Proteintransduktion (Noguchi et al., 2010). Eine vorübergehende Herunterregulation („knock down“) spezifischer Genprodukte in pluripotenten Stammzellen ist generell auch über verschiedene Verfahren der RNA-Interferenz (RNAi) möglich (Davidson and McCray, 2011).

Besonders im Bereich der iPS-Zellen sind Technologien von Bedeutung, die es erlauben, ins Genom der Zielzellen eingebrachte Gene wieder zu entfernen. So erlauben z. B. bestimmte Proteine (Wirth et al., 2007) das nachträgliche Herausschneiden des eingeführten Transgens über spezifische DNA-Abschnitte, wobei allerdings Reste der eingeführten Gensequenzen an der Integrationsstelle verbleiben.

Obgleich noch ineffizient, war schon im letzten Berichtszeitraum das gezielte Einbringen des Transgens an sogenannten „*safe harbor sites*“ erreicht worden, also an bestimmten Orte des humanen Genoms, die als unbedenklich bekannt sind (Irion et al., 2007). Neben klassischen Methoden des „*gene targeting*“, also der gezielten Integration externer DNA-Sequenzen in eine bestimmte Zielsequenz des Wirtsgenoms, wurden mittlerweile auch andere Methoden zum zielgerichteten Einbringen fremder DNA-Sequenzen an bestimmte Positionen des Genoms entwickelt (Khan et al., 2010) bzw. für die Korrektur patientenspezifischer Mutationen verwendet (Howden et al., 2011; Liu et al., 2011).

Unterdessen zeichnet sich ab, dass mit Hilfe bestimmter Enzyme, den sogenannten Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) (Cathomen and Joung, 2008), spezifisch an ausgewählten

Stellen der DNA Brüche erzeugt werden können. Hierdurch ist eine gezielte und effiziente Modifikationen von humanen pluripotenten Stammzellen möglich (Hockemeyer et al., 2009; Zou et al., 2009). Auch scheint diese Methode geeignet, um krankheitsspezifische Mutationen in iPS-Zellen, die aus Patienten mit verschiedenen genetischen Erkrankungen wie der Sichelzellanämie (Sebastiano et al., 2011; Zou et al., 2011) isoliert wurden, zu korrigieren. Daneben ist es auch möglich, in pluripotenten Stammzellen gezielt krankheitsspezifische Mutationen für *In-vitro-Krankheitsmodelle* zu erzeugen (Soldner et al., 2011). Die Effizienz der ZFN-basierten Genmodifikation scheint dabei generell in hES- und iPS-Zellen vergleichbar zu sein.

Größter Nachteil der ZFN-Technologie ist die sehr aufwendige Entwicklung zielspezifischer ZFN, die nur in wenigen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen zu leisten ist. Allerdings existieren mittlerweile auch kommerzielle Anbieter für spezifische ZFN.

Eine andere Gruppe von Enzymen, die einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen wie die ZFN, sind die sogenannten TALE-Nukleasen (*transcription activator-like effector*). Bei den TALE-Nukleasen kann die DNA-Bindungsdomäne relativ einfach an eine bestimmte DNA-Sequenz angepasst werden, so dass TALE-Nukleasen grundsätzlich geeignet sind, um die DNA an einer beliebigen Stelle zu trennen. Die TALE-Nukleasen könnten hierdurch in Zukunft eine Alternative zu den ZFN darstellen (Clark et al., 2011; Hockemeyer et al., 2011).

2.4. Erschließung neuer Quellen menschlicher Stammzellen

Die in den vorangegangenen Erfahrungsberichten bereits beschriebenen weltweiten Anstrengungen, alternative Quellen zur Gewinnung humaner pluripotenter Stammzellen zu erschließen, wurden im Berichtszeitraum weiter geführt. Hierbei werden iPS-Zellen sicherlich als die meistversprechende Alternative angesehen.

2.4.1. Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus Blastomer-Biopsien

Wie im vierten Stammzellbericht ausgeführt wurde, haben Verfahren zur Gewinnung von hES-Zellen aus Blastomer-Biopsien bisher keine weite Verbreitung gefunden. Die Firma Advanced Cell Technology (ACT) hat unter Leitung von Robert Lanza allerdings zur Generierung von hES-Zellen für zukünftige klinische Anwendungen neue hES-Zelllinien mit dem patentierten Verfahren der Blastomer-Biopsie (Chung et al., 2008) abgeleitet. Bei diesem Verfahren werden dem Embryo in einem früheren Stadium, dem sogenannten Blastomerstadium (8-Zellstadium), Zellen entnommen, aus denen sich Stammzelllinien gewinnen lassen. Dieses Verfahren könnte im Rahmen einer Präimplantationsdiagnostik eingesetzt werden, da bei der Präimplantationsdiagnostik dem Embryo Zellen zur Diagnose

entnommen werden müssen. Der Embryo bleibt von der Zellentnahme unbeeinträchtigt und zeigt im Allgemeinen eine ungestörte Entwicklung. Die Firma ACT verwendete die mit diesem Verfahren gewonnenen Zellen auch zur Vorbereitung einer klinischen Studie zur Behandlung der Stargardt'schen Makula-Degeneration mittels aus hES-Zellen abgeleiteten retinalen Pigmentepithel-Zellen (Lu et al., 2009).

Da die Zellen des Embryos im Blastomerstadium möglicherweise totipotent sind und eine Entnahme solcher Zellen einen Verstoß gegen das Embryonenschutzgesetz darstellen würde, wird das Verfahren in Deutschland nicht angewendet.

2.4.2. Kerntransfer-Verfahren

Das im Ausland durchgeführte Verfahren des Transfers eines Zellkerns in eine „entkernte“ Eizelle (*somatic cell nuclear transfer, SCNT*) hat im Berichtszeitraum keine weitere Verbreitung erfahren. Im Gegenteil erscheint das im Ausland durchgeführte Verfahren des Kerntransfers für humane Eizellen sehr ineffizient und kann mit den gegenwärtigen Methoden nur schwerlich als Routinemethode eingesetzt werden. Kürzlich wurde ein im Ausland entwickeltes abgewandeltes Verfahren publiziert, bei dem der Kerntransfer nicht in eine „entkernte“ sondern in eine unbehandelte Eizelle in der Metaphase II durchgeführt wurde und somit Embryonen mit einem dreifachen (triploiden) Chromosomensatz erzeugt wurden. Aus diesen Embryonen ließen sich dann hES-Zellen ableiten, wobei neben dem Spenderzell-Genom auch die Erbinformation der haploiden Eizelle vorhanden war (Noggle et al., 2011). Inwieweit solchermaßen generierte Zellen ein Potential für die Forschung oder die klinische Anwendung haben, ist gegenwärtig nicht abschließend geklärt.

2.4.3. Gewinnung von Stammzellen ausgehend von Keimzellen und deren Vorläuferzellen

Arbeiten mit so genannten EG-Zellen (*embryonic germ cells*), die als Zelllinien von primordialen Keimzellen abgeleitet wurden, haben in letzter Zeit kaum weitere Verbreitung gefunden. Die Forschungsarbeiten zur Ableitung pluripotenter Stammzellen aus adulten Keimzellen erfahren dahingegen weiterhin ein reges Interesse. Die in jüngerer Vergangenheit beschriebene erfolgreiche Umwandlung humaner spermatogoniale Stammzellen in pluripotente Stammzellen (Conrad et al., 2008; Gallicano et al., 2009), konnte von anderen Gruppen jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil legen zwei Publikationen nahe, dass die ursprünglich als „pluripotent“ beschriebenen Zellen eher einer bereits differenzierten Zellpopulation entsprachen (Ko et al., 2010; Ko et al., 2011).

Parthenogenetisch aktivierte Eizellen entwickeln sich *in vitro* nur bis zum Blastozystenstadium. Aus der inneren Zellmasse dieser Blastozyste können dann

parthenogenetische embryonale Stammzellen (pES-Zellen) generiert werden (de Fried et al., 2008). pES-Zellen besitzen zwei Allele mit maternalem Imprinting, also den epigenetischen Markierungen des mütterlichen Chromosomensatzes, und besitzen somit keine Allele mit paternalem Imprinting. Noch ist unklar, inwieweit diese entwicklungsbiologische Besonderheit zu Anomalien in der Zellkultur beiträgt (Brevini et al., 2009). Damit verbunden ist die Frage, ob therapeutisch einsetzbare pES-Zellen generiert werden können. Andere Arbeiten weisen dahingegen auf eine sehr hohe Ähnlichkeit von humanen pES-Zellen und hES-Zellen hin und finden nennenswerte funktionelle Unterschiede lediglich in der Expression von Genen mit maternalem bzw. paternalem Imprinting (Harness et al., 2011).

2.4.4. Fötale Stammzellen

Die Verwendung fötaler Stammzellen ist im aktuellen Berichtszeitraum in der Forschung nicht sonderlich in den Vordergrund gerückt. Es gibt nur wenige experimentelle Arbeiten, die beispielsweise humane fötale Blutzellen zur Behandlung genetisch bedingter Knochendefekte im Mausmodell eingesetzt haben (Vanleene et al., 2011).

Bezüglich der im letzten Stammzellbericht benannten klinischen Studien mit fötalen neuronalen Stammzellen führt beispielsweise die University of Glasgow in Zusammenarbeit mit der Firma ReNeuron Ltd. eine klinische Studie mit fötalen Stammzellen zur Behandlung von Schlaganfällen durch (Sinden and Muir, 2012). Detaillierte Zwischenergebnisse wurden bisher nicht veröffentlicht.

2.4.5. Fortschritte in der Reprogrammierung von Körperzellen

Wie bereits im vierten Stammzellbericht dargestellt, wurde die Reprogrammierung (Umwandlung) adulter humaner Körperzellen in pluripotente, ES-Zellartige Stammzellen erstmals 2006 und 2007 von S. Yamanaka an Hautzellen gezeigt. Anfangs war die zugrundeliegende Technologie, bezogen auf die Ausbeute an Stammzellen, ineffizient und lediglich auf Hautzellen anwendbar. Die damals verwendete Technologie war mit dem Risiko behaftet, dass bei der Reprogrammierung im Falle einer klinischen Anwendung Tumorzellen entstehen könnten. Dies liegt zum einen daran, dass ins Genom integrierende Viren (so genannte γ -Retroviren oder Lentiviren) als Transportvehikel für die zur Reprogrammierung benötigten Gene verwendet werden (siehe auch Kap. 2.3.6), wodurch unvorhersehbare Veränderungen im Genom der Zielzelle und, damit verbunden, in deren Genaktivität entstehen können. Zum anderen stehen auch die zur Reprogrammierung verwendeten Faktoren selbst im Verdacht, krebserregend zu sein.

In der Zwischenzeit scheint klar, dass sich die große Mehrheit, vermutlich sogar alle Körperzellen, reprogrammieren lassen. Deutliche Unterschiede bestehen lediglich in der Effizienz, mit der sich die einzelnen Zelltypen reprogrammieren lassen. Es ist davon auszugehen, dass im Hinblick auf zukünftige Anwendungen insbesondere solche Zelltypen

von Bedeutung sein werden, die sich nicht-invasiv oder minimal-invasiv gewinnen lassen, wie etwa Haarzellen oder Blutzellen (Aasen et al., 2008; Giorgetti et al., 2009; Haase et al., 2009).

Im aktuellen Berichtszeitraum hat sich die Reprogrammierung unterschiedlichster Körperzellen mit Hilfe von Retro- oder Lentiviren international in vielen Laboren zu einer Routinetechnologie entwickelt, die mit ausreichend hoher Effizienz eingesetzt wird. Mittlerweile stehen außerdem eine Reihe unterschiedlicher Technologien zur Verfügung bzw. werden z. T. auch schon kommerziell angeboten, bei denen keine sich in das Genom der Wirtszelle integrierenden und damit potentiell Tumor-auslösenden (onkogenen) Vektoren für das Einbringen der Reprogrammierungsfaktoren mehr verwendet werden müssen (Gonzalez et al., 2011). Hierbei sind insbesondere die auch kommerziell angebotenen und auf Boten-RNA- bzw. Sendai-Viren basierenden Reprogrammierungsmethoden hervorzuheben.

Im experimentellen Bereich, in dem im Gegensatz zur potentiellen klinischen Anwendung das von der genomischen Integration der Reprogrammierungsvektoren ausgehende Risiko in der Regel vernachlässigbar ist, werden wegen Ihrer hohen Effizienz weiterhin häufig sich integrierende Viren als Transportvehikel verwendet.

Im Berichtszeitraum konnten in Deutschland zwar zunehmend Arbeiten mit humanen iPS-Zellen initiiert, bisher jedoch nur von einer kleinen Zahl von Arbeitsgruppen erfolgreich und hochrangig publiziert werden. Ursache hierfür ist die nur in wenigen Arbeitsgruppen vorhandene notwendige Expertise zur Reprogrammierung humaner Körperzellen.

Weiterhin konnten eine Reihe weiterer Faktoren und Chemikalien identifiziert werden, welche eine Reprogrammierung fördern. Dazu zählen insbesondere weitere Proteine und verschiedene mikroRNAs (Gonzalez et al., 2011; Hanna et al., 2010b).

Nach derzeitigen Vorstellungen lässt sich der Vorgang der Reprogrammierung zu pluripotenten Stammzellen grundsätzlich in drei Phasen unterteilen: In der ersten Phase der Reprogrammierung sind die Induktion der Zellproliferation sowie das Abschalten einer Reihe von Genen der Ausgangszelle entscheidend. Diese Vorgänge können relativ effizient in einem relativ großen Teil der Zellen eines Reprogrammierungsansatzes initiiert werden.

In einer zweiten Phase der Reprogrammierung kommt es, zumindest im Falle der Verwendung von Fibroblasten als Ausgangszellen, zu einer Umwandlung in epithelartige Zellen. Diese Umwandlung kann allerdings in der Regel nur noch in einem geringen Teil der Ausgangszellen erreicht werden. Interessanterweise scheinen z. B. Keratinozyten oder Hepatozyten, die schon epithelartige Charakteristika besitzen, mit höherer Effizienz reprogrammierbar zu sein. Die ersten beiden Reprogrammierungsphasen scheinen insgesamt reversibel zu sein.

Wiederum nur ein Bruchteil derjenigen Zellen, die die zweite Reprogrammierungsphase erfolgreich durchlaufen haben, tritt anschließend in die letzte Reprogrammierungsphase ein.

Die bisher dicht gepackte Erbsubstanz im Zellkern wird im Bereich von bestimmten Pluripotenzgenen gelockert, so dass es zur Aktivierung der Gene für verschiedene mit Pluripotenz assoziierter Faktoren (einschließlich OCT4, SOX2, REX1 und NANOG) kommt. Auch nehmen die Zellen, unter dem Mikroskop betrachtet, ES-Zell-artige Eigenschaften an und zeigen insgesamt alle typischen Merkmale pluripotenter Stammzellen.

Eine kürzlich in *Nature Reviews Genetics* publizierte Übersichtsarbeit von Plath et al. bietet zu diesem Thema viele anschauliche Detailinformationen (Plath and Lowry, 2011).

Unverändert nicht geklärt scheint die Frage, ob iPS-Zellen aus Patienten fortgeschrittenen Alters die gleiche Qualität aufweisen wie iPS-Zellen, die aus jungen Zellquellen, wie Nabelschnurblut, generiert wurden. Basierend auf der Beobachtung, dass sich während des Lebens Mutationen im Erbgut von Körperzellen anhäufen, gilt es als wahrscheinlich, dass in iPS-Zellen älterer Spender eine erhöhte Zahl von Mutationen vorliegen dürfte. Diese Anhäufung von Mutationen könnte zu einer erhöhten Entartungsfrequenz bzw. zu einer verminderten Funktionalität von solchen iPS-Zellen führen. Zu dieser Fragestellung ist mittlerweile eine ganze Reihe von Studien in Arbeit.

Aufgrund der noch vielen offenen Fragen zu Mechanismen und Optimierung der Reprogrammierung bzw. zur Qualität und Verwendbarkeit alternativer Zellquellen wird es, wie bereits beschrieben, weiterhin eher zu einer Zunahme an Forschungsprojekten mit hES-Zellen kommen, da diese Zellen häufig in Forschungsprojekten als Referenzmaterial benötigt werden.

2.4.6. Transdifferenzierung

Der Begriff der Transdifferenzierung bezeichnet die Differenzierung von Zellen, die bereits auf eine bestimmte Gewebeart festgelegt sind, in andere Zelltypen verschiedener Gewebe, ohne dass dabei das Zwischenstadium pluripotenter Zellen durchlaufen wird. Während der Embryonalentwicklung kommen solche Transdifferenzierungsvorgänge natürlicherweise vor. Auch kann es in einzelnen Fällen bei Erwachsenen zu einer Transdifferenzierung kommen, wenn es krankheitsbedingt zur Bildung „ortsfremden“ Gewebes kommt. Wie schon im vorhergehenden Bericht erläutert, konnten viele frühere Berichte zur Transdifferenzierung adulter Stamm- und Vorläuferzellen experimentell nicht bestätigt werden (Gruh and Martin, 2009). Inspiriert durch die Erkenntnisse zur Herstellung von iPS-Zellen konnte unterdessen jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass sich Fibroblasten, und vermutlich auch andere Zelltypen, transdifferenzieren lassen. Erste Berichte hatten bereits 2008 bzw. 2009 gezeigt, dass *in vivo* (also im lebenden Organismus) die Umwandlung fötaler Zellen in Herzmuskelzellen (Takeuchi and Bruneau, 2009) und in adulten Mäusen die Generierung von Insulin-produzierenden Zellen aus anderen Zelltypen der Bauchspeicheldrüse möglich ist (Zhou et al., 2008).

In Ergänzung zu diesen *In-vivo*-Experimenten gelang der Arbeitsgruppe von M. Wernig in Stanford darüber hinaus die effiziente *In-vitro*-Transdifferenzierung von Maus-Bindegewebszellen in Neuronen (Vierbuchen et al., 2010). Außerdem konnte mittlerweile auch die *In-vivo*-Reprogrammierung von Fibroblasten zu Herzmuskelzellen gezeigt werden (Qian et al., 2012; Song et al., 2012)).

Basierend auf diesen vielversprechenden Erkenntnissen ist zu erwarten, dass sich die Transdifferenzierung als wachsender Forschungsbereich etablieren wird.

Unklar ist allerdings immer noch, inwieweit durch Transdifferenzierung erzeugte Zellen therapeutische Anwendung finden können oder ob die Erzeugung von pluripotenten Zellen und die anschließende gezielte Differenzierung zielführender sind. Als Vorteil der direkten Transdifferenzierung kann die Tatsache angeführt werden, dass nach Transplantation transdifferenzierter Zellen keine Bildung von sogenannten Teratomen zu erwarten ist, da kein Risiko der Übertragung noch im Transplantat enthaltener, undifferenzierter pluripotenter Zellen besteht. Im Hinblick auf die für die meisten Zelltherapien benötigten sehr großen Zellmengen, wäre die Verwendung von Zellen, die aus gut vermehrbaren pluripotenten Stammzellen hergestellt werden können, jedoch möglicherweise die bessere Option: pluripotente Stammzellen weisen ein praktisch unbegrenztes Vermehrungspotential auf, so dass es prinzipiell möglich erscheint, die für Zelltherapien benötigten großen Zellmengen herzustellen. Für direkt über Transdifferenzierung hergestellte Zellen, wie z. B. Herzmuskelzellen, ist dies nicht möglich, da diese kaum noch vermehrbar sind.

Besonders problematisch erscheint die Tatsache, dass eine nennenswerte Effizienz der direkten Umwandlung von Fibroblasten über Transdifferenzierung bisher nur über sich in das Genom der Zellen integrierende virale Vektoren erzielt werden konnte. Hierbei muss allerdings das Risiko der potentiellen Tumorbildung infolge der genomischen Integration fremder DNA in das Genom der Zielzellen des Gentransfers berücksichtigt werden, das bisher noch nicht untersucht worden ist. Ob derartige Methoden jemals effizient und sicher durchgeführt werden können, bleibt deshalb abzuwarten.

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

2.5.1. Weiterentwicklung von Differenzierungsprotokollen humaner pluripotenter Stammzellen

Im Vergleich zum vierten Stammzellbericht gab es in den unterschiedlichen Gebieten der Forschung zur Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen bemerkenswerte Detailfortschritte, welche zu einer spezifischeren und effizienteren Differenzierung führten. Hervorzuheben sind hier vor allem Strategien, die es zum Ziel haben, die Induktion unterschiedlicher Gewebe- und Zelltypen über spezifische Faktoren, wie sie im Embryo

stattfindet, auch an Stammzellen in der Kulturschale nachzuvollziehen. Weiterhin sind vor allem Anstrengungen hervorzuheben, bekannte Differenzierungsfaktoren, in der Regel Proteine, durch kostengünstigere chemische Substanzen zu ersetzen.

Inspiziert durch die von S. Yamanaka 2006 gemachten Entdeckungen im Bereich der Reprogrammierung, wurde die „molekulare Programmierung“ als Differenzierungsmethode entdeckt. Dabei werden Kombinationen von verschiedenen Proteinen mit Einfluss auf die Genaktivität künstlich in die Zellen eingebracht, was dann zur spezifischen Differenzierung in verschiedene Zelltypen führen kann (vgl. Kapitel 2.4.6 „Transdifferenzierung“).

Generell werden die bei der Differenzierung entstehenden Zelltypen nach Keimblättern, also den Zellschichten des Embryos, aus denen sich später die verschiedenen Gewebe entwickeln, eingeteilt. Aus dem sogenannten Ektoderm entstehen dabei u. a. Haut und Nervensystem, aus dem Mesoderm werden z. B. Knochen, Muskulatur (einschließlich Herz), Blutzellen und Blutgefäße gebildet und aus dem Entoderm entwickeln sich u. a. der Verdauungstrakt, die Leber und die Lunge.

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

Ein wichtiges Forschungsgebiet stellt weiterhin die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu neuroektodermalen Zellen dar. Auch wenn embryonale Stammzellen meist vergleichsweise gut in neuroektodermale Zelltypen differenzieren, müssen die bestehenden Differenzierungsprotokolle für Neuronen (Nervenzellen) und Begleitzellen weiterhin optimiert werden, damit die abgeleiteten Zellen als Ausgangsmaterial für mögliche Therapien in Betracht kommen können. Es wurden weiterhin essentielle Signalwege identifiziert, welche eine hocheffiziente Differenzierung von hES-Zellen in neurale Zelltypen erlauben (Chambers et al., 2009; Denham and Dottori, 2009). Auch die gezielte Herstellung bestimmter neuraler Subzelltypen ist mittlerweile möglich (Cho et al., 2008; Hu et al., 2009; Hu and Zhang, 2009).

Differenzierung von hES-Zellen in mesodermale Zellen

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeiten mit hES-Zellen ist unverändert die Etablierung und Optimierung von Protokollen zur Generierung von mesodermalen Zelltypen. Von klinischem Interesse sind hier vor allem Zellen der Blutgefäße (Kane et al., 2011), Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), welche unter anderem verwendet werden könnten, um nach einem Herzinfarkt die Funktionalität des Herzmuskels wieder herzustellen, sowie Knochen- und Knorpelzellen. Basierend auf dem zeitlich abgestimmten Einsatz von Differenzierungsfaktoren konnten auch Zellkulturprotokolle entwickelt werden, die eine effiziente Differenzierung von hES-Zellen in Zellen des Herzens erlauben (Burrige et al., 2011; Kattman et al., 2011). Leider sind derartige Protokolle immer noch nicht wirklich robust

und müssen in jedem Labor und für jede Zelllinie neu etabliert werden, Auch unterliegt die Qualität der Ergebnisse immer noch großen Schwankungen.

Erwähnenswert sind darüber hinaus Fortschritte, welche in Bezug auf gentechnische und nicht-genetische Methoden zur Anreicherung, bzw. Konzentrierung Stammzell-abgeleiteter Kardiomyozyten erzielt worden sind (Dubois et al., 2011). Über Färbung der Zellen mit einem spezifischen Antikörper lassen sich differenzierte Herzmuskelzellen aus Zellkulturen mit Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien aussortieren und damit anreichern.

Differenzierung von hES-Zellen in endodermale Zellen

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung von Lungenerkrankungen steht auch die Herstellung von Zelltypen der Lunge aus embryonalen Stammzellen zunehmend im Fokus der Forschung. Dieses Forschungsgebiet war in der Vergangenheit stark unterrepräsentiert. Die Differenzierung zu Zellen der Lunge gestaltet sich außerdem schwierig und relativ ineffizient. Bis 2011 beschäftigte sich die Mehrzahl der bisher publizierten Studien noch mit Zellen der Maus. Nach ersten, noch umstrittenen Publikationen über aus hES-Zellen abgeleiteten Lungen-Zellen (Samadikuchaksaraei et al., 2006; Wang et al., 2007; Wang et al., 2010), erschien 2011 der erste überzeugende Bericht zur gezielten Differenzierung von hES- und iPS-Zellen zu Lungenvorläuferzellen (Green et al., 2011).

In den vergangenen Stammzellberichten wurde bereits ausführlich auf die Strategien zur Differenzierung von hES-Zellen in Leber- und Pankreaszellen eingegangen. Neuerdings wird zudem versucht, durch Überexpression von Leber-spezifischen Transkriptionsfaktoren eine verbesserte Differenzierung zu erreichen (Inamura et al., 2011).

In einer weiteren Arbeit zur Leberzellendifferenzierung von hiPS- und hES-Zellen wurden mehrere Schlüsselfaktoren identifiziert, deren gezielte Expression einen reiferen Differenzierungs-Phänotypen induzieren könnte (Jozefczuk et al., 2011).

Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen in Keimzellen

Die Herstellung befruchtungsfähiger Keimzellen aus humanen pluripotenten Stammzellen konnte im Berichtszeitraum nicht zweifelsfrei beschrieben werden. Verschiedene Gruppen arbeiten jedoch darauf hin, Ursachen für Fertilitäts-Störungen, die mit Entwicklungsanomalien von Keimzellen in Verbindung stehen, an *in vitro* differenzierten Keimzellen zu untersuchen. Die Generierung von haploiden Vorläuferkeimzellen, also Zellen mit nur einem einfachen Chromosomensatz, gelingt mittlerweile nicht nur mit hES-Zellen sondern auch mit humanen iPS-Zellen (Panula et al., 2011) verlässlich. Eine weitere Arbeit belegt dies und konnte zeigen, dass die Differenzierung von hiPS-Zellen sowohl in weibliche als auch in männliche haploide Keimzellen gleichmäßig effizient möglich ist (Eguizabal et al., 2011).

2.5.2. Krankheitsmodelle unter Verwendung von iPS-Zellen

Während es weiterhin unwahrscheinlich ist, dass iPS-basierte zelltherapeutische Ansätze schon in den nächsten Jahren auf breiterer Basis in der Klinik Einzug halten werden, zeichnet sich schon jetzt ein immenser klinischer Nutzen der iPS-Zellen insbesondere für eine Vielzahl genetischer Erkrankungen ab. Die Generierung und Verwendung von krankheitsspezifischen iPS-Zellen könnte zukünftig die Darstellung komplexer Erkrankungen *in vitro* erlauben und damit große Bedeutung für die Aufklärung von Krankheitsmechanismen und für die Entwicklung neuer Therapien erlangen (Grskovic et al., 2011). Vergleichbare Arbeiten werden im Ausland auch mit hES-Zellen durchgeführt.

Bis Ende 2011 wurden bereits eine Vielzahl von solchen patientenspezifischen iPS-Linien mit mindestens 45 unterschiedlichen Erkrankungen wie z. B. alpha-1-Antitrypsindefizienz (Somers et al., 2010), Mukoviszidose (Somers et al., 2010), Parkinsonscher Erkrankung, (Hargus et al., 2010) oder dem so genannten Long-QT-Syndrom (Moretti et al., 2010) generiert und charakterisiert. Eine umfassende Übersicht zu bisher generierten krankheitsspezifischen iPS-Zellen gibt ein 2011 erschienener Übersichtsartikel von Grskovic et al. (Grskovic et al., 2011).

Es konnte auch gezeigt werden, dass *in vitro* differenzierte Derivate dieser Zellen tatsächlich die aus den betreffenden Patienten bekannten Krankheitsmerkmale zeigen. Beispielsweise konnte an Herzmuskelzellen, die aus iPS-Zellen von Patienten mit dem sogenannten Long-QT-Syndromen differenziert worden waren, die typischen physiologischen Merkmale des Syndroms nachgewiesen werden (Moretti et al., 2010). Das Potential der neuen Technologie wird besonders deutlich angesichts der Tatsache, dass in einigen der bereits publizierten Studien tatsächlich neue Details zu den betreffenden Krankheitsmechanismen entschlüsselt werden konnten (z. B. (Koch et al., 2011)).

2.5.3. Pharmakologische / Toxikologische Substanztestung & Wirkstoffscreening

Die Entwicklung stammzellbasierter *In-vitro*-Testmethoden für Toxikologie und Arzneimittelentwicklung stellt weltweit einen wichtigen Schwerpunkt der Forschung an humanen pluripotenten Stammzellen dar.

Die bestehenden internationalen und nationalen Rechtsvorschriften für die toxikologische und pharmakologische Bewertung von Substanzen, Umweltchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen erfordern heutzutage in erheblichem Umfang tierexperimentelle Studien sowie Untersuchungen unter Nutzung von primären tierischen, seltener primären menschlichen Zellen. Auf Stammzellen beruhende Testsysteme besitzen demgegenüber das Potential zu einer höheren Datenqualität, da die Qualität der eingesetzten Stammzellen durch die Kultivierung relativ konstant ist. Darüber hinaus scheint

bei der Verwendung von humanen Zellen eine bessere Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus gegenüber den derzeit existierenden, überwiegend auf tierischen Zellen beruhenden *In-vitro*-Systemen zu bestehen. Abgesehen davon könnte durch Etablierung von stammzellbasierten Hochdurchsatzverfahren auch die Testung einer großen Zahl verschiedener Substanzen im Hinblick auf Schädigungen des Embryos möglich werden.

Als gute Beispiele hierfür können derzeit verfügbare *In-vitro*-Testmethoden zur toxikologischen und pharmakologischen Charakterisierung inhalativ verabreichter Substanzen oder die Substanztestung in Bezug auf unerwünschte Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem gelten. Mit pluripotenten humanen Stammzellen stehen grundsätzlich geeignete Zellquellen zur Verfügung, mit denen mittelfristig funktionelle Zellerivate wie z. B. Nerven- oder Herzmuskelzellen für pharmakologische oder toxikologische *In-vitro*-Testsysteme zur Verfügung gestellt werden könnten. Auch wenn in vielen Bereichen der Forschung in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt wurden (Wobus and Löser, 2011), werden in den nächsten Jahren noch beträchtliche Anstrengungen von Nöten sein, um Zellen in großem Maßstab insbesondere für die von der EU vorgeschriebene Testung von Chemikalien (REACH) verfügbar zu machen. Auch auf europäischer Ebene wird die Entwicklung solcher Tests zurzeit gezielt gefördert (z. B. im Rahmen der Innovative Medicine Initiative). Noch verbliebene Hürden betreffen insbesondere die kostengünstige Vermehrung undifferenzierter Zellen, die gezielte Herstellung bestimmter zellulärer Subtypen (z. B. Motorneuronen), die weitere Optimierung von Differenzierungsprotokollen sowie die Etablierung von Techniken zur Aufbewahrung der verschiedenen Zellen.

Generell scheinen für die Entwicklung von pharmakologischen oder toxikologischen Testsystemen sowohl embryonale Stammzellen als auch alternative pluripotente Zellquellen wie iPS-Zellen verwendbar zu sein. Im Einzelfall können patientenspezifische iPS-Zellen Vorteile gegenüber embryonalen Stammzellen aufweisen, da Derivate von iPS-Zellen aus Patienten mit bestimmten Gendefekten sensitiver auf unerwünschte Substanznebenwirkungen reagieren als Zellen von gesunden Individuen. In der Medikamentenentwicklung könnte somit die Abschätzung der Wirksamkeit bzw. Risiken eines Wirkstoffes für Patienten mit spezifischen Erkrankungen verbessert werden.

2.5.4. Entwicklung von Therapien mit embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen

Wie in den vorherigen Stammzellberichten bereits ausgeführt wurde, führte die Firma Geron Corp. (USA) eine klinische Studie mit aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen zur Behandlung subakuter Rückenmarksverletzungen mit Querschnittlähmung durch. Dabei wurden hES-Zellen der University of Wisconsin (Thomson et al., 1998) eingesetzt, die erst nachträglich

eine Zulassung der FDA (*Food and Drug Administration*: die für die Zulassung von Arzneimitteln zuständige Behörde der Vereinigten Staaten) erhalten haben. Im Rahmen des lange dauernden Zulassungsverfahrens mussten auch erweiterte Studien zur Sicherheit der neural-differenzierten hES-Zellderivate durchgeführt werden, um die Bildung von Tumoren oder zystischen Strukturen ausschließen zu können. In der klinischen Phase-I-Studie (Sicherheitsstudie) sollten insgesamt zehn Patienten eingeschlossen werden. Eine Zwischenauswertung der ersten vier Patienten zeigte keine unerwünschten Wirkungen und keine Verschlechterung bzw. Veränderung des neurologischen Ausgangsbefunds (Pressemitteilung der Firma Geron Corp, 20.10.2011; <http://ir.geron.com/phoenix.zhtml?c=67323&p=irol-newsArticle&ID=1635760>). Die Studie wurde jedoch im November 2011 abgebrochen. In einer Pressemitteilung der Firma wurde als Grund für den Abbruch die Fokussierung auf Geschäftsfelder in der Onkologie angegeben (<http://ir.geron.com/phoenix.zhtml?c=67323&p=irol-newsArticle&ID=1635764>). Die Firma ACT erhielt die Zulassung der FDA und der EMA (European Medicin Agency: europäische Arzneimittelagentur) für insgesamt drei klinische Phase-I-Studien zur Therapie des Morbus Stargardt (Lu et al., 2009) sowie der „trockenen Makuladegeneration“. Die dabei eingesetzten retinalen Pigmentepithel-Zellen werden aus hES-Zellen differenziert (vgl. auch 2.4.1) (Chung et al., 2008). Die Verwendung von allogenen, körperfremden Zellen ist bei dieser Applikation weniger problematisch, weil die Zellschichten der Netzhaut bzw. Aderhaut im Augeninneren als „immun-privilegiert“ anzusehen sind und somit keine schweren Abstoßungsreaktion zu erwarten sind. Ein im Januar 2012 unter Mitwirkung der beteiligten Firma veröffentlichter Zwischenbericht zeigte u. a., dass bislang keine Nebenwirkungen infolge der Behandlung mit aus hES-Zellen abgeleiteten Zellen beobachtet wurden (Schwartz et al., 2012).

3. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich der potentielle Nutzen humaner embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen (hES- und hiPS-Zellen) für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Wirkstoffe im Berichtszeitraum deutlich konkretisiert hat. Viele Aspekte der Forschung an hES-Zellen sind aber weiterhin der Grundlagenforschung zuzuordnen.

Im Bereich der anwendungsbezogenen Forschung werden hES-Zellen und hiPS-Zellen insbesondere für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte und Wirkstoffe eingesetzt. Hervorzuheben sind dabei insbesondere zwei Forschungsfelder: (1) die Entwicklung von *In-vitro*-Testmethoden für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen und (2) die Entwicklung von auf Stammzellen basierenden Therapien. Auch wenn die Entwicklung von *In-vitro*-Testmethoden sicherlich die am weitesten fortgeschrittenen Entwicklungen mit Anwendungsbezug im Bereich der Stammzellforschung darstellen, rücken erste klinische Studien mit auf pluripotenten Stammzellen basierenden Produkten therapeutische Nutzungsmöglichkeiten für bestimmte Applikationen in greifbare Nähe.

Trotz der beachtlichen Fortschritte und großen Dynamik des Forschungsgebietes müssen wichtige grundlegende Fragen noch weitergehend untersucht werden. Hierzu zählen die Mechanismen der molekularen Reprogrammierung und die Induktion von Pluripotenz. Es gestaltet sich weiterhin als schwierig, vollständig programmierte, tatsächlich pluripotente hiPS-Zellen von unvollständig reprogrammierten Zellklonen zu unterscheiden. Auch ist noch nicht absehbar, wie verschiedene Risiken eliminiert oder zumindest minimiert werden können, die mit der zukünftigen klinischen Applikation von aus pluripotenten Stammzellen hergestellten Zellpräparaten verbunden sind. Dazu zählt weiterhin das Risiko der Teratombildung, aber auch die Entstehung genetischer Veränderungen in Kulturen pluripotenter Stammzellen und das damit verbundene Risiko der Entartung. Die mit solchen Veränderungen verbundenen Risiken wären insbesondere für die Anwendung patienteneigener Zellen relevant und sind bisher erst in wenigen Arbeiten untersucht worden.

Auch wenn es unterdessen enorme Fortschritte insbesondere im Bereich der hiPS-Zellen gibt, ist derzeit noch unklar, welcher Zelltypus sich letztlich als am besten geeignet für bestimmte Fragestellungen bzw. Anwendungen herausstellen wird. Daher wird es weiterhin notwendig sein, die sich gegenseitig ergänzenden Ansätze mit verschiedenen Typen pluripotenter Stammzellen einschließlich der hES-Zellen weiterzuverfolgen und miteinander zu vergleichen, wie es gegenwärtig bei vielen anwendungsorientierten Fragestellungen geschieht. Für Untersuchungen zu entwicklungsbiologischen Fragestellungen bleibt die Forschung mit hES-Zellen weiterhin unabdingbar, und es zeichnet sich hier keine

Verschiebung in Richtung anderer Zellquellen ab. Die unverändert große Bedeutung von hES-Zellen zeigt sich auch am ungebrochen internationalen Interesse an der Forschung mit hES-Zellen: Nach einer jüngst veröffentlichten Studie steigt die Zahl der veröffentlichten Primärpublikationen zu hES-Zellen immer noch an und übertrifft die Anzahl an Publikationen zu humanen iPS-Zellen um das Dreifache (Löser et al., 2011).

Durch das Stammzellgesetz und seine Novellierung 2008 wurde die Forschung mit hES-Zellen in Deutschland ermöglicht, ohne den Schutz menschlicher Embryonen nach dem Embryonenschutzgesetz einzuschränken. Die seit Inkrafttreten des Stammzellgesetzes genehmigten 69 Anträge (bis zum Ende des Berichtszeitraums) auf Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen zeigen, dass die durch das Stammzellgesetz eröffneten Möglichkeiten wahrgenommen werden.

4. Glossar

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

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

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

Differenzierung: Prozess, bei dem durch Aktivierung genetischer Programme immer stärker spezialisierte Zellformen entstehen.

Embryoblast: Die innere Zellmasse der Blastozyste.

Epigenetik/Epigenese: Die **Epigenetik** beschäftigt sich mit der Feinregulation der Genexpression. Unter **epigenetischer Vererbung** wird die Weitergabe von Eigenschaften auf die Nachkommen verstanden, die nicht auf die DNA-Sequenz selbst zurückgehen, sondern auf eine vererbare Änderung der Genregulation und Genexpression. **Epigenetik** unterscheidet sich von der **Epigenese**, welche den seit langem bekannten graduellen Prozess der embryonalen Morphogenese von Organen in all ihrer Komplexität beschreibt. Jedoch basieren die essentiellen zellularen Differenzierungsprozesse der Epigenese vor allem auf epigenetischen Vererbungsmechanismen einer Zellgeneration zur nächsten.

ES-Zellen: Abk. für Embryonale Stammzellen. ES-Zellen sind zur (theoretisch) unlimitierten Selbsterneuerung befähigt sowie *in vivo* und *in vitro* in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) sowie in Zellen der Keimbahn auszudifferenzieren. Sie werden aufgrund letzterer Eigenschaft als pluripotent bezeichnet.

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

hES-Zellen: humane embryonale Stammzellen

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

iPS, induzierte pluripotente Stammzellen: Zellen, die durch Dedifferenzierung (Reprogrammierung) somatischer Zellen entstanden sind und Eigenschaften pluripotenter Stammzellen aufweisen. In differenzierte Körperzellen werden hierbei Gene eingeschleust,

deren Produkte das embryonale Programm in der Zelle wieder anschalten und so Stammzelleigenschaften induzieren.

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

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

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

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

Potenzial: Entwicklungsmöglichkeiten einer Zelle, unterschieden nach: **totipotent** (oder **omnipotent**): Aus der Zelle kann sich ein vollständiges Lebewesen entwickeln (bei menschlichen Embryonen nach derzeitigem Kenntnisstand jede Zelle bis längstens zum Achtzellstadium). **pluripotent:** Aus der Zelle kann sich jeder Zelltyp des Organismus entwickeln, jedoch kein vollständiges Lebewesen. Embryonale Stammzellen können die dafür erforderliche Plazenta, die aus dem Trophoblast der Blastozyste entsteht, nicht bilden und sind daher pluripotent. **multipotent:** Das Entwicklungspotenzial der Zelle beschränkt sich z. B. auf nur einige Zelltypen, die z. B. aus einem der Keimblätter hervorgehen.

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

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

SNCT (SNT), somatic cell nuclear transfer, Zellkerntransfer: Ist der Transfer eines Zellkerns aus einer Körperzelle (somatische Zelle) in eine "entkernte" Eizelle. Der entstandene Zellklon kann anschließend für wissenschaftliche Zwecke (z. B. Zellkulturen) oder in der regenerativen Medizin eingesetzt werden (therapeutisches Klonen). Dieser Klon kann jedoch auch der erste Schritt zum reproduktiven Klonen sein, dessen Ziel die Schaffung eines zum Zellkernspender genetisch identischen Lebewesens ist.

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

embryonal: Diese Stammzellen bilden die innere Zellmasse (Embryoblast) der Blastozyste.

somatisch / adult: Stammzellen von fötalen (d. h. allen vorgeburtlichen Entwicklungsstadien mit abgeschlossener Entwicklung von Organanlagen) und geborenen Lebewesen.

Teratom (von griech. *teras*, *teratos* „Schreckbild, Ungeheuer“ und *-om* „Geschwulst, Schwellung“): Durch Entwicklungsstörungen entstandener, oft organähnlicher Mischumor, der aus verschiedenen Gewebearten besteht. Injektion von pluripotenten Stammzellen in immunkomprimierte Mäuse führt in der Regel zur Bildung von Teratomen, die Zellen aller

Keimblätter enthalten. Dies wird zur Überprüfung der Pluripotenz von Stammzellen genutzt.

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

Trophoblast: Die äußere Zellschicht der Blastozyste.

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

Ausgewählte Internetadressen

http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/stammzellen_node.html

5. Zitierte Literatur

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F., and Gray, J.W. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34, 369-376.
- Baker, D.E., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25, 207-215.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., *et al.* (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23, 2134-2139.
- Barrilleaux, B., and Knoepfler, P.S. (2011). Inducing iPSCs to escape the dish. *Cell Stem Cell* 9, 103-111.
- Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11, 268-277.
- Boulting, G.L., Kiskinis, E., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Wainger, B.J., Williams, D.J., Kahler, D.J., Yamaki, M., Davidow, L., *et al.* (2011). A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29, 279-286.
- Brevini, T.A., Pennarossa, G., Antonini, S., Paffoni, A., Tettamanti, G., Montemurro, T., Radaelli, E., Lazzari, L., Rebutta, P., Scanziani, E., *et al.* (2009). Cell lines derived from human parthenogenetic embryos can display aberrant centriole distribution and altered expression levels of mitotic spindle check-point transcripts. *Stem cell reviews* 5, 340-352.
- Buecker, C., Chen, H.H., Polo, J.M., Daheron, L., Bu, L., Barakat, T.S., Okwieka, P., Porter, A., Gribnau, J., Hochedlinger, K., *et al.* (2010). A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 535-546.
- Burrige, P.W., Thompson, S., Millrod, M.A., Weinberg, S., Yuan, X., Peters, A., Mahairaki, V., Koliatsos, V.E., Tung, L., and Zambidis, E.T. (2011). A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS One* 6, e18293.
- Cathomen, T., and Joung, J.K. (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* 16, 1200-1207.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.
- Chen, G., Gulbranson, D.R., Hou, Z., Bolin, J.M., Ruotti, V., Probasco, M.D., Smuga-Otto, K., Howden, S.E., Diol, N.R., Propson, N.E., *et al.* (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 8, 424-429.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111-123.
- Chin, M.H., Pellegrini, M., Plath, K., and Lowry, W.E. (2010). Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 263-269.
- Cho, M.S., Hwang, D.Y., and Kim, D.W. (2008). Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale. *Nat Protoc* 3, 1888-1894.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., *et al.* (2008). Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2, 113-117.
- Clark, K.J., Voytas, D.F., and Ekker, S.C. (2011). A TALE of two nucleases: gene targeting for the masses? *Zebrafish* 8, 147-149.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Buhring, H.J., Mattheus, U., Mack, A., *et al.* (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-349.
- Davidson, B.L., and McCray, P.B., Jr. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 12, 329-340.
- de Fried, E.P., Ross, P., Zang, G., Divita, A., Cunniff, K., Denaday, F., Salamone, D., Kiessling, A., and Cibelli, J. (2008). Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 89, 943-947.

- Denham, M., and Dottori, M. (2009). Signals involved in neural differentiation of human embryonic stem cells. *Neurosignals* 17, 234-241.
- Dubois, N.C., Craft, A.M., Sharma, P., Elliott, D.A., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Gramolini, A., and Keller, G. (2011). SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29, 1011-1018.
- Eguizabal, C., Montserrat, N., Vassena, R., Barragan, M., Garreta, E., Garcia-Quevedo, L., Vidal, F., Giorgetti, A., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29, 1186-1195.
- Fiedler, J., Gupta, S.K., and Thum, T. (2012). MicroRNA-based therapeutic approaches in the cardiovascular system. *Cardiovasc Ther* 30, e9-e15.
- Gallicano, G.I., Golestaneh, N., Kokkinaki, M., Pant, D., Jiang, J., Destefano, D., Fernandez-Bueno, C., Rome, J.D., Haddad, B.R., and Dym, M. (2009). Pluripotent Stem Cells Derived from Adult Human Testes. *Stem Cells Dev*.
- Ghosh, Z., Wilson, K.D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., and Wu, J.C. (2010). Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One* 5, e8975.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodriguez-Piza, I., Vassena, R., Raya, A., Boue, S., Barrero, M.J., Corbella, B.A., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 5, 353-357.
- Gonzalez, F., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 12, 231-242.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63-67.
- Green, M.D., Chen, A., Nostro, M.C., d'Souza, S.L., Schaniel, C., Lemischka, I.R., Gouon-Evans, V., Keller, G., and Snoeck, H.W. (2011). Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29, 267-272.
- Griesenbach, U., Inoue, M., Hasegawa, M., and Alton, E.W. (2005). Sendai virus for gene therapy and vaccination. *Curr Opin Mol Ther* 7, 346-352.
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011). Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 10, 915-929.
- Gruh, I., and Martin, U. (2009). Transdifferentiation of Stem Cells: A Critical View. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249-257.
- Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R., Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5, 434-441.
- Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., and Jaenisch, R. (2010a). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9222-9227.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., *et al.* (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.
- Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010b). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508-525.
- Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M., Levy, A., Lee, K., Marlow, E., Yow, A., Soldner, F., Hockemeyer, D., Hallett, P.J., *et al.* (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15921-15926.
- Harness, J.V., Turovets, N.A., Seiler, M.J., Nistor, G., Altun, G., Agapova, L.S., Ferguson, D., Laurent, L.C., Loring, J.F., and Keirstead, H.S. (2011). Equivalence of conventionally-derived and parthenote-derived human embryonic stem cells. *PLoS One* 6, e14499.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKelver, R.C., Katibah, G.E., Amora, R., Boydston, E.A., Zeitler, B., *et al.* (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 27, 851-857.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., *et al.* (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology* 29, 731-734.

- Howden, S.E., Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Nisler, B.S., Nie, J., Chen, G., McIntosh, B.E., Gulbranson, D.R., Diol, N.R., *et al.* (2011). Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 6537-6542.
- Hu, B.Y., Du, Z.W., and Zhang, S.C. (2009). Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* *4*, 1614-1622.
- Hu, B.Y., and Zhang, S.C. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* *4*, 1295-1304.
- 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.
- Inamura, M., Kawabata, K., Takayama, K., Tashiro, K., Sakurai, F., Katayama, K., Toyoda, M., Akutsu, H., Miyagawa, Y., Okita, H., *et al.* (2011). Efficient Generation of Hepatoblasts From Human ES Cells and iPS Cells by Transient Overexpression of Homeobox Gene HEX. *Mol Ther* *19*, 400-407.
- Irion, S., Luche, H., Gadue, P., Fehling, H.J., Kennedy, M., and Keller, G. (2007). Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *25*, 1477-1482.
- Jozefczuk, J., Prigione, A., Chavez, L., and Adjaye, J. (2011). Comparative analysis of human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells reveals current drawbacks and possible strategies for improved differentiation. *Stem Cells Dev* *20*, 1259-1275.
- Kane, N.M., Xiao, Q., Baker, A.H., Luo, Z., Xu, Q., and Emanuelli, C. (2011). Pluripotent stem cell differentiation into vascular cells: a novel technology with promises for vascular re(generation). *Pharmacol Ther* *129*, 29-49.
- Kattman, S.J., Witty, A.D., Gagliardi, M., Dubois, N.C., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J., and Keller, G. (2011). Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* *8*, 228-240.
- Khan, I.F., Hirata, R.K., Wang, P.R., Li, Y., Kho, J., Nelson, A., Huo, Y., Zavaljevski, M., Ware, C., and Russell, D.W. (2010). Engineering of human pluripotent stem cells by AAV-mediated gene targeting. *Mol Ther* *18*, 1192-1199.
- Ko, K., Arauzo-Bravo, M.J., Tapia, N., Kim, J., Lin, Q., Bernemann, C., Han, D.W., Gentile, L., Reinhardt, P., Greber, B., *et al.* (2010). Human adult germline stem cells in question. *Nature* *465*, E1; discussion E3.
- Ko, K., Reinhardt, P., Tapia, N., Schneider, R.K., Arauzo-Bravo, M.J., Han, D.W., Greber, B., Kim, J., Kliesch, S., Zenke, M., *et al.* (2011). Brief report: evaluating the potential of putative pluripotent cells derived from human testis. *Stem Cells* *29*, 1304-1309.
- Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tuting, T., *et al.* (2011). Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* *480*, 543-546.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavina, 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.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* *26*, 1364-1366.
- Lefort, N., Perrier, A.L., Laabi, Y., Varela, C., and Peschanski, M. (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med* *4*, 899-909.
- Lengner, C.J., Gimelbrant, A.A., Erwin, J.A., Cheng, A.W., Guenther, M.G., Welstead, G.G., Alagappan, R., Frampton, G.M., Xu, P., Muffat, J., *et al.* (2010). Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* *141*, 872-883.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* *4*, 16-19.
- Liu, G.H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, M., Kumar, S., Nivet, E., Kim, J., Soligalla, R.D., *et al.* (2011). Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* *8*, 688-694.
- Löser, P., Hanke, B., and Wobus, A.M. (2011). Humane pluripotente Stammzellen – Perspektiven ihrer Nutzung und die Forschungssituation in Deutschland. *Naturwissenschaftliche Rundschau* *64*, 453-465.

- Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27, 2126-2135.
- Marchetto, M.C., Yeo, G.W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4, e7076.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153.
- Mauritz, C., Schwanke, K., Reppel, M., Neef, S., Katsirntaki, K., Maier, L.S., Nguemo, F., Menke, S., Haustein, M., Hescheler, J., *et al.* (2008). Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118, 507-517.
- Maynard, S., Swistowska, A.M., Lee, J.W., Liu, Y., Liu, S.T., Da Cruz, A.B., Rao, M., de Souza-Pinto, N.C., Zeng, X., and Bohr, V.A. (2008). Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* 26, 2266-2274.
- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F., *et al.* (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363, 1397-1409.
- Narva, E., Autio, R., Rahkonen, N., Kong, L., Harrison, N., Kitsberg, D., Borghese, L., Itskovitz-Eldor, J., Rasool, O., Dvorak, P., *et al.* (2010). High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat Biotechnol* 28, 371-377.
- Noggle, S., Fung, H.L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K.C., Prosser, R., Oum, K., Paull, D., Druckenmiller, S., Freeby, M., *et al.* (2011). Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* 478, 70-75.
- Noguchi, H., Matsushita, M., Kobayashi, N., Levy, M.F., and Matsumoto, S. (2010). Recent advances in protein transduction technology. *Cell Transplant* 19, 649-654.
- Panula, S., Medrano, J.V., Kee, K., Bergstrom, R., Nguyen, H.N., Byers, B., Wilson, K.D., Wu, J.C., Simon, C., Hovatta, O., *et al.* (2011). Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Human molecular genetics* 20, 752-762.
- Pasi, C.E., Dereli-Oz, A., Negrini, S., Friedli, M., Fragola, G., Lombardo, A., Van Houwe, G., Naldini, L., Casola, S., Testa, G., *et al.* (2011). Genomic instability in induced stem cells. *Cell Death Differ* 18, 745-753.
- Pera, M.F. (2004). Unnatural selection of cultured human ES cells? *Nat Biotechnol* 22, 42-43.
- Plath, K., and Lowry, W.E. (2011). Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 12, 253-265.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J.D., and Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485, 593-598.
- Ramos-Mejia, V., Montes, R., Bueno, C., Ayllon, V., Real, P.J., Rodriguez, R., and Menendez, P. (2012). Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PLoS One* 7, e35824.
- Samadikuchaksaraei, A., Cohen, S., Isaac, K., Rippon, H.J., Polak, J.M., Bielby, R.C., and Bishop, A.E. (2006). Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 12, 867-875.
- Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-720.
- Sebastiano, V., Maeder, M.L., Angstman, J.F., Haddad, B., Khayter, C., Yeo, D.T., Goodwin, M.J., Hawkins, J.S., Ramirez, C.L., Batista, L.F., *et al.* (2011). In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells* 29, 1717-1726.
- 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.
- Sinden, J.D., and Muir, K.W. (2012). Stem cells in stroke treatment: the promise and the challenges. *Int J Stroke* 7, 426-434.
- Soldner, F., Laganriere, J., Cheng, A.W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L.I., Myers, R.H., Lindquist, S., *et al.* (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 146, 318-331.
- Somers, A., Jean, J.C., Sommer, C.A., Omari, A., Ford, C.C., Mills, J.A., Ying, L., Sommer, A.G., Jean, J.M., Smith, B.W., *et al.* (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human

- induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28, 1728-1740.
- Song, K., Nam, Y.J., Luo, X., Qi, X., Tan, W., Huang, G.N., Acharya, A., Smith, C.L., Tallquist, M.D., Neilson, E.G., *et al.* (2012). Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485, 599-604.
- Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzanidou, A., Staessen, C., Vandesselde, Y., Van der Elst, J., Liebaers, I., and Sermon, K. (2008). Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 26, 1361-1363.
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175-181.
- Takeuchi, J.K., and Bruneau, B.G. (2009). Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459, 708-711.
- Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N.N., De Smedt, S.C., and Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release* 150, 238-247.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Vanleene, M., Saldanha, Z., Cloyd, K.L., Jell, G., Bou-Gharios, G., Bassett, J.H.D., Williams, G.R., Fisk, N.M., Oyen, M.L., Stevens, M.M., *et al.* (2011). Transplantation of human fetal blood stem cells in the osteogenesis imperfecta mouse leads to improvement in multiscale tissue properties. *Blood* 117, 1053-1060.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-1041.
- Wang, D., Haviland, D.L., Burns, A.R., Zsigmond, E., and Wetsel, R.A. (2007). A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4449-4454.
- Wang, D., Morales, J.E., Calame, D.G., Alcorn, J.L., and Wetsel, R.A. (2010). Transplantation of human embryonic stem cell-derived alveolar epithelial type II cells abrogates acute lung injury in mice. *Mol Ther* 18, 625-634.
- Wirth, D., Gama-Norton, L., Riemer, P., Sandhu, U., Schucht, R., and Hauser, H. (2007). Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Curr Opin Biotechnol* 18, 411-419.
- Wobus, A.M., and Löser, P. (2011). Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol* 85, 79-117.
- Wu, G., Liu, N., Rittelmeyer, I., Sharma, A.D., Sgodda, M., Zaehres, H., Bleidissel, M., Greber, B., Gentile, L., Han, D.W., *et al.* (2011). Generation of healthy mice from gene-corrected disease-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS Biol* 9, e1001099.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627-632.
- Zou, J., Maeder, M.L., Mali, P., Pruetz-Miller, S.M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B.K., Chen, G., Ye, Z., Park, I.H., Daley, G.Q., *et al.* (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 97-110.
- Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S.N., and Cheng, L. (2011). Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 118, 4599-4608.