

Susanne Müller/Henning Rosenau (Hrsg.)

Stammzellen – iPS-Zellen – Genomeditierung

Stem Cells – iPS Cells – Genome Editing



Nomos

Schriften zum Bio-, Gesundheits- und Medizinrecht

Herausgegeben von
Prof. Dr. Marion Albers
Prof. Dr. Ivo Appel
Prof. Dr. Ulrich M. Gassner
Prof. Dr. Henning Rosenau

Band 34

Susanne Müller/Henning Rosenau (Hrsg.)

Stammzellen – iPS-Zellen –
Genomeditierung
Stem Cells – iPS Cells –
Genome Editing



Nomos

Gefördert durch die Thyssen Stiftung



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

FKZ:01GP1488

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-8487-4980-5 (Print)

ISBN 978-3-8452-9190-1 (ePDF)

1. Auflage 2018

© Nomos Verlagsgesellschaft, Baden-Baden 2018. Gedruckt in Deutschland. Alle Rechte, auch die des Nachdrucks von Auszügen, der fotomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten. Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier.

Vorwort

Der vorliegende Tagungsband vereinigt Beiträge aus interdisziplinärer wie internationaler Perspektive, die im Rahmen und im Umfeld einer Tagung zu Stammzellen, iPS-Zellen und zur Genomeditierung entstanden sind. Diese Tagung des Interdisziplinären Wissenschaftlichen Zentrums Medizin – Ethik – Recht (MER) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, im Zusammenwirken mit der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der Leopoldina als der Nationalen Akademie der Wissenschaften konzipiert, ging den gegenwärtig besonders beforschten Gebieten der Regenerativen Medizin in einem interdisziplinären Kontext nach. Ferner wurden Beiträge als Resultat der vom BMBF geförderten Klausurwoche „Moralische Grenzen der Regenerativen Medizin am Beispiel der Verwendung humaner embryonaler Stammzellen“ aufgenommen, welche über die Friedrich-Schiller-Universität Jena organisiert und koordiniert wurde und deren letzter Programmtag in das gemeinschaftliche Tagungsprogramm eingebettet wurde.

So innovativ und therapieversprechend die Ansätze der Regenerativen Medizin sind, so komplex sind auch ihre medizinethischen und medizinrechtlichen Fragestellungen,¹ die sich aufgrund der interdisziplinären Ansätze nur in einem interdisziplinären Diskurs bearbeiten lassen. Beispielsweise stellen sich Fragen nach der arzneimittelrechtlichen Handhabung solcher Therapien,² verfassungsrechtliche Fragen in Bezug auf die Kommerzialisierbarkeit menschlicher Körpersubstanzen³ oder patentrechtliche

1 Übersichten z.B. bei: *Baker, McQuilling, King*: Ethical considerations in tissue engineering research: Case studies in translation. *Methods* 2016 Apr 15, 99: 135-144; *de Miguel-Berriain*: The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Mar, 82-83: 176-180; *Munsie, Hyun*: A question of ethics: selling autologous stem cell therapies flaunts professional standards. *Stem Cell Res.* 2014 Nov, 13 (3 Pt B): 647-653.

2 Übersichten bei: *Kuhlmann-Gottke, Duchow*: Regulatorische Anforderungen an Zelltherapeutika in der Human- und in der Veterinärmedizin – ein Vergleich. *Bundesgesundheitsbl.* (2015) 58: 1299; *Scherer, Seitz*: Sicherheit von Zelltherapeutika/ Cell-based medicinal products (CBMP). *Bundesgesundheitsbl.* (2015) 58: 1199.

3 *Munsie, Hyun*: A question of ethics: selling autologous stem cell therapies flaunts professional standards. *Stem Cell Res.* 2014 Nov, 13 (3 Pt B): 647-653.

Fragen im Umgang mit menschlichen Stammzellen, vor allem hinsichtlich der embryonalen Stammzellen.⁴ Besonders die Gentherapie bzw. in moderner Wendung das Genediting wirft rechtliche wie ethische Fragen auf, wenn durch Eingriffe in die Keimbahn das Erbgut des Menschen vererblich verändert wird.⁵ Da die Regenerative Medizin ein multi- und interdisziplinäres Fachgebiet ist, müssen Mediziner, Biologen, Materialwissenschaftler, Bioinformatiker und Ingenieure mit Medizinethikern, Juristen und Gesundheitsökonomern zusammenwirken, um den besonderen naturwissenschaftlich-technischen und medizinethischen, rechtlichen und ökonomischen Voraussetzungen der Regenerativen Medizin gerecht zu werden. Es ist dementsprechend auch eine Zielsetzung des Symposiums gewesen, neue Impulse für die Fragen der Regenerativen Medizin durch die Begegnung verschiedener Disziplinen zu gewinnen. Die Antworten werden hiermit der science community vorgelegt. Uns ist dabei bewusst, dass es sich in vielen Aspekten hierbei nur um vorläufige Antworten handeln kann.

Das gilt beispielsweise auch für die iPS-Zellen, mit denen seit deren Entdeckung die Hoffnung verbunden ist, dass die Forschung mit und an humanen embryonalen Stammzellen nicht mehr nötig sein wird und dass diese iPS-Zellen die Lösung für das ethische Dilemma der humanen Stammzellforschung⁶ sind. Richtigerweise wird man jedoch festhalten müssen, dass hier noch viele Fragen zum einen in technischer Hinsicht,

-
- 4 *Faltus, Storz*: Response to: Dittrich et al.: Non-Embryo-Destructive Extraction of Pluripotent Embryonic Stem Cells – Overlooked Legal Prohibitions, Professional Legal Consequences and Inconsistencies in Patent Law. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2016 Dec 76 (12): 1302-1307; *Storz, Faltus*: Patent eligibility of stem cells in Europe: where do we stand after 8 years of case law? *Regen Med.* 2017 Jan, 12 (1): 37-51.
 - 5 *Rosenau*: Zur Zulässigkeit von Eingriffen in die menschliche Keimbahn, in: Schreiber/Lilie/Rosenau/Tadaki/Pak (Hrsg.), *Globalisierung der Biopolitik, des Biorechts und der Bioethik?*, Frankfurt 2007, S. 150-158.; *Egelie, Graff, Strand, Johansen*: The emerging patent landscape of CRISPR-Cas gene editing technology. *Nat Biotechnol.* 2016 Oct 11, 34 (10): 1025-1031; *Walton*: The Slippery Slope Argument in the Ethical Debate on Genetic Engineering of Humans. *Sci Eng Ethics* 2016 Dec 20: 1-22.
 - 6 Nutzung menschlicher Embryonen mit umstrittenem moralischen Status vs. Therapiemöglichkeit für eine unbestimmte Anzahl an Patienten.

aber auch in medizinethischer und rechtlicher Sicht zur Reprogrammierung offen sind.⁷

In besonderer Weise trifft die Vorläufigkeit von Antworten auf das Genediting zu. Mit den in den letzten Jahren entwickelten Verfahren der Genoder Genomeditierung, die im Vergleich zu bisherigen Methoden der Gentherapie schneller und einfacher durchführbar sind, hat die Gentherapie insgesamt neuen Auftrieb erlebt. Die Wirkmächtigkeit dieser Verfahren sowohl in medizinischer als auch ethischer und rechtlicher Hinsicht zeigt sich unter anderem darin, dass sich weltweit die wissenschaftlichen Akademien mit dieser Thematik befassen (in den USA die *National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine*;⁸ im Vereinigten Königreich die *Academy of Medical Sciences*⁹). In Deutschland haben die Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften, acatech – Deutsche Akademie der Technikwissenschaften, die Union der deutschen Akademien der Wissenschaften und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gemeinsam Stellungnahmen zur Genomeditierung veröffentlicht.¹⁰ Aufgrund der möglicherweise enormen, aber bislang im Großen und Ganzen unverstandenen Wirkung der Genomeditierung wird etwa ein Moratorium erörtert.¹¹ Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) hat zur Bearbeitung der medizinethischen, rechtlichen und sozialen Fragen der Genomeditierung ein Förderprogramm aufgelegt, in dessen Rahmen ein Verbundvorhaben dazu auch von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg koordiniert wird.¹² Zugleich hat es eine interdisziplinäre wie internationale Klausurwoche unter Leitung von *Susanne Müller* (Jena) und *Timo Faltus*

7 *Rosenau*: Induzierte Pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) – Lösungen aller rechtlichen Probleme?, *Journal of Medical Law* (Istanbul), 4 (2015), Heft 8, S. 233-290.

8 <http://nationalacademies.org/gene-editing/Gene-Edit-Summit/>.

9 <http://www.acmedsci.ac.uk/policy/policy-projects/genome-editing>.

10 http://www.dfg.de/service/presse/pressemitteilungen/2015/pressemitteilung_nr_49/index.html. Siehe dazu auch: <https://www.leopoldina.org/de/publikationen/detailansicht/publication/chancen-und-grenzen-des-genome-editing-2015/>; <https://www.leopoldina.org/de/presse/nachrichten/stellungnahme-genome-editing/>.

11 *Lanphier, Urnov, Haecker, Werner, Smolenski*: Don't edit the human germ line. *Nature*

519(26 March 2015): 410-411; siehe dazu auch: <http://en.unesco.org/news/unesco-panel-experts-calls-ban-editing-human-dna-avoid-unethical-tampering-hereditary-traits>; https://www.nytimes.com/2015/12/04/science/crispr-cas9-human-genome-editing-moratorium.html?_r=0.

12 http://kluth.jura.uni-halle.de/bmbf_genomelection/.

Vorwort

(Halle an der Saale) zur Regenerativen Medizin in Halle an der Saale gefördert.¹³ Die Ergebnisse beider Projekte sind auf der Tagung vorgestellt worden und mit in den vorliegenden Tagungsband eingegangen.

Wir danken der Fritz Thyssen Stiftung, deren Finanzierung die Tagung und die Publikation der Beiträge erst ermöglicht hat. Dem BMBF sind wir für die Förderung insbesondere der Klausurwoche sowie der Publikation ebenfalls zu Dank verpflichtet.

Jena und Halle an der Saale im April 2018

*Susanne Müller
Henning Rosenau*

13 <https://gesundheitsforschung-bmbf.de/de/moralische-grenzen-der-regenerativen-m-edizin-am-beispiel-der-verwendung-humaner-embryonaler-5491.php>.

Inhalt

I. Stammzellen und iPS-Zellen

Grundlagen und Anwendung der Reprogrammierung adulter Zellen
zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ) 15

Insa S. Schroeder

Die vom BMBF geförderte internationale und interdisziplinäre
Klausurwoche „Moral Frontiers in Regenerative Medicine
pertaining to the Use of Human Embryonic and Induced Pluripotent
Stem (iPS) Cells“ in Halle (Saale) 35

Susanne Müller, Timo Faltus

iPS cells and iPS cell-based therapies – Swiss and UK perspective
on definition and regulation 53

Inesa Chmurec

The Ethics of Selling the Promise of Pluripotent Stem Cells 65

Tereza Hendl

Comparative Law and Co-opetition in Regulatory Norms Formation
Pertaining to Human Genetic Modification and Re-Programming 87

Calvin Wai-Loon Ho

Why Ethical Qualms over Human Embryonic Stem Cells Are No
Longer Relevant: An Analysis of the Evolving Public Discourse and
Regulatory Context for Stem Cell Research in Canada 109

Kalina Kamenova

Marketing iPS cells at a global level: the issues of tailor-made
medicine 125

Delphine Pichereau, Emmanuelle Rial-Sebbag

Inhalt

Good research, bad application? The commercial use of human embryonic stem cells in Germany 139
Hannah Schickl

II. Genomeditierung und Gentherapie

Scientific and medical basis of CRISPR/CAS9 and genome editing 159
Elena Buglo, Stephan Züchner

Patienten(Grund)Rechte bei neuartigen Stammzellen- und Gentherapien 171
Jochen Taupitz, Juliane Boscheinen

Genomeditierung – Perspektiven des Verfassungsrechts 189
Winfried Kluth

Herausforderung der einfachrechtlichen Regulierung der Genom-Editierung in der EU 199
Susanne Beck, Frederike Seitz

Genom- und Geneditierung in Forschung und Praxis – Rechtsrahmen, Literaturbefund und sprachliche Beobachtungen 217
Timo Faltus

Human Genome Editing: Reflections on Policy Convergence and Global Governance 287
Rosario Isasi

Genome Editing als Gegenstand öffentlicher Betrachtung – Herausforderungen für Forschung, Vermittlung und Partizipation 299
Katrin Vohland, Julia Diekämper, Alexandra Moormann, Tobias Nettke, Wiebke Rössig

Ethische Dimensionen der Genom-Editierung, <i>buen vivir</i> und die tiefenökologische Bewegung <i>Hans Zillmann, Matthias Kaufmann</i>	313
Ethics and Biotech patents – where two worlds collide <i>Ulrich Storz</i>	329
Das vom BMBF geförderte Verbundprojekt „GenomELECTION“ – Genomeditierung: ethische, rechtliche und kommunikationswissenschaftliche Aspekte im Bereich der molekularen Medizin und Nutzpflanzenzüchtung <i>Timo Faltus</i>	349
<i>Autoren- und Herausgeberverzeichnis</i>	361

I. Stammzellen und iPS-Zellen

Grundlagen und Anwendung der Reprogrammierung adulter Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ)

Insa S. Schroeder

Zusammenfassung: In der medizinischen Forschung werden Stammzellen hinsichtlich ihres Potentials in absteigender Reihenfolge klassifiziert: *Totipotente* Stammzellen wie die befruchtete Eizelle können zu einem vollständigen Organismus heranwachsen, *pluripotente* (embryonale) Stammzellen können sich zu jedem Zelltyp des Körpers entwickeln, nicht aber zu einem kompletten Lebewesen, während *multipotente* Stammzellen nur noch Zelltypen innerhalb eines Keimblattes (Ento-, Ekto- oder Mesoderm) bilden können. Proliferierende somatische (adulte) Zellen können in der Regel nur noch den eigenen Zelltyp bilden. Lange Zeit galten embryonale Stammzellen (ESZ) aus der inneren Zellmasse von Blastozysten als einzige Quelle pluripotenter Stammzellen. Im Jahr 2006 gelang es jedoch der Forschergruppe um Shinya Yamanaka adulte Maus-Fibroblasten durch künstliche Induktion von nur vier Pluripotenz-assoziierten Genen in „induzierte“ pluripotente Stammzellen (iPSZ) zu „reprogrammieren“; ein Prozess, der auch in menschlichen Zellen durchführbar ist. Dies eröffnet ganz neue Möglichkeiten für die Erforschung und Behandlung von Erkrankungen, welche insbesondere mit einem Verlust von Zellen oder ihrer Funktion einhergehen. Es sind jedoch auch noch viele technische Herausforderungen zu meistern, um eine breite Anwendung von effizienten und bezahlbaren Therapien, die auf iPSZ basieren, zu erreichen. Im Folgenden werden die Grundlagen der Reprogrammierung, ihre Vorzüge und Nachteile sowie die derzeitige Anwendung der iPSZ beschrieben.

Summary: In medical science, stem cells are categorized regarding their potency: totipotent cells such as the fertilized egg can develop into an entire organism, pluripotent (embryonic) stem cells can form all cell types of the body but not the body itself while multipotent stem cells are limited to differentiate into cell types of one of the three germ layers (endo-, ecto-, and mesoderm). If dividing, adult cells generally only form daughter cells of their own type. Embryonic stem cells (ES cells) from the inner cells mass of the blastocyst were long viewed as the only source of pluripotent stem cells. However, in 2006 the group of Shinya Yamanaka managed to “reprogram” adult mouse fibroblasts into “induced” pluripotent stem cells (iPSC) by introducing only four pluripotency-associated factors. iPSC revolutionized the field of basic medical research, opening up new approaches for disease modelling and drug development and thus has great clinical implications. However, there are numerous technical hurdles that have to be overcome before iPSC based technologies become broadly applied in the clinics. Here, the basics of reprogramming, its advantages and challenges, and the current use of iPSC in research and therapy are described.

Die geschichtliche Entwicklung der Reprogrammierung

Auch wenn die Entdeckung der iPS-Technologie einen Meilenstein in der Entwicklungsbiologie und Medizinforschung darstellt, so beginnt die Geschichte der Reprogrammierung nicht erst im Jahr 2006, sondern schon deutlich früher: Schon 1952 konnten Briggs und King¹ in ersten Klonierungsversuchen mit Leopardfröschen (*Rana pipiens*) durch Transfer eines somatischen Zellkerns in eine entkernte Eizelle zeigen, dass Gene und damit ihre genetische Information während der Entwicklung/Spezifikation von Zellen nicht verloren gehen oder dauerhaft inaktiviert werden. Der Verlust nicht benötigter Gene bzw. ihre permanente Inaktivierung war nach der damaligen Meinung zwingend notwendig für spezialisierte Zellen, um eine unzweckmäßige Aktivierung von Genen und damit eine mögliche Funktionsstörung der Zelle zu verhindern. Die Versuche von Briggs und King standen nicht nur in Kontrast zur gängigen Lehrmeinung, sondern waren auch umstritten, da sie nur mit wenig-entwickelten Blastozysten zellen als Ausgangsmaterial für die „Reprogrammierung“ reproduziert werden konnten, nicht jedoch mit Zellkernen von stärker spezialisierten Geweben. Die Versuche wurden 1958 von Sir John B. Gurdon mit Krallefröschen (*Xenopus laevis*) erfolgreich wiederholt² und Gurdon war es auch der 1962 durch den Transfer von Kernen hochspezialisierter Darmzellen in eine Eizelle lebensfähige, adulte Klone erhalten konnte.³ Es sollte jedoch noch weitere 35 Jahre dauern, bis durch das Klonschaf Dolly auch in Säugetieren bewiesen war, dass die Transplantation eines Kerns aus einer adulten Körperzelle in eine entkernte Eizelle zu einer Reprogrammierung des Kerns führt und aus ihm in der stimulierenden Umgebung der Eizelle pluripotente Zellen entstehen können.⁴ Die Idee, dass die regulatorische Umgebung prägend für die Zellentwicklung ist, hatte schon 1952 Conrad H. Waddington mit der Beschreibung seiner „epigenetischen Landschaft“ eingeführt, in der ein Ball/ respektive eine Zelle, einen zer-

1 R. Briggs *et al.*, Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 38,1952, 455 ff.

2 J.B. Gurdon *et al.*, Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei, Nature 182, 1958, 64 ff.

3 J.B. Gurdon, The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles, J. Embryol. Exp. Morphol. 10, 1962, 622 ff.

4 I. Wilmut *et al.*, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, Nature 385, 1997, 810 ff.

klüfteten Abhang herunterrollt und dabei in Abhängigkeit von der topographischen Umgebung Weg-/Differenzierungsentscheidungen trifft.⁵ Wie stark die Prägung des regulatorischen Umfelds sein kann, wird daran ersichtlich, dass schon die Expression eines einzigen Transkriptionsfaktors (MYOD) genügt, um beispielsweise aus Fibroblasten Myoblasten (Vorläuferzellen von Skelettmuskelfasern) zu generieren.⁶ Den Beweis zu führen, dass aus der Vielzahl Pluripotenz-assoziiierter Gene nur vier, Oct4, Sox2, Klf4 und cMyc, notwendig sind, um im Sinne von Waddington den „Ball bergauf rollen zu lassen“ und ausgereifte Zellen in pluripotente Stammzellen zu überführen, ist ein Verdienst von Shinya Yamanaka.⁷ Diese bahnbrechende Erkenntnis führte zu einer Fülle von Reprogrammierungsstudien und allein die PubMed-basierte Literaturrecherche⁸ liefert fast 13.000 Artikel die den Suchbegriff „induzierte pluripotente Stammzellen“ beinhalten. Folgerichtig erhielten Gurdon und Yamanaka 2012 den Nobelpreis für Medizin für ihre Arbeiten zur Reprogrammierung. All diese Fortschritte wären jedoch undenkbar gewesen, wäre nicht die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von murinen und humanen embryonalen Stammzellen geglückt,^{9,10} die zum Verständnis der Pluripotenz, ihrer Charakterisierung und ihres Erhalts entscheidend beigetragen haben. Embryonale Stammzellen werden daher immer noch als Goldstandard für Pluripotenz und als Vergleich für iPSC herangezogen.

Methoden der Reprogrammierung

Auch wenn die Technik der Reprogrammierung auf den ersten Blick konzeptionell simpel erscheint, da es sich im Wesentlichen um die Einschleu-

5 C.H. Waddington, The strategy of the genes. a discussion of some aspects of theoretical biology, George Allen and Unwin., 1957.

6 R.L. Davis *et al.*, Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts, Cell 51, 1987, 987 ff.

7 K. Takahashi *et al.*, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell 126, 2006, 663 ff.

8 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=induced+pluripotent+stem+cells>, abgerufen am 25.9.2017.

9 M.J. Evans *et al.*, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, Nature 292, 1981, 154 ff.

10 J.A. Thomson *et al.*, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science 282, 1998, 1145 ff.

sung ausgesuchter, exogener Pluripotenzgene handelt, die letztendlich die Reaktivierung der zelleigenen Pluripotenzgene bedingt, gibt es dennoch eine unendliche Vielzahl von Reprogrammierungsstrategien, die je nach der gewünschten Anwendung der iPSZ mehr oder weniger geeignet und effizient sind. Die Anwendung von iPS-basierten Zelltherapien beispielsweise stellt immense Anforderungen an die Qualität der iPSZ und die Reprogrammierung selbst. Die wichtigsten Kriterien zur Auswahl geeigneter Methoden werden im Folgenden vorgestellt:

Auswahl der Donor-/Ausgangszellen

Die Wahl der Ausgangszellen bestimmt ganz entscheidend den Erfolg und die Effizienz der Reprogrammierung, ist aber auch gebunden an die Verfügbarkeit des Zellmaterials. Somit muss in der Regel ein Kompromiss zwischen Verfügbarkeit und Reprogrammierbarkeit der Zellen eingegangen werden. Epitheliale Zellen beispielsweise lassen sich effizienter reprogrammieren als mesenchymale, weil sie schon die für pluripotente Zellen typischen Zell-Zell-Kontakte, die Polarität und die Expression von E-Cadherin aufweisen, während mesenchymale Zellen, wie die häufig verwendeten Fibroblasten, diese Eigenschaften erst im Laufe des Reprogrammierungsprozesses erwerben müssen.

Sehr häufig werden Fibroblasten als Ausgangsmaterial, im Falle von humanen Fibroblasten aus Vorhaut oder Hautbiopsien gewonnen, verwendet. Die Reprogrammierbarkeit dieser Zellen nimmt jedoch mit dem Alter des Spenders und der Dauer, die diese Zellen in Kultur verbringen, signifikant ab¹¹ und ihre Verfügbarkeit ist begrenzt. Das Alter des Spenders ist darüber hinaus auch mit einer erhöhten Rate an Mutationen/genetischen Abnormalitäten assoziiert,¹² die bei einer klinischen Anwendung berücksichtigt werden muss. Deutlich leichter als Fibroblasten lassen sich humane primäre Keratinozyten gewinnen, die aus Haarwurzeln isoliert werden

11 R. Trokovic *et al.*, Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Res.* 15, 2015, 254 ff.

12 S.V. Lo *et al.*, Influence of donor age on iPS cells, *Nat. Biotechnol.* 35, 2017, 69 ff.

können.¹³ Im Vergleich zu humanen Fibroblasten ließen sie sich bei gleicher Reprogrammierungsstrategie 100-mal effizienter und 2-mal schneller reprogrammieren.¹⁴ Da jüngere, unreifere Zellen leichter reprogrammierbar sind, stellen auch CD133-positive Nabelschnurblutzellen eine gute Quelle für die Herstellung von iPS Zellen dar.^{15,16} Die Reprogrammierung ist dabei ebenso kosteneffektiv wie geeignet für den Hochdurchsatz,¹⁷ selbst bei vorher kryokonserviertem Ausgangsmaterial.¹⁸ Somit können bereits bestehende Nabelschnurbanken unter adäquaten regulatorischen Leitlinien durch die Bereitstellung von iPS-Zelllinien zusätzliche therapeutische Anwendung finden.¹⁹ iPS-Zellbanken sind von unschätzbarem Wert, weil sie eine breite Verfügbarkeit von Zelllinien garantieren. Da für iPS-basierte Therapien bezüglich ihrer Immunkompatibilität die gleichen Herausforderungen bestehen wie für Organtransplantationen, können in entsprechenden Zellbanken rasch geeignete iPS-Linien für Patienten gefunden werden, die das Risiko einer Immunabwehr und den Grad der notwendigen Immunsuppression bzw. -toleranz auf ein Minimum beschränken. Und auch wenn der Aufbau von derartigen Banken mit hohen Anforderungen an die Auswahl der Spender, die Prozessierung der Zellen, die Qualitätskontrolle und rechtliche Regelungen einhergeht,^{20,21} ist er mach-

-
- 13 *T. Aasen et al.*, Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells, *Nat. Protoc.* 5, 2010, 371 ff.
 - 14 *T. Aasen et al.*, Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes, *Nat. Biotechnol.* 26, 2008, 1276 ff.
 - 15 *A. Giorgetti et al.*, Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2, *Nat. Protoc.* 5, 2010, 811 ff.
 - 16 *K. Hu et al.*, Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells, *Blood* 117, 2011, e109 ff.
 - 17 *D. Paull et al.*, Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells, *Nat. Methods* 12, 2015, 885 ff.
 - 18 *H. Zhou et al.*, Rapid and efficient generation of transgene-free iPSC from a small volume of cryopreserved blood, *Stem Cell Rev* 11, 2015, 652 ff.
 - 19 *M. Rao et al.*, Concise review: Cord blood banking, transplantation and induced pluripotent stem cell: success and opportunities, *Stem Cells* 30, 2012, 55 ff.
 - 20 *J. Barry et al.*, Setting up a haplobank: Issues and solutions, *Curr. Stem Cell Rep.* 1, 2015, 110 ff.
 - 21 *T. Kallur et al.*, Quality assurance in stem cell banking: Emphasis on embryonic and induced pluripotent stem cell banking, *Methods Mol. Biol.* 1590, 2017, 11 ff.

bar²² und wird weltweit beispielsweise durch das Center for iPS Cell Research and Application der Kyoto Universität²³ betrieben. Dass sich neben Blutproben selbst Urinproben für die Herstellung von iPSZ eignen,^{24,25} erleichtert die Rekrutierung potentieller Spender.

Wahl der Reprogrammierungsfaktoren

Die ursprünglich von Takahashi et al. verwendeten Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und cMYC, auch bekannt als „Yamanaka Faktoren (OSKM)“ werden bis heute verbreitet genutzt und liefern robuste Reprogrammierungserfolge. Dennoch gibt es diverse Variationen, welche auch vom gewählten Ausgangsmaterial abhängen. Einige der zu reprogrammierenden Zellen exprimieren bereits ausreichende Mengen von Faktoren wie SOX2 oder cMYC, so dass eine zusätzliche exogene Induktion nicht notwendig ist.^{26,27} Die wichtigsten Faktoren werden nachfolgend beschrieben:

Viele der Reprogrammierungsfaktoren werden in der Präimplantationsphase des Embryos exprimiert und sind für den Erhalt der Pluripotenz von Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste essentiell. Zu diesen gehören beispielsweise die Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2 und NANOG, die den Kern des Netzwerks Pluripotenz-erhaltender Faktoren bilden. Andere Pluripotenz-assoziierte Faktoren wie UTF1, das in die Organisation des ESZ-spezifischen Chromatins involviert ist und auch als Marker für den Erfolg der iPS-Zellgenerierung verwendet werden kann,²⁸ oder SALL4

22 S. Solomon et al., Banking on iPSC--is it doable and is it worthwhile, Stem Cell Rev 11, 2015, 1 ff.

23 <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/research/stock.html>, aufgerufen am 27.10.2017.

24 C. Steichen et al., Human induced pluripotent stem (hiPS) cells from urine samples: A non-integrative and feeder-free reprogramming strategy, Curr. Protoc. Hum. Genet. 92, 2017, 21 ff.

25 Y. Xue et al., Generating a non-integrating human induced pluripotent stem cell bank from urine-derived cells, PLoS. One. 8, 2013, e70573 ff.

26 J.B. Kim et al., Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors, Nature 454, 2008, 646 ff.

27 J.B. Kim et al., Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells, Cell 136, 2009, 411 ff.

28 A. Morshedi et al., Use of UTF1 genetic control elements as iPSC reporter, Stem Cell Rev. 9, 2013, 523 ff.

verstärken die reprogrammierende Wirkung dieser Kernfaktoren^{29,30} sowohl im murinen als auch im humanen System. Darüber hinaus wird das Netzwerk von Pluripotenzfaktoren auch von nicht-codierenden mikroRNA reguliert. Lin28 ist ein prominenter Vertreter dieser mikroRNAs und greift als Regulator der Translation von OCT4 direkt in den Erhalt der Pluripotenz ein.³¹ Lin28 ist daher auch Bestandteil des zweiten, vielfach genutzten Cocktails mit den sogenannten „Thomson Faktoren“ SOX2, OCT4, Lin28 und NANOG.⁹

Für eine effiziente Reprogrammierung sind darüber hinaus Faktoren essentiell, die direkt oder indirekt die Zellproliferation steigern, denn pluripotente Stammzellen proliferieren deutlich stärker als somatische Zellen. Zu ihnen gehören KLF4 und cMYC, die Bestandteile des Yamanaka Cocktails sind, aber auch als Protoonkogene potentiell tumorfördernd und daher in klinischen Anwendungen umstritten sind. Ebenfalls in die Gruppe der proliferationsfördernden Faktoren gehören TERT und SV40LT, die in Kombination mit OSKM zu einer verstärkten Bildung von iPS-Kolonien führen.³² Auch mikroRNA gehören wieder zu den Faktoren, die aktiv den ESZ-spezifischen Zellzyklus regulieren und zur Unterstützung der Reprogrammierung genutzt werden können. Hier ist vor allem die mikroRNA miR-294 zu nennen.³³ Im Zusammenhang mit der Bedeutung der Zellproliferation für die iPS-Zellgenerierung muss auch die Rolle von p53 diskutiert werden: p53 Aktivierung führt zu Zellzyklusarrest, Seneszenz und zum programmierten Zelltod (Apoptose) und vermindert somit die Reprogrammierungseffizienz. Die Inhibierung des p53 Signalwegs fördert folglich die Proliferation und die Reprogrammierung.³⁴ Dadurch geht jedoch

29 *N. Tsubooka et al.*, Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts, *Genes Cells* 14, 2009, 683 ff.

30 *Y. Zhao et al.*, Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation, *Cell Stem Cell* 3, 2008, 475 ff.

31 *C. Qiu et al.*, Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells, *Nucleic Acids Res.* 38, 2010, 1240 ff.

9 *J.A. Thomson et al.*, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science* 282, 1998, 1145 ff.

32 *I.H. Park et al.*, Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors, *Nature* 451, 2008, 141 ff.

33 *R.L. Judson et al.*, Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency, *Nat. Biotechnol.* 27, 2009, 459 ff.

34 *W.S. el-Deiry et al.*, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell* 75, 1993, 817 ff.

auch die „Wächterfunktion“ über die genomische Integrität verloren und höhere Mutationsraten in den iPSZ können die Folge sein.³⁵ Es ist daher allenfalls eine transiente Inhibierung des p53-Signalwegs förderlich.

Entscheidend für die Herstellung von iPSZ ist die Umgestaltung des Chromatins, also des Komplexes aus Histonen, der DNA und der sie umgebenden Proteine, die gemeinsam die Grundlage der Chromosomen bilden (zusammengefasst in Watanabe et al., 2013):³⁶ Im Gegensatz zu somatischen Zellen verfügen pluripotente Stammzellen über ein „offenes Chromatin“, das eine schnelle transkriptionelle Aktivierung von Genen erlaubt, während Chromatin-Regulatoren örtlich begrenzt linienspezifische Gene inaktivieren, bis eine Differenzierung ausgelöst wird. Während der Reprogrammierung von somatischen Zellen muss somit die Chromatinstruktur durch Histonmodifizierung, DNA Demethylierung und -acetylierung, zusammengefasst in van den Hurk et al.³⁷, wieder „geöffnet“ werden. Diese Chromatinumgestaltung ist nicht immer vollständig und es besteht die Gefahr, dass iPSZ einen epigenetischen Fingerabdruck behalten, der an die somatischen Ausgangszellen erinnert. Die Remodellierung des Chromatins kann mit Hilfe von chemischen Molekülen (*small molecules*) wie 5'-Azacytidin (DNA Methyltransferase Inhibitor), Trichostatin A (Histon Deazetylase Inhibitor) oder Valproinsäure unterstützt werden. Derartige Substanzen werden daher vielfach in Reprogrammierungsstrategien integriert, um die Effizienz zu steigern oder andere Reprogrammierungsfaktoren zu ersetzen. Eine der ersten Studien, die die Bedeutung dieser chemischen Moleküle erfassten, wurde von Huangfu et al. beschrieben.³⁸ Inzwischen ist es sogar gelungen, die Reprogrammierung ausschließlich mit derartigen Molekülen erfolgreich zu etablieren.^{39, 40}

-
- 35 S. Menendez et al., p53: guardian of reprogramming, *Cell Cycle* 9, 2010, 3887 ff.
36 A. Watanabe et al., Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 368, 2013, 20120292 ff.
37 M. van den Hurk et al., Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency, *Epigenomics*. 8, 2016, 1131 ff.
38 D. Huangfu et al., Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds, *Nat. Biotechnol.* 26, 2008, 795 ff.
39 P. Hou et al., Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds, *Science* 341, 2013, 651 ff.
40 Y. Zhao et al., A XEN-like state bridges somatic cells to pluripotency during chemical Reprogramming, *Cell* 163, 2015, 1678 ff.

Einschleusung der Faktoren

Die Wahl der Reprogrammierungsfaktoren bestimmt letztlich auch, wie diese Faktoren in die somatische Zelle eingeschleust werden. Die oben beschriebenen small molecules bedürfen beispielsweise keiner zusätzlichen Einschleusungsmethode, während Makromoleküle wie DNA, RNA und auch Proteine aktiv durch die Zellmembran in die Zelle eingebracht werden müssen. Proteine können an Zellmembran-penetrierende Peptide wie das *human immunodeficiency virus transactivator of transcription* (HIV-TAT) Protein gekoppelt werden und können so in die Zelle gelangen.⁴¹ RNA kann direkt durch Elektroporation oder Komplexbildung mit kationischen Lipiden durch Endozytose in die Zelle eingeschleust werden und wurde auf diesem Wege auch zur Reprogrammierung genutzt. Es bedarf dabei aber der synthetischen Modifizierung, um die Stabilität der RNA und ihre Translation in Proteine zu erhöhen während gleichzeitig ihre Immunogenität erniedrigt werden muss.⁴²

Sowohl die Verwendung von Proteinen als auch von RNA ist ineffizient und bedarf einer mehrfachen Einschleusung der Faktoren, zusammengefasst in M. Brouwer et al., 2016.⁴³ RNA kann auch über sogenannte Sendai Viren eingeschleust werden.⁴⁴ DNA wiederum kann über Viren, Transposons, Bakteriophagen oder episomale Vektoren eingeschleust werden.⁴³

Generell wird in integrierende (hier werden die von außen eingeschleusten Gene in das Genom der zu reprogammierenden Wirtszelle eingebaut) und nicht-integrierende Einschleusungsmethoden unterschieden, wobei die integrierenden Methoden in der Regel effizienter und schneller als die nicht-integrierenden Methoden sind: zu den integrierenden Methoden zählen retro- oder lentivirale Transfektion sowie auf Transposons und Bakteriophagen basierte Methoden. Nicht-integrativ sind, mRNA, Proteine, Plasmid oder Minicircle-DNA, episomale Vektoren, PiggyBac-Systeme

41 D. Kim et al., Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins, *Cell Stem Cell* 4, 2009, 472 ff.

42 L. Warren et al., Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA, *Cell Stem Cell* 7, 2010, 618 ff.

43 M. Brouwer et al., Choices for induction of pluripotency: Recent developments in human induced pluripotent stem cell reprogramming strategies, *Stem Cell Rev.* 12, 2016, 54 ff.

44 I.Y. Choi et al., Efficient generation human induced pluripotent stem cells from human somatic cells with Sendai-virus, *J. Vis. Exp.* 86, 2014, e51406 ff.

me, Adenoviren und Sendai-Viren. Ursprünglich wurden Retroviren eingesetzt, um die Reprogrammierungsfaktoren einzuschleusen, aber sie infizieren nur sich teilende Zellen; in kaum proliferierenden Zellen sind sie weniger effizient und schränken somit die Wahl geeigneter Ausgangszellen ein. In pluripotenten Stammzellen wird die retrovirale Transkription inaktiviert bzw. abgeschwächt.⁴⁵ Eine solche Inaktivierung der Transgene mit fortschreitender Reprogrammierung und die gleichzeitige Aktivierung endogener Pluripotenz-erhaltender Signalwege sind ein Merkmal für die Effizienz und Qualität der iPS-Zellgenerierung.⁴⁶ Die Abschaltung der Transgene ist aber nicht immer vollständig.⁴⁷ Für die klinische Anwendung von iPSZ ist zu bedenken, dass auch eine komplette Inaktivierung der Transgene während der Reprogrammierung keinen Schutz vor einer späteren Reaktivierung während der Differenzierung der iPSZ oder vor Mutationen durch die eingefügten DNA Sequenzen (insertional mutagenesis) darstellt.^{47, 48} Auch wenn konstitutive lentivirale Vektoren zunächst bezüglich der Reaktivierung von Transgenen und der möglichen insertionalen Mutagenese ähnlich problematisch sind, haben sie gegenüber den Retroviren den Vorteil, dass sie sowohl proliferierende als auch nicht-proliferierende Zellen infizieren können und gleichzeitig eine höhere Infektionseffizienz aufweisen. Lentiviren werden auch als induzierbare Systeme zur Reprogrammierung eingesetzt,⁴⁹ in welchen die Aktivität der Transgene durch Zugabe von Doxycyclin gesteuert wird. Aber auch hier verbleibt das Transgen im Genom der iPSZ und ihrer Abkömmlinge und kann theoretisch zu jeder Zeit reaktiviert werden. Dies geschieht nicht bei den sogenannten ausschneidbaren Lentiviren: durch die Verwendung eines loxp/CRE-Rekombinationssystems kann das Transgen gezielt entfernt werden, es bleibt jedoch eine Narbe durch die im Genom verbleibende loxp Se-

45 D. Pannell *et al.*, Silencing of gene expression: implications for design of retroviral vectors, *Rev. Med. Virol.* 11, 2001, 205 ff.

46 A. Hotta *et al.*, Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states, *J. Cell Biochem.* 105, 2008, 940 ff.

47 S. Toivonen *et al.*, Comparative analysis of targeted differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and human embryonic stem cells reveals variability associated with incomplete transgene silencing in retrovirally derived hiPSC lines, *Stem Cells Transl. Med.* 2, 2013, 83 ff.

48 K. Hu, Vectorology and factor delivery in induced pluripotent stem cell reprogramming, *Stem Cells Dev.* 23, 2014, 1301 ff.

49 T. Brambrink *et al.*, Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells, *Cell Stem Cell* 2, 2008, 151 ff.

quenz, so dass eine insertionale Mutagenese nicht ausgeschlossen werden kann. Eine solche Narbenbildung kann durch das PiggyBac (PB) System vermieden werden.⁵⁰ Zunächst wird zwar auch hier das Transgen in das Wirtsgenom integriert, kann aber durch die PB Transposase rückstandsfrei herausgeschnitten werden und somit wird diese Methode häufig zu den nicht-integrierenden Systemen gezählt.

Nicht-integrierende Systeme wie die Einschleusung von Proteinen und mRNA wurden bereits vorgestellt. DNA kann als Plasmid,⁵¹ mit Hilfe episomaler Vektoren⁵² oder als Minicircle-DNA^{53,54} transfiziert werden. Die Minicircle-DNA besitzt den Vorteil, dass sie nicht mehr das bakterielle Plasmidrückgrat beinhaltet und somit potentiell weniger immunogen ist. In allen drei Fällen ist die Reprogrammierungseffizienz jedoch sehr gering. Eine gute Alternative zu den Plasmid-basierten Methoden stellt die Verwendung von Adenoviren oder Sendai Viren (SeV) dar:

Sendai Viren konnten erfolgreich für die Herstellung von iPSZ genutzt werden^{55,56} und können RNA in eine Vielzahl von Zelltypen einschleusen, welches die Wahl der Ausgangszellen deutlich erleichtert. Während zu Beginn der Reprogrammierungsversuche mit Sendai Viren jeweils nur ein Reprogrammierungsfaktor pro Virus enthalten war, sind inzwischen auch Sendai Viren verfügbar, die mehrere Faktoren enthalten können⁵⁷ und auch cGMP-zertifizierte Sendai Viren für iPSZ, die in der Klinik verwen-

-
- 50 K. Woltjen *et al.*, piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Nature* 458, 2009, 766 ff.
 - 51 K. Si-Tayeb *et al.*, Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors, *BMC. Dev. Biol.* 10, 2010, 81 ff.
 - 52 J. Yu *et al.*, Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences, *Science* 324, 2009, 797 ff.
 - 53 F. Jia *et al.*, A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells, *Nat. Methods* 7, 2010, 197 ff.
 - 54 K.H. Narsinh *et al.*, Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors, *Nat. Protoc.* 6, 2011, 78 ff.
 - 55 H. Ban *et al.*, Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 2011, 14234 ff.
 - 56 N. Fusaki *et al.*, Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85, 2009, 348 ff.
 - 57 K. Nishimura *et al.*, Simple and effective generation of transgene-free induced pluripotent stem cells using an auto-erasable Sendai virus vector responding to microRNA-302, *Stem Cell Res.* 23, 2017, 13 ff.

det werden sollen, sind publiziert.⁵⁸ Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die mögliche Persistenz von Viruspartikeln im Zytoplasma der reprogrammierten Zellen. Es ist daher unabdingbar, den Nachweis zu führen, dass die mithilfe dieser Methode hergestellten iPSC-Zellen frei von solchen Partikeln sind. Eine SeV-Vektor-freie iPSC-Population kann durch selektive Eliminierung Viruspartikel-positiver Zellen unter Verwendung von anti-SeV-HN-Antikörpern erreicht werden⁵⁶ oder durch die Nutzung temperatur-sensitiver Sendai Viren, die durch Kultivierung der iPSC bei nicht-permissiven Temperaturen eliminiert werden.⁵⁵

Phasen der Reprogrammierung

Wurden alle Ausgangsbedingungen für die bestmögliche Reprogrammierung gestellt, so durchläuft die zu reprogrammierende Zelle drei entscheidende Phasen auf dem Weg zur iPSC: Initiation, Reifung und Stabilisierung.⁵⁹ Am Ende dieses Prozesses sollte die Zelle alle Eigenschaften einer embryonalen Stammzelle aufweisen: eine epitheliale Morphologie aufweisen und sich unbegrenzt teilen und differenzieren können, welches molekularbiologisch und in Teratombildungs-Assays nachgewiesen werden muss.⁶⁰

Initiation

In der Initiationsphase werden somatische Gene durch Methylierung inaktiviert. Gleichzeitig findet eine Veränderung des Zellmetabolismus von oxidativer Phosphorylierung hin zur Glykolyse statt.⁶¹ *In vivo* unterliegen embryonale Stammzellen in der inneren Zellmasse der Blastozyste einem sauerstoffarmen Milieu und haben wenig Mitochondrien, in denen somati-

58 C.C. MacArthur, A cGMP sendai viral reprogramming kit for generation of clinical-grade iPSC, *Cytotherapy* 19, 2017, e20 ff.

59 K. Hawkins *et al.*, Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming, *World J. Stem Cells* 6, 2014, 620 ff.

60 J.S. Asprey *et al.*, Current methods and challenges in the comprehensive characterization of human pluripotent stem cells, *Stem Cell Rev* 11, 2015, 357 ff.

61 K. Nishimura *et al.*, A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via TCL1 during induced pluripotent stem cell generation, *Stem Cell Reports*. 8, 2017, 787 ff.

sche Zellen durch oxidative Phosphorylierung normalerweise ATP als Energieträger bilden. Embryonale Stammzellen nutzen stattdessen die Glykolyse für die ATP Produktion, welche reaktiviert werden muss. Dies ist unter anderem möglich, wenn sauerstoffarme Kulturbedingungen während des Reprogrammierungsprozesses verwendet werden, welche die *in vivo* Bedingungen in der Blastozyste imitieren.⁶² Gleichzeitig erfolgt auch eine Reaktivierung der Telomerase als Voraussetzung für die unbegrenzte Teilung der reprogrammierten Zellen,⁶³ einem weiteren Merkmal pluripotenter Stammzellen. Weitere Charakteristika der Initiationsphase sind die Erhöhung der Zellproliferation und eine Resistenz gegen Apoptose und Seneszenz verbunden mit der Regulierung von p53 (siehe oben). Eine wichtige Hürde auf dem Weg zur iPSZ ist auch die mesenchymal-epitheliale Transition (MET). Viele der für die Reprogrammierung verwendeten Ausgangszellen sind mesenchymalen Ursprungs und weisen Charakteristika wie Beweglichkeit und Migrationsvermögen auf. Pluripotente Stammzellen wachsen dagegen im Zellverbund, weisen eine Zellpolarität auf und exprimieren Zelladhensionsmarker wie das E-Cadherin, das auch als Reprogrammierungsfaktor geeignet ist.^{64, 65}

Reifung

Die Reifungsphase ist durch die epigenetische Modulation (vornehmlich Demethylierung) von Promotoren der Pluripotenzfaktoren wie NANOG, SALL4, ESRRB, CRIPTO, REX1 oder TCLL und ihre Reaktivierung gekennzeichnet. Diese Phase wurde von Tanabe et al. als der entscheidende

62 H. Shimada et al., Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 2012, 659 ff.

63 L.F. Batista, Telomere biology in stem cells and reprogramming, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 125, 2014, 67 ff.

64 T. Chen et al., E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation, *Stem Cells* 28, 2010, 1315 ff.

65 T. Redmer et al., E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming, *EMBO Rep.* 12, 2011, 720 ff.

Schritt in der Reprogrammierung beschrieben.⁶⁶ Eine ganz wichtige Rolle kommt auch der HDAC2, Histon-Deacetylase 2, zu. HDAC2 verhindert die vollständige Reifung der pre-iPSZ indem es direkt an die Promotoren der Reifungsphase-involvierten Gene bindet und ihre Aktivierung verhindert. Eine Inhibierung von HDAC2 fördert daher die iPSZ-Reifung.⁶⁷

Stabilisierung

In der letzten Phase der Reprogrammierung werden die Zellen unabhängig von den eingeschleusten Transgenen und haben ihr eigenes Netzwerk von Pluripotenzregulatoren vollständig reaktiviert. Diese Phase erreichen häufig weniger als 1% der Ausgangszellen, welche auch als Stabilisationskompetente Zellen bezeichnet werden, die mit einer ganz eigenen Signatur von nicht-kompetenten Zellen unterschieden werden können.^{68, 69}

Auch wenn die Ausgangszellen alle Phasen der Reprogrammierung erfolgreich durchlaufen haben, bleiben „molekulare Hindernisse“ auf dem Weg insbesondere zur klinischen Anwendung von iPSZ zu beachten. Neben der unvollständigen Reprogrammierung und der damit potentiell eingeschränkten Funktion der iPSZ und der schon angesprochenen potentiellen Tumorbildung durch Reaktivierung von Transgenen sind vor allem epigenetische Abnormalitäten und Veränderungen des Erbguts/der Chromosomen zu berücksichtigen. Dennoch finden iPSZ vermehrt Anwendung in der medizinischen Forschung und in der Klinik.

Anwendung von iPSZ

Die Möglichkeit der Herstellung von iPSZ hat die medizinische Forschung so stark vorangebracht wie kaum eine andere Entdeckung und so

66 K. Tanabe *et al.*, Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2013, 12172 ff.

67 T. Wei *et al.*, An HDAC2-TET1 switch at distinct chromatin regions significantly promotes the maturation of pre-iPS to iPS cells, *Nucleic Acids Res.* 43, 2015, 5409 ff.

68 A.A. De Los Angeles *et al.*, Hallmarks of pluripotency, *Nature* 525, 2015, 469 ff.

69 A. Golipour *et al.*, A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network, *Cell Stem Cell* 11, 2012, 769 ff.

werden iPSZ sowohl im nicht-klinischen als auch im klinischen Bereich eingesetzt. Die Reprogrammierung hat allein schon den Blick auf die Vorgänge in der frühesten Entwicklung und in den verschiedenen Stadien der Pluripotenz geschärft. Auch dank der iPSZ können nun dynamische Zusammenhänge zwischen naiver Pluripotenz (wie sie in murinen embryonalen Stammzellen zu finden ist) und der sogenannten „primed pluripotency“ (charakteristisch für humane embryonale Stammzellen) besser verstanden werden.^{70,71} Damit eröffnen sich nicht nur neue Wege für die Herstellung und Kultur der reprogrammierten Zellen, sondern auch für eine bessere Qualitätskontrolle.

Nicht-klinische Anwendung

Ganz besondere Bedeutung haben die iPSZ in der Entwicklung krankheitsspezifischer *in vitro*-Modelle erlangt. Inzwischen gibt es diverse patientenspezifische iPS-Zelllinien für kardiovaskuläre, neurologische, pulmonare, hematologische und endokrinologische Krankheiten. Repositorien, wie das CIRM Coriell Biorepository (<https://catalog.coriell.org/1/CIRM>, aufgerufen am 31.10.2017), die Sammlung der New York Stem Cell Foundation (NYSCF, <https://nyscf.org/research-institute/repository-stem-cell-search/>, aufgerufen am 31.10.2017) oder die European Bank for induced pluripotent stem cells (EBiSC, <http://www.ebisc.org/>, aufgerufen am 31.10.2017) machen Tausende dieser Zelllinien verfügbar für die Forschung. Es übersteigt den Rahmen dieses Übersichtsartikels alle krankheitsspezifischen iPS-Linien aufzuführen, aber unter ihnen finden sich beispielsweise iPS-Zelllinien von Alzheimer- und Parkinsonpatienten ebenso wie Linien von Patienten mit Long-QT-Syndrom, bipolaren Störungen, Depression, Diabetes, ALS oder zystischer und pulmonarer Fibrose. In Verbindung mit immer anspruchsvolleren Differenzierungsmodellen können diese iPSZ die *in vivo* Situation deutlich besser abbilden als andere Zellsysteme einschließlich primärer für *in vitro* Versuche isolierter Zellen.

Ein prominentes Beispiel ist die Aufklärung des Wirkmechanismus des Zika-Virus während der Entwicklung des Gehirns. Dies gelang durch die

70 J. Ooi *et al.*, Pluripotency and its layers of complexity, *Cell Regen.* (Lond) 1, 2012, 7 ff.

71 K. Takahashi *et al.*, A developmental framework for induced pluripotency, *Development* 142, 2015, 3274 ff.

Bildung Gehirnregion-spezifischer Organoide auf der Basis von iPSZ und ESZ.^{72, 73, 74} Viele der iPS-Zelllinien wurden nicht nur dazu verwendet, um die der Krankheit zugrundeliegenden Mechanismen zu analysieren, sondern wurden auch für die Entwicklung und das Screening von Medikamenten eingesetzt. In einer Studie von Liang et al. wurde beispielsweise die Wirkung von Verapamil, Cisapride, Nicorandil und Alfuzosin in iPSZ von Patienten mit Long-QT-Syndrom, hypertropher Kardiomyopathie sowie dilatativer Kardiomyopathie untersucht und mit iPSZ von Kontrollen verglichen.⁷⁵ Derartige Methoden sind inzwischen auch für den automatisierten Hochdurchsatz weiterentwickelt worden.⁷⁶

Eine Kombination der iPS-Technologie mit der Geneditierung wie TALENS oder CRISPR/Cas liefert weitere Vorteile: Einerseits lassen sich durch die Geneditierung isogene Kontrollen herstellen: D.h. eine Zelllinie mit einer krankheitsauslösenden Mutation kann so mit einer Kontrolle verglichen werden, die bis auf die zu untersuchende Mutation genetisch identisch ist. Eine solche Vergleichsstudie wurde zum Beispiel für die Rekapitulation von Alzheimer angewendet.⁷⁷ Andererseits eröffnet die Kombination von iPS-Zellgenerierung und Geneditierung die Möglichkeit der zellbasierten Therapie für monogenetische Erkrankungen. Es gibt einige Beispiele, die dieses Vorgehen möglich erscheinen lassen: das CRISPR/Cas Verfahren wurde angewendet, um die β -Globin-Mutation in iPSZ eines β -

72 X. Qian et al., Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure, Cell 165, 2016, 1238 ff.

73 M. Watanabe et al., Self-organized cerebral organoids with human-specific features predict effective drugs to combat zika virus infection, Cell Rep. 21, 2017, 517 ff.

74 M. Xu et al., Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen, Nat. Med. 22, 2016, 1101 ff.

75 P. Liang et al., Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity, Circulation 127, 2013, 1677 ff.

76 W.L. McKeithan et al., An automated platform for assessment of congenital and drug-induced arrhythmia with hiPSC-derived cardiomyocytes, Front Physiol 8, 2017, 766 ff.

77 D. Paquet et al., Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9, Nature 533, 2016, 125 ff.

Thalassämiepatienten zu korrigieren.⁷⁸ Die korrigierten Zellen konnten in verschiedene hämatopoetische Vorläuferzellen differenziert werden, welche potentiell für die autologe Transplantation genutzt werden könnten.

Klinische Anwendungen

Pluripotente Stammzellen haben in den letzten 8 Jahren über klinische Studien, welche die Sicherheit und Effizienz der Stammzellen testen sollen, langsam den Weg in die Klinik gefunden. Sie zeigen erste positive Ergebnisse hinsichtlich der Effizienz, aber auch die Herausforderungen, die noch zu meistern sind. Die erste Studie wurde von Geron⁷⁹ und später nach Übernahme durch Asterias⁸⁰ in Patienten mit Rückenmarksverletzungen durchgeführt, welche Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die aus humanen ESZ hergestellt wurden, transplantiert bekamen. In einer Presseerklärung gab Asterias bekannt, dass es in der ersten Geron-Studie nach einer vier- bis fünfjährigen Nachsorge zu keinen Abstoßungsreaktionen oder schwerwiegenden Nebenwirkungen kam. Weiterhin konnte in vier von fünf Patienten eine Reduktion der Rückenmarkskavitation beobachtet werden.⁸¹ Eine zweite Studie wurde von Advanced Cell Technology durchgeführt. Hier wurden Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration (AMD) retinales Pigmentepithel (RPE, aus humanen ESZen) mit Erfolg transplantiert.^{82, 83} Derartige Studien wurden auch von anderen Zen-

78 *B. Song et al.*, Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system, *Stem Cells Dev.* 24, 2015, 1053 ff.

79 *J. Alper*, Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product, *Nat. Biotechnol.* 27, 2009, 213 ff.

80 *C.A. Priest et al.*, Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury, *Regen. Med.* 10, 2015, 939 ff.

81 http://asteriasbiotherapeutics.com/inv_news_releases_text.php?releaseid=2244520&date=May+24%2C+2016&title=Asterias+Biotherapeutics+Announces+Positive+New+Long-Term+Follow-Up+Results+for+AST-OPC1, aufgerufen am 31.10.2017.

82 *S.D. Schwartz et al.*, Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report, *Lancet* 379, 2012, 713 ff.

83 *S.D. Schwartz et al.*, Subretinal transplantation of embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium for the treatment of macular degeneration: An assessment at 4 years, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 2016, ORSFC1 ff.

tren erfolgreich durchgeführt.⁸⁴ Da die AMD eine weitverbreitete Krankheit ist, für die es bislang keine Prävention oder Heilung gibt und deren Symptome allenfalls bei frühzeitiger Erkennung gestoppt werden können, sind hier die Anstrengungen besonders hoch, ein Transplantationsverfahren standardmäßig zu etablieren. Zusätzlich bietet sich das Auge als Ort für Transplantationen an, weil es immunprivilegiert ist, d.h. eine geringere Immunantwort zeigt, und darüber hinaus erlaubt, jegliche morphologischen Veränderungen nicht-invasiv zu erfassen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass die erste iPSZ-basierte klinische Studie ebenfalls die Behandlung der AMD zum Ziel hatte. Im RIKEN Institut, Japan, wurde 2014 einer Patientin zum ersten Mal aus autologen iPSZ hergestelltes RPE erfolgreich transplantiert. Die Studie musste jedoch schon beim zweiten Patienten abgebrochen werden, weil sich in den iPSZ dieses Patienten Mutationen (eine davon in einem Onkogen) fanden.⁸⁵ Dies zeigt, dass Sequenzierungen des Gesamtgenoms von den Ausgangszellen und daraus hergestellten iPSZ neben den konventionellen cytogenetischen Analysen unbedingt erforderlich sind. Im Februar 2017 kündigte RIKEN den Beginn einer neuen Studie mit allogenen (Spender-fremden) iPSZ-basierten RPE an.⁸⁶ Andere Einsatzgebiete für iPSZ-basierte Therapien könnten Diabetes mellitus oder Herzversagen sein. Hier liegen derzeit jedoch nur Genehmigungen für ESZ-basierte Studien vor (ViaCyte Studie „A Safety, Tolerability, and Efficacy Study of VC-01™ Combination Product in Subjects With Type I Diabetes Mellitus“, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02239354 und Assistance Publique – Hôpitaux de Paris Studie “Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure (ESCORT)”, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02057900).

Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der enorme Fortschritt, der in den letzten Jahren bezüglich der iPS-Technologie gemacht worden ist, auch

84 *W.K. Song et al.*, Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients, *Stem Cell Reports*. 4, 2015,860 ff.

85 *M. Mandai et al.*, Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration, *N. Engl. J. Med.* 376, 2017, 1038 ff.

86 http://www.riken.jp/en/pr/topics/2017/20170207_1/, aufgerufen am 31.10.2017.

viele Verbesserungen in der Zukunft hinsichtlich der Aufdeckung von Mechanismen, die Krankheiten auslösen, der Entwicklung von neuen Wirkstoffen sowie der klinischen Anwendung von iPSZ-basierten Therapien bringen wird. Hürden wie die Wahrung der genomischen, transkriptionalen und epigenetischen Stabilität der iPSZ, die Variabilität der iPSZ-Differenzierung und andere werden derzeit intensiv erforscht, so dass sie hoffentlich in nicht allzu ferner Zukunft überwunden werden können.

Die vom BMBF geförderte internationale und interdisziplinäre Klausurwoche „Moral Frontiers in Regenerative Medicine pertaining to the Use of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells“ in Halle (Saale)

*Susanne Müller, Timo Faltus**

Zusammenfassung: Es gibt aktuell keinen globalen und allgemeingültigen Konsens zur Verwendung früher menschlicher Entwicklungsstadien als Ausgangsmaterial für Forschungs- und Therapiezwecke. National wie international sowie innerhalb der einzelnen ELSI-Disziplinen wird die Begriffsdefinition des Lebensbeginns kontrovers diskutiert. Die Erforschung und Entwicklung von Therapeutika auf Grundlage von adulten und iPS-Zellen steht dagegen in einem anderen Kontext und Problemfeld und ist nicht mit dem originären ELSI-Diskurs verbunden, der im Zusammenhang mit humanen embryonalen Stammzellen entstanden ist. Im Rahmen einer vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten internationalen und interdisziplinären Klausurwoche haben Nachwuchswissenschaftler verschiedener ELSI-Disziplinen die ethischen, rechtlichen und sozialwissenschaftlichen Aspekte der Verwendung verschiedener Stammzellen zu therapeutischen Zwecken für die Länder Deutschland, Großbritannien, USA sowie Kanada diskutiert. Das Klausurwochenformat bot hierbei auch die Möglichkeit zum Training einer fächerübergreifenden Arbeits- und Kommunikationsform sowie eines disziplinübergreifenden Verständnisses.

Summary: There is no global and universal consensus on the use of early human developmental stages as a material source for research or therapeutic purposes at the moment. Nationally and internationally as well as within the ELSI disciplines, the definition of the beginning of life is controversially discussed. Research and development of adult and iPS cell-based therapeutics have to be discussed in a different context and is not linked to the original ELSI discourse that has emerged in the context of human embryonic stem cells. As part of an international and interdisciplinary retreat sponsored

* Dieser Beitrag entstand im Rahmen der vom BMBF geförderten Klausurwoche „Moralische Grenzen der Regenerativen Medizin am Beispiel der Verwendung humaner embryonaler Stammzellen“, [Moral Frontiers of Regenerative Medicine Regarding the Use of Human Embryonic Stem Cells], Förderkennzeichen 01GP1488; sowie im Rahmen des vom BMBF geförderten Verbundforschungsprojekts „GenomELECTION: Genomeditierung – Ethische, rechtliche und kommunikationswissenschaftliche Aspekte im Bereich der molekularen Medizin und Nutzpflanzenzüchtung“, Förderkennzeichen 01GP1614A.

by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), junior researchers from various ELSI disciplines have examined ethical, legal and social aspects of using different stem cell types for therapeutic purposes for Germany, the United Kingdom, the United States, and Canada. The retreat format also offered the opportunity to train a multidisciplinary form of work and communication as well as a cross-disciplinary understanding.

Anlass der Förderung

Die modernen Lebenswissenschaften helfen bei der Lösung gesellschaftlicher Herausforderungen wie der Bekämpfung von Volkskrankheiten oder der Sicherstellung der Welternährung. Dabei werfen Forschung und Entwicklungen in den modernen Lebenswissenschaften auch ethische, rechtliche und soziale Fragen auf, die den Einzelnen ebenso wie die Gesellschaft insgesamt betreffen können. Da es zu den Aufgaben einer innovationsorientierten Forschungspolitik gehört, diese Fragen zu beachten und die nationalen und internationalen Diskussionsprozesse dazu wissenschaftlich fundiert zu begleiten, unterstützt das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) seit 1997/98 einen eigenständigen Förderschwerpunkt zu den ethischen, rechtlichen und sozialen Aspekten moderner Lebenswissenschaften, kurz ELSA, jährlich mit ca. 4,5 Millionen Euro. Das Zusammenwirken verschiedener Forschungsrichtungen über die Grenzen der jeweils eigenen Disziplin hinweg ist dabei ein erfolgsentscheidender Baustein für funktionierende ELSA-Forschung. Hierzu müssen daher die traditionell eher isoliert voneinander handelnden Forschungsdisziplinen aus den medizinisch-naturwissenschaftlichen und den geistes- bzw. sozialwissenschaftlichen Fächern in Beziehung und Interaktion gebracht sowie füreinander interessiert werden. Ein aktuelles Beispiel aus dem ELSA-Förderbereich ist die Beforschung der ethischen, rechtlichen und sozialen Fragen zur Stammzellforschung. Im Rahmen dieses Förderprogramms werden u.a. in internationalen Klausurwochen aktuelle und künftige Fragestellungen fachübergreifend beforscht. Die dabei erarbeiteten wissenschaftlich gestützten Analysen können dann als Grundlage für die gesellschaftliche Diskussion und gesetzgeberische und andere politische Entscheidungen

genutzt werden.¹ Die Klausurwochenförderung des BMBF richtet sich insbesondere an den forschenden ELSA-Nachwuchs und schafft Forschungs- und Entwicklungsmöglichkeiten für interdisziplinär orientierte ELSA-Forschung. Hierzu wird dem wissenschaftlichem Nachwuchs durch Förderung von Klausurwochen die Möglichkeit zum Training von fächerübergreifenden Arbeits- und Kommunikationsfähigkeiten geboten. Diese Förderung trägt dadurch auch dem Umstand Rechnung, dass in der Nachwuchsförderung zunehmend international gearbeitet wird.² Im Rahmen dieses Förderkonzepts³ wurde vom 18. bis 22. Juni 2017 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Juristischer Bereich, die fünftägige BMBF-Klausurwoche „Moral Frontiers in Regenerative Medicine pertaining to the Use of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells“ durchgeführt, die gemeinschaftlich von der Friedrich-Schiller-Universität Jena (koordinierende Einrichtung) und der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg organisiert wurde.

Naturwissenschaftlich-medizinischer sowie ELSA-Hintergrund der Klausurwoche

Stammzellen – Systematik und natürliche Aufgaben

Innerhalb der bereits vorhandenen und der gegenwärtig erforschten Therapieansätze der Regenerativen Medizin spielen Stammzellen eine entscheidende Rolle, da gerade sie die Prinzipien der Regenerativen Medizin, also die Verwendung von regenerativen, auf lebenden Zellen basierenden Technologien zur Behandlung von Gewebe- und Organschäden, umzusetzen helfen. Unter der Bezeichnung „Stammzellen“ werden allgemein und im Gegensatz zu den spezialisierten Zellen des Körpers wie Haut-, Herz- oder Leberzellen, unspezialisierte, dafür aber unbegrenzt teilungsfähige Zellen

1 S. dazu: <https://www.bmbf.de/de/bioethik-gesellschaftliche-herausforderungen-durch-die-modernen-lebenswissenschaften-137.html>, <https://gesundheitsforschung-bmbf.de/de/bioethik.php> (abgerufen jeweils 20.2.2018).

2 S. dazu: <https://gesundheitsforschung-bmbf.de/de/nachwuchsforderung-klausurwochen-5037.php> (abgerufen jeweils 20.2.2018).

3 Hier: Bekanntmachung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung vom 26.11.2013 von Richtlinien zur Förderung von internationalen Klausurwochen auf dem Gebiet der ethischen, rechtlichen und sozialen Aspekte der modernen Lebenswissenschaften.