

1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Humane Stammzellen sind aufgrund ihrer inhärenten Eigenschaften, ihrer Regenerationsfähigkeit und ihres Entwicklungspotenzials nicht nur ein geeignetes Forschungsobjekt zur Untersuchung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen im menschlichen Körper, sie können darüber hinaus zukünftig auch als potenzielle Zellquelle für die Erforschung und die Behandlung zahlreicher Krankheiten dienen. Die therapeutische Eignung wird dabei vor allem von den unterschiedlichen Eigenschaften embryonaler und adulter Stammzellen bestimmt (siehe Tabelle 1).

Je nach ihrer Herkunft unterscheidet man gewebespezifische (adulte) Stammzellen, embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und embryonale Keimzellen (EG-Zellen). ES-Zellen werden aus undifferenzierten Zellen früher Embryonalstadien von Säugern gewonnen, EG-Zellen aus den Vorläufern von Keimzellen aus Embryonen oder frühen Föten und adulte Stammzellen aus den verschiedensten Geweben eines Organismus. Gemeinsames Merkmal aller Stammzellen sind ihre Vermehrungsfähigkeit sowie ihre Fähigkeit, in einzelne oder mehrere Zelltypen auszureifen (sich zu differenzieren). Die entwicklungsbiologischen Potenziale sind in den embryonalen, fötalen und adulten Stammzellen in unterschiedlichem Maße ausgeprägt. Ideal für eine Zelltherapie wäre die Möglichkeit, adulte Zellen eines Patienten zu entnehmen, in den benötigten Zelltyp umzuwandeln und den Patienten mit diesen ursprünglich körpereigenen Zellen zu behandeln. Dies könnten zum einen adulte Stammzellen sein oder somatische Zellen, die nach Reprogrammierung Eigenschaften pluripotenter Stammzellen aufweisen.

1.1 Eigenschaften gewebespezifischer (adulter) Stammzellen

Gewebespezifische Stammzellen (adulte Stammzellen) bilden im Verlauf der Embryonalentwicklung die einzelnen Gewebe- und Organsysteme. Adulte Stammzellen können sich somit selbst erneuern und zu spezialisierten Zelltypen

1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Tabelle 1 Detaillierter Vergleich der Eigenschaften von embryonalen und adulten Stammzellen (nach Lemoli et al., 2005)

Parameter	ES-Zellen	AS-Zellen
Vorkommen	Blastomeren, ICM, Blastozysten	Zahlreiche Körpergewebe
Langzeit ‚self-renewal‘	unbegrenzte symmetrische Teilung	Homöostase der adulten Stammzellen während der gesamten Lebenszeit des Organismus
Potenzialität	Pluripotenz <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	Multipotenz (hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen, MAPCs nach <i>in vitro</i> -Kultur)
Klonogenität <i>in vitro</i>	Eine einzelne ES-Zelle kann einen Klon undifferenzierter pluripotenter ES-Zellen bilden	Eine einzelne AS-Zelle kann einen Klon differenzierter Zellen bilden, der Mechanismus ist <i>in vivo</i> unbekannt
Zellschicksal	können proliferieren und differenzieren	können zur Differenzierung induziert werden
Zellzyklus	ES-Zellen fehlt der G1-checkpoint, sie befinden sich vorwiegend in der S-Phase	AS-Zellen befinden sich im Ruhestadium, benötigen Stimulus für DNA-Replikation und Übergang in den Zellzyklus
Plastizität	unbegrenzt entwicklungs-fähig in funktionelle Zellen	Funktionelle Plastizität ist noch nicht eindeutig definiert (auf Transkriptebene häufig vorhanden)

ES:	Embryonale Stammzelle
AS:	Adulte Stammzelle
G1-, S-Phase:	Phasen des Zellzyklus
ICM:	Innere Zellmasse der Blastozyste (engl.: inner cell mass)
MAPC:	Multipotente adulte Vorläuferzelle (engl.: multipotent adult progenitor cell)

heranwachsen. Zellen mit dieser Fähigkeit benötigt der Körper nicht nur während der Embryogenese, sondern auch im Erwachsenenstadium, um Zellen, die durch Verletzung oder Zellverlust zugrunde gehen, zu ersetzen.

Das Vermögen zur Selbsterneuerung von Zellen und Geweben ist in der Natur sehr unterschiedlich ausgeprägt. Bei niederen Tieren (zum Beispiel Planarien, Regenwürmer) und einigen Amphibien (zum Beispiel Salamander, Wassermolch) können ganze Körperteile oder Gliedmaßen nachwachsen, wenn sie durch Verletzung verloren gehen. Bei Säugern werden nur bestimmte Gewebe, wie Haut, Haare, Blut und Darmepithel, ständig erneuert. Diese Gewebe enthalten hochaktive Stamm- und Vorläuferzellen, die bei Bedarf aktiviert werden. Dagegen sind in anderen Geweben (zum Beispiel Herz, Bauchspeicheldrüse) Stammzellen nur in geringer Anzahl enthalten und schwierig zu isolieren.

Erläuterung 1: Was ist Totipotenz – Pluripotenz – Multipotenz?

Totipotenz: Totipotente Zellen haben die Fähigkeit, Gewebe aller Keimblätter, einschließlich von Trophoblastzellen, zu bilden und sich in einen lebensfähigen Organismus zu entwickeln. Totipotent sind zum Beispiel befruchtete Eizellen.

Mithilfe der Kerntransfertechnik (somatic cell nuclear transfer, SCNT oder NT, auch „Dolly“-Verfahren) könnten auch adulte differenzierte Zellen in ein potenziell totipotentes Stadium reprogrammiert werden.

Pluripotenz: Pluripotente Stammzellen können spezialisierte Zellen aller Keimblätter sowie Keimzellen (Spermien und Eizellen) bilden, sich aber selbst nicht in einen lebensfähigen Organismus entwickeln. Embryonale Stammzellen sind pluripotent.

Multipotenz: Multipotente Stammzellen können sich in verschiedene Zelltypen einer bestimmten Linie entwickeln. Für einige gewebespezifische adulte Stammzellen wurde Multipotenz nachgewiesen.

In einigen Spezialkliniken werden Stammzellen des Knochenmarks bereits für Gewebeersatz bei Knorpel- und Knochendefekten eingesetzt (Bruder et al., 1994; Caplan, 2005). Seit einigen Jahren finden klinische Studien zum Einsatz von Knochenmarkstammzellen für die Regeneration von Herzgewebe bei Patienten mit Herzinfarkt statt. Die Ergebnisse der Studien bei Herzinfarktpatienten sind allerdings widersprüchlich, eine regenerative Wirkung der Knochenmarkstammzellen ist noch nicht bekannt (siehe Kapitel 2.1.2). Weiterhin wird die Regenerationsfähigkeit von Hautgewebe genutzt, um beispielsweise Hautpartien, die durch Verbrennungen geschädigt sind, durch in Zellkultur vermehrte Zellen der Haut zu ersetzen. Von besonderer Bedeutung sind auch die Stammzellen des Nabelschnurbluts, die sich durch geringe Immunität auszeichnen (siehe Kapitel 2.1). Der Einsatz adulter Stammzellen für die Zelltherapie hätte gegenüber den ES-Zellen den Vorteil, dass mit dieser Strategie Abstoßungsreaktionen vermieden werden könnten, da es sich meist um körpereigene (autologe) Zellen handelt. Autologe adulte Stammzellen können aber nicht eingesetzt werden, wenn die Erkrankung eine genetische Basis besitzt. Außerdem nimmt nicht nur die Zahl der adulten Stammzellen im Verlaufe eines Lebens ab, sondern die Zellen altern auch. Momentan ist nicht absehbar, welche adulten Stammzellen zur Therapie neuraler Erkrankungen eingesetzt werden können.

1.2 Gewinnung und Eigenschaften pluripotenter Stammzellen

1.2.1 Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

1.2.1.1 Gewinnung embryonaler Stammzellen

Unter dem Begriff Embryo werden verschiedene frühe Stadien der Embryonalentwicklung zusammengefasst. Zum Status des „Embryos“ wird in Kapitel 3.2 ausführlich Stellung genommen. Das früheste Embryonalstadium, die befruchtete Eizelle, wird auch als Zygote bezeichnet. Spätere Stadien sind die Morula, die aus acht bis 16 Zellen besteht, und die Blastozyste. Diese besteht aus einer inneren Zellgruppe, aus der sich der Embryo entwickelt (inner cell mass), und einer äußeren, die die Plazenta bildet (siehe Abbildung 4). Die Embryonalentwicklung beim Menschen endet mit Abschluss der neunten Entwicklungswoche, danach spricht man von Fötus und Fötalentwicklung.

ES-Zellen werden aus sehr frühen Embryonalstadien (Acht-Zell-Stadium bis Blastozyste) von Säugetieren gewonnen. Sie können sich in Zellkultur unter bestimmten Bedingungen weiter vermehren, ohne zu differenzieren (Thomson et al., 1998; Thomson and Marshall, 1998). Die bisher angewandten Verfahren führen zu einer Zerstörung des Embryos. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass zumindest bei der Maus auch das Anlegen solcher Zellkulturen aus nur einzelnen (Blastomeren) Zellen möglich ist und damit der Embryo lebensfähig bleibt (Chung et al., 2006). Vermutungen, dass diese Methode auch für menschliche Zellen erfolgreich angewendet werden kann, ließen sich bisher nicht bestätigen (Klimanskaya et al., 2006). Nach den bislang an ES-Zellen der Maus gewonnenen Erfahrungen lassen sich die aus Embryonen entnommenen ES-Zellen als permanente Zelllinien dauerhaft und nahezu unbegrenzt im undifferenzierten Zustand kultivieren und über lange Zeiträume hinweg tiefgefroren aufbewahren. Von menschlichen ES-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie zumindest über 250 Generationen hinweg in Kultur gehalten werden können und dabei ihre Pluripotenz (siehe Kasten Erläuterung 1) erhalten (Amit et al., 2000).

1.2.1.2 Eigenschaften embryonaler Stammzellen

ES-Zellen zeichnen sich nicht nur dadurch aus, dass sie sich langfristig in Kultur vermehren, sie können sich auch in viele verschiedene Körperzellen entwickeln. Um eine Ausreifung in gewebespezifische Zelltypen einzuleiten, werden ES-Zellen beispielsweise für einige Tage in Form von Zellverbänden kultiviert. Derartige Zellverbände werden auch als „Embryoid-Körper“ (embryoid bodies) bezeichnet. Diese Bezeichnung ist insofern irreführend, als „embryoid bodies“

keine Embryonen sind und sich nach derzeitigem Erkenntnisstand auch nicht als Embryonen weiterentwickeln können. In der Regel führt die spontane Ausreifung von ES-Zellen in der Zellkultur zu einem Gemisch verschiedener Zelltypen, darunter kontrahierende Herzmuskelzellen, neuronale Zellen, Fettzellen, Zellen des Immunsystems, Knorpelzellen (Übersicht bei Wobus and Boheler, 2005). Mithilfe spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ist es nun möglich, gezielt hochreine Populationen definierter Zelltypen zu isolieren. Letzteres ist eine Grundvoraussetzung für die therapeutische Verwendung von ES-Zellen. Eine Verunreinigung mit unreifen pluripotenten ES-Zellen könnte ansonsten nach Transplantation zur Bildung von unerwünschtem Fremdgewebe oder auch von Tumoren führen (Stevens, 1983).

1.2.1.3 Forschung an und mit embryonalen Stammzellen

Die Forschung an embryonalen Stammzellen verfolgt unterschiedliche Ziele. Aus Sicht der Grundlagenforschung geht es um die Frage, wie und unter welchen Bedingungen sich solche Zellen zu bestimmten spezialisierten Zelltypen entwickeln, was bei diesen Prozessen spezifisch für die frühe Embryonalentwicklung des gesunden Menschen ist und welche Abweichungen bei genetischen Krankheiten auftreten.

Die mögliche therapeutische Eignung von ES-Zellen bezieht sich auf ihren Einsatz in Zellersatzstrategien (siehe Abbildung 1 und Kapitel 1.2.2).

Eine Transplantation von aus ES-Zellen abgeleiteten, nicht körpereigenen Spenderzellen würde allerdings zu immunologischen Abstoßungsreaktionen führen, deren Beherrschung dieselbe medikamentöse Behandlung mit allen ihren Nebenwirkungen erfordern würde, wie sie heute bei Organtransplantationen notwendig und üblich ist. Ein entscheidender Vorteil von ES-Zellen könnte jedoch sein, dass sich praktisch jedes ihrer Gene entfernen, ersetzen oder modifizieren ließe. Es könnten also gezielt Gene ausgeschaltet werden, deren Produkte an der Krankheitsentstehung oder an der Auslösung von Abstoßungsreaktionen beteiligt sind, andererseits könnten vor einer Transplantation therapeutisch bedeutsame Gene in ES-Zellen eingeführt werden.

1.2.2 Embryonale Stammzellen nach Kerntransfer

Durch den Transfer des Zellkerns einer adulten Körperzelle in eine zuvor entkernte Eizelle kann der Zellkern der Körperzelle reprogrammiert werden. Nach Übertragung einer solchen rekonstruierten Eizelle in ein scheinträchtiges Tier kann es zur normalen Entwicklung eines Fötus kommen. Diese als somatische Kerntransfertechnik (engl.: somatic cell nuclear transfer, SCNT) bezeichnete Methode wurde bisher bei mehreren Tierarten erfolgreich angewendet. Sie könnte auch dazu dienen, *in vitro* Blastozysten zu erzeugen, aus denen körper-

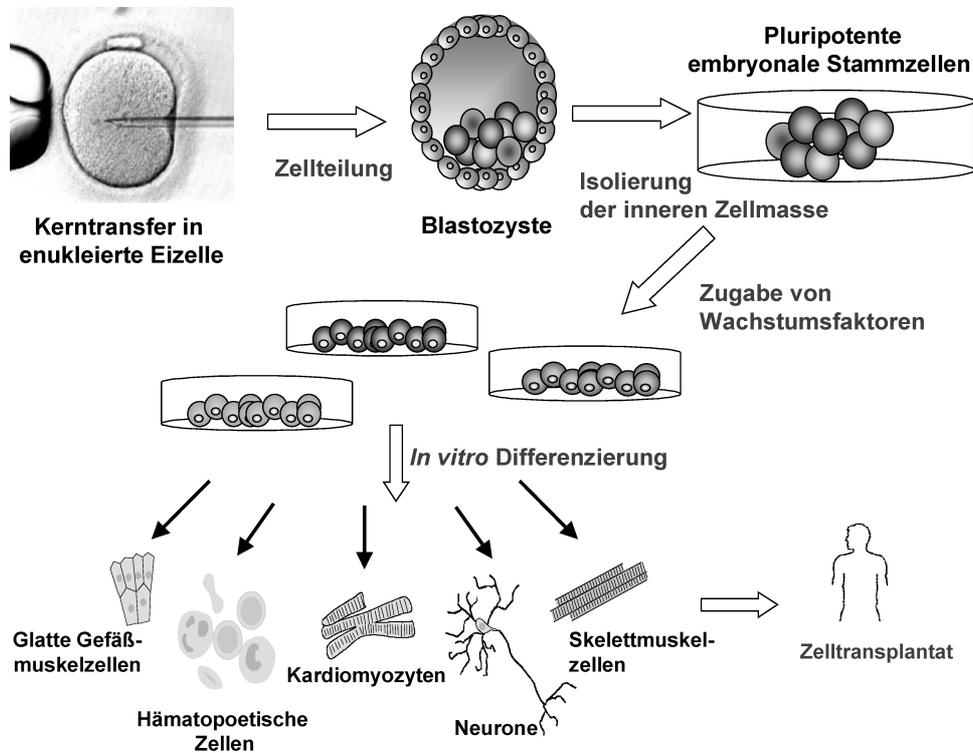


Abbildung 1 Gewinnung von HES-Zellen nach Kerntransfer als Quelle zur Gewebezüchtung für die Transplantation

eigene ES-Zellen für die autologe Zellersatz-Therapie gewonnen werden könnten. Man spricht dann von „Forschungs-Klonen“ oder „therapeutischem Klonen“.

Die auf diese Weise durch Kerntransfer (engl.: nuclear transfer, NT) gewonnenen NT-ES-Zellen sind bis auf das mitochondriale Genom mit dem (Kern-)Genom der Spenderzelle identisch. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass die abgeleiteten ES-Zellen nicht von denen zu unterscheiden sind, die nach Befruchtung entstanden sind (Brambrink et al., 2006), obwohl die Expression von Genen in diesen Konstrukten äußerst aberrant sein kann.

In verschiedenen Labors wird angestrebt, im humanen System autologe, das heißt patienteneigene Ersatzzellen für eine Zelltransplantation zu entwickeln. Dabei würde, wie bei adulten körpereigenen Stammzellen, das Problem einer immunologischen Unverträglichkeit nicht auftreten, sodass die Notwendigkeit der Suppression der Immunreaktion entfallen könnte.

Ein anderer Vorteil dieser Methode läge in der Möglichkeit, Stammzellen von Patienten mit schweren Krankheiten zu gewinnen und an ihnen die Entste-

hungsmechanismen und Behandlungsmöglichkeiten dieser Krankheiten zu erforschen (siehe Kapitel 2.2.7).

1.2.3 Embryonale Keimzellen (EG-Zellen)

Menschliche embryonale Keimzellen (EG-Zellen) können aus den Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen, sogenannten primordialen Keimzellen, gewonnen werden. Humane EG-Zellen wurden aus Embryonen beziehungsweise Föten der fünften bis elften Schwangerschaftswoche isoliert (Shamblott et al., 1998, 2001).

Während bei der Maus EG-Zellen in ähnlicher Weise wie ES-Zellen über ein nahezu unbegrenztes Proliferations- und Entwicklungspotenzial verfügen, „embryoid bodies“ bilden und sich in eine Vielzahl spezialisierter Zelltypen differenzieren können, ist die Vermehrungs- und Entwicklungsfähigkeit humaner EG-Zelllinien offenbar begrenzt. Selbst in den Laboratorien von J. Gearhart und P. Donovan, in denen zuerst humane EG-Zellen gewonnen wurden (Shamblott et al., 1998), werden sie kaum noch eingesetzt. Obwohl die Verwendung humaner EG-Zellen in vielen Ländern rechtlich weitaus unproblematischer wäre als die Verwendung von HES-Zellen, spielen sie in der Forschung nur eine eher untergeordnete Rolle. Dies zeigt sich auch daran, dass bisher nur sehr wenige Arbeiten über die Entwicklungsfähigkeit von humanen EG-Zellen veröffentlicht wurden – im Gegensatz zu den Hunderten von Publikationen über HES-Zellen.