

# Aktuelle Entwicklungen in der Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen

**Die vorliegende Studie stellt aktuelle Ergebnisse der Forschung an humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) vor. Schwerpunkt der Analyse sind Ergebnisse aus den Jahren 2005 und 2006, die unter dem Gesichtspunkt des Einsatzes von hES-Zellen für die Grundlagen- und angewandte Forschung erörtert werden. Im Mittelpunkt stehen Fortschritte in der Herstellung neuer hES-Zell-Linien, Daten über Anzahl und Qualität derzeit verfügbarer Zell-Linien sowie neue Erkenntnisse hinsichtlich der Eigenschaften von NIH-konformen hES-Zell-Linien, u. a. in Bezug auf Faktoren, die deren genetische und epigenetische Stabilität beeinflussen können. Die Studie dokumentiert und diskutiert ferner die Verwendung von hES-Zell-Linien in der aktuellen internationalen Forschung.**

Die Stammzellforschung ist ein stark expandierendes, innovatives und international hoch kompetitives Forschungsgebiet. Ein Ziel der Stammzellforschung ist es, die molekularen und zellbiologischen Grundlagen der Vermehrung und Differenzierung von Stammzellen zu verstehen und Methoden für ihre gerichtete Entwicklung in therapeutisch nutzbare Zelltypen zu erarbeiten. Der Erkenntnisfortschritt bezieht sich dabei gleichermaßen auf die Forschung an embryonalen und adulten<sup>1</sup> Stammzellen (hochgestellte Zahlen verweisen auf Anmerkungen, S. 237). Adulte Stammzellen werden bereits seit langem in der Hämatologie zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt, und in aktuellen klinischen Studien werden weitere Therapieverfahren mit adulten Stammzellen erprobt [1–3]. Die Forschung an adulten Stammzellen ist jedoch nicht Gegenstand dieses Beitrags.

Im Unterschied zu adulten Stammzellen gibt es auf der Grundlage humaner ES-Zellen derzeit noch keine Therapien, obwohl erste klinische Studien angekündigt wurden [4, 5]. Tatsächlich besteht vor der Entwicklung von standardisierten Therapien mit hES-Zell-Derivaten noch ein erheblicher Forschungsbedarf, insbesondere hinsichtlich der möglichen Tumorigenität von Transplantaten infolge von Verunreinigungen mit undifferenzierten hES-Zellen sowie bezüglich der potentiellen Immunogenität hES-Zell-abgeleiteter Transplantate. In der derzeitigen Diskussion wird jedoch meist übersehen, dass sich der Einsatz von hES-Zellen auch auf stärker anwendungsorientierte Forschungsfelder außerhalb der zellbiologischen Grundlagenforschung erstreckt und damit wesentlich zum Erkenntnisgewinn in verschiedenen Wissenschaftsdisziplinen beiträgt. hES-Zellen werden gegenwärtig vor allem zur Untersuchung spezifischer Fragestellungen auf folgenden Gebieten eingesetzt:

- zur Analyse von Prozessen der menschlichen Embryonalentwicklung sowie früher Differenzierungsvorgänge im Menschen an einem *In-vitro*-Zellmodell. Diese Erkenntnisse lassen sich nicht mit anderen Modellsystemen gewinnen;
- zur Identifizierung von Faktoren, die Pluripotenz und unbegrenzte Vermehrungsfähigkeit von Stammzellen regulieren. Diese Erkenntnisse sind auch für die Erforschung der Reprogrammierbarkeit somatischer Zellen sowie für die Aufklärung der Mechanismen der Vermehrung humaner adulter Stammzellen von Bedeutung;
- zur Etablierung von *In-vitro*-Zellsystemen für die Identifizierung neuer Wirkstoffe (z. B. Differenzierungsfaktoren) für die regenerative Medizin, für die Testung pharmakologisch wirksamer Substanzen sowie für die Toxizitätstestung von Wirkstoffen und Chemikalien und die Analyse ihrer Wirkung auf frühe embryonale Differenzierungsprozesse (z. B. in der Reproduktionstoxikologie) [6, 7];
- zur Gewinnung von spezialisierten humanen Zellpopulationen.

Auf allen genannten Gebieten werden hES-Zellen bereits heute eingesetzt, und ihre über die Forschung hinausgehende Anwendung ist für die nahe Zukunft zu erwarten. Eine wichtige Rolle spielen humane ES-Zellen als Modell zur Identifizierung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die für das Verständnis von Zellregenerationsprozessen sowie gegebenenfalls für die Entwicklung von neuen Wirkstoffen von Bedeutung sein können [8]. Ferner sind ES-Zellen der Maus bereits seit mehreren Jahren Bestandteil von Testverfahren zur Untersuchung von chemischen Wirkstoffen auf ihre embryotoxische und teratogene Wirkung („Embryonaler Stammzell-Test“, EST, [9]), und diese

Einsatzmöglichkeit wird nun auch zunehmend für humane ES-Zellen untersucht [10, 11]. In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass aufgrund neuer Vorschriften der EU zur Testung von Chemikalien (REACH, *Rules on the Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) in den kommenden Jahren ca. 30 000 chemische Substanzen, die in großen Mengen (über 1 Tonne pro Jahr) produziert werden, auf ihre embryotoxische Wirkung hin untersucht werden müssen. Derzeit werden hierfür kostenintensive und oftmals nicht adäquate Tierversuche durchgeführt [12].

**Fazit 1: Humane ES-Zellen werden bereits heute zusätzlich zu ihrem Einsatz in der Grundlagenforschung zur Entwicklung von Wirkstoffen für die regenerative Medizin genutzt. Darüber hinaus werden Modellsysteme mit hES-Zellen für die Toxizitätstestung entwickelt. Auf diesen Gebieten ist in naher Zukunft mit einer deutlichen Ausweitung des Einsatzes von hES-Zellen zu rechnen, während ihre häufig diskutierte Verwendung für zellbasierte Therapien vermutlich erst auf längere Sicht möglich sein wird [13].**

### Forschung an hES-Zellen in Deutschland

Das Stammzellgesetz bietet seit 2002 auch deutschen Wissenschaftlern die Möglichkeit zur Forschung an bestimmten hES-Zell-Linien. Diese Möglichkeit wird bislang von 14 Forschungsgruppen in insgesamt 20 vom Robert Koch-Institut (RKI) genehmigten Projekten wahrgenommen (Stand 01.03.2007). Die Forschung an hES-Zellen ist durch das Stammzellgesetz (StZG) vom Juni 2002 geregelt [14]. Danach dürfen deutsche Forscher ausnahmsweise bestimmte hES-Zell-Linien nach Deutschland importieren, wenn das Forschungsprojekt, in dessen Rahmen die Zellen verwendet werden sollen, hochrangigen Forschungszielen dient, wenn die Arbeiten mit hES-Zellen so weit wie möglich vorgeklärt sind und wenn begründet dargelegt wurde, dass sich der gewünschte Erkenntnisgewinn nur mit Hilfe von hES-Zellen (und nicht mit anderen Zellen) erreichen lässt. Die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES) beurteilt die eingereichten Projekte nach den Vorgaben des StZG und berät die Genehmigungsbehörde, das Robert Koch-Institut, bei der Entscheidung über die Anträge auf Einfuhr und Verwendung humaner ES-Zellen. Ferner müssen die hES-Zell-Linien, die für die Forschung in Deutschland verwendet werden dürfen, bestimmten Kriterien entsprechen. Nach dem StZG ist die Einfuhr und Verwendung von hES-Zellen nur dann statthaft, wenn diese unter anderem vor dem 01. 01. 2002 gewonnen worden sind (sog. Stichtagsregelung). Dadurch sind in Deutschland im wesentlichen jene hES-Zell-Linien nutzbar, die im Register des *National Institute of Health* der USA (NIH) seit August 2001 aufgeführt sind (sogenannte NIH-Linien) [15].

Die in Deutschland bearbeiteten Fragestellungen betreffen viele verschiedene Aspekte der hES-Zell-Forschung und reichen von Untersuchungen über Mechanismen, die der

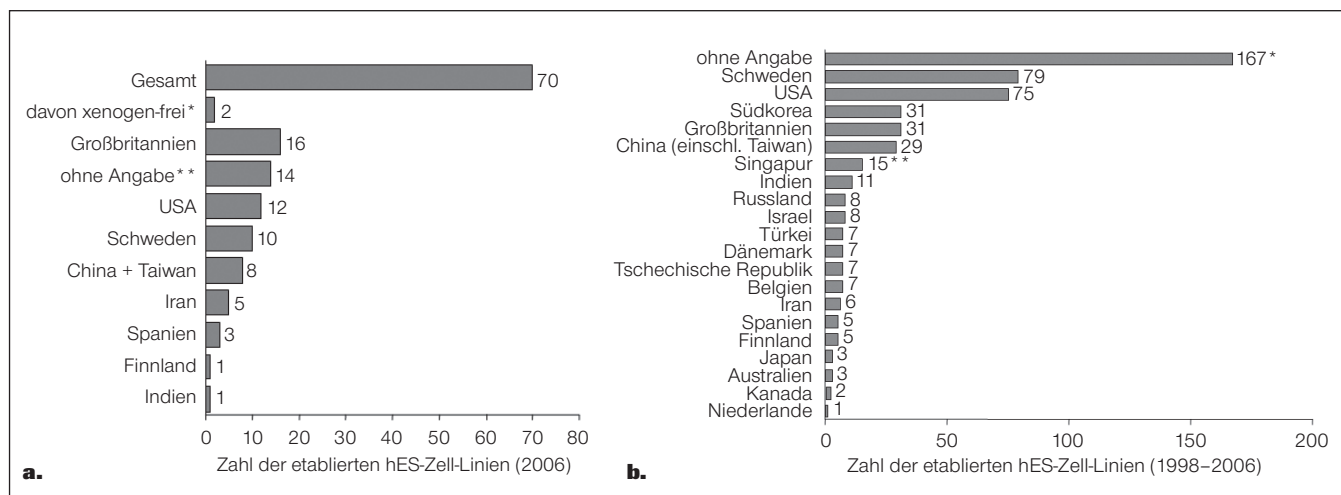
Aufrechterhaltung der Pluripotenz in hES-Zellen dienen, über die Erarbeitung von Methoden zur verbesserten Kultivierung und Kryokonservierung dieser Zellen bis hin zu Vorhaben, in denen die Differenzierung von hES-Zellen zu verschiedenen spezialisierten Zelltypen (beispielsweise zu neuronalen Zellen, pankreatischen  $\beta$ -Zellen, Leberparenchymzellen oder Herzmuskelzellen) untersucht werden soll (Angaben zu den einzelnen Projekten: siehe Register des RKI [16]). Vier der mit hES-Zellen arbeitenden Gruppen haben Ergebnisse ihrer Forschung bislang in insgesamt 11 wissenschaftlichen Publikationen vorgestellt, 8 davon im Jahr 2006. Hinzuweisen ist hier auf die im jüngsten Tätigkeitsbericht der ZES getroffene Aussage, dass in der zweiten Jahreshälfte 2006 kein einziger Antrag auf Import und Verwendung humaner ES-Zellen bei der Kommission zur Prüfung eingegangen ist [17].

Die derzeit geltende gesetzliche Grundlage für die Forschung an hES-Zellen in Deutschland beruht insgesamt auf dem Kenntnisstand des Jahres 2001. Studien, die im vergangenen Jahr u. a. von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften (BBAW) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) erstellt wurden, haben den Wissensstand zur Stammzellforschung bis 2005 bzw. Anfang 2006 zusammenfassend dargestellt [18, 19]. Beide Studien beziehen sich auch auf Arbeiten, die Daten zur Forschung an hES-Zellen für den Zeitraum von 1998 bis Ende 2005 dokumentieren [20–22]. Aufgrund der rasanten Entwicklung des Forschungsfeldes ist jedoch eine laufende Aktualisierung des Wissensstandes zwingend erforderlich. Im folgenden werden die genannten Datensammlungen zur Forschung an hES-Zellen ergänzt und aktualisiert. Darüber hinaus werden auch einige jüngere Entwicklungen auf dem Gebiet der hES-Zell-Forschung erörtert, die keinen Eingang in die DFG-Stellungnahme und in den zu Beginn des Jahres 2007 veröffentlichten Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes für den Zeitraum 2004–2005 gefunden haben [23].

### Aktueller Stand bei der Etablierung von humanen ES-Zell-Linien

Bis zum Ende des Jahres 2005 existierten weltweit Angaben zu mindestens 412 humanen ES-Zell-Linien, von denen 169 in *peer reviewed*-Journalen publiziert worden waren [20]. Das NIH-Register enthält derzeit insgesamt 69 originäre Linien; hinzu kommen 6 Subklone bestehender Linien, 5 doppelt aufgeführte Linien sowie 2 Linien, die von den Herstellern zurückgezogen wurden. Von den originären NIH-Linien stehen allerdings nur 21 der Forschung zur Verfügung, und lediglich 25 Linien sind bislang überhaupt in der wissenschaftlichen Originalliteratur dokumentiert<sup>2</sup>.

Allein im Jahr 2006 wurden wenigstens 70 neue hES-Zell-Linien, die Ende 2005 noch nicht öffentlich bekannt waren, in *peer reviewed*-Journalen beschrieben (Abb. 1 a, *web links* zu den entsprechenden Publikationen siehe *online Supplement 1*). 20 weitere Linien, die bereits vor 2006 öffent-



**Abb. 1.** Zahl der humanen embryonalen Stammzell-Linien in der Forschung. – **a.** Anzahl der im Jahr 2006 publizierten, neu etablierten hES-Zell-Linien. Es wurden nur solche Linien berücksichtigt, die in *peer reviewed*-Journalen beschrieben wurden und die Ende 2005 noch nicht öffentlich bekannt waren. Nicht in wissenschaftlichen Journalen publizierte Linien sind nicht enthalten (Recherche am 22. 01. 2007).

\* Herstellung und Kultivierung ohne jegliche tierische Komponenten (xenogen-frei), \*\* hES-Zell-Linien von *StemRide International*.

– **b.** Herkunft der weltweit existierenden hES-Zell-Linien (Stand: 31. 12. 2006, Recherche: 22. 01. 2007). Es sind sowohl Linien berücksichtigt, die in *peer reviewed*-Journalen beschrieben wurden, als auch Linien, über die Informationen nur aus anderen Quellen verfügbar sind (Internet, Pressemitteilungen, Konferenzbeiträge etc). Verändert und ergänzt nach [20].

\* Regionale Herkunft der Embryonen, aus denen die Zell-Linien erzeugt wurden, kann den Angaben des Herstellers nicht entnommen werden.

\*\* Die Zell-Linien der Firma *ES Cell International* wurden Singapur zugerechnet.

lich bekannt, jedoch damals noch nicht publiziert worden waren, wurden 2006 erstmals in wissenschaftlichen Arbeiten dokumentiert. Damit beträgt die Zahl der in englischsprachigen wissenschaftlichen Zeitschriften publizierten hES-Zell-Linien mittlerweile wenigstens 259<sup>3</sup>. Von diesen in der wissenschaftlichen Literatur dokumentierten Linien sind, wie bereits erwähnt, lediglich 25, d. h. ca. 10%, im NIH-Register aufgeführt.

Darüber hinaus wurden im Jahr 2006 wenigstens 25 weitere neue hES-Zell-Linien bekannt, die bislang noch nicht in wissenschaftlichen Arbeiten publiziert worden sind. Dies betrifft 8 Linien in der *UK Stem Cell Bank*, 9 Linien des *Reproductive Genetic Institute*, Chicago, (vertrieben von *StemRide International*), sowie 8 Linien der Firma *ES Cell International* [24–26]. Die Gesamtzahl der von 1998 bis Ende 2006 etablierten und öffentlich bekannten hES-Zell-Linien (einschließlich jener Linien, die noch nicht in wissenschaftlichen Arbeiten publiziert worden sind) beträgt somit wenigstens 507<sup>4</sup> (Abb. 1 b).

Die 70 im Jahr 2006 erstmals in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Linien wurden allesamt aus Embryonen gewonnen, die für eine *In-vitro*-Fertilisation (IVF) erzeugt worden waren und endgültig nicht mehr zu Fortpflanzungszwecken verwendet werden sollten (sog. „überzählige“ IVF-Embryonen). Die Herstellung und Kultivierung der meisten Linien erfolgte unter Nutzung von Verfahren, die bereits bei der Etablierung der meisten bislang bekannten hES-Zell-Linien, einschließlich der im NIH-Register aufgeführten Linien, eingesetzt wurden [27]. Diese Verfahren beinhalten die Isolierung der Inneren Zellmasse (*inner cell mass*, ICM) der Blastozyste durch sog. *immunosurgery*, ein

Verfahren, bei dem die Zellen des Trophoblasten (i. a. unter Nutzung von tierischen Antiseren und Meerschweinchen-Komplement) zerstört werden [28]. Die Kultivierung der Zellen der ICM erfolgte dann meist auf tierischen Nährzellen (*feeder*-Zellen, i. a. embryonale Mausfibroblasten, *murine embryonic fibroblasts*, *MEFs*), wobei in fast allen Fällen Kulturmedien verwendet wurden, denen tierisches Serum (in der Regel fötales Kälberserum) oder Serumersatz (*serum replacement*, *SR* oder *knockout serum replacement*, *KSR*, beide enthalten ebenfalls tierische Proteine) zugefügt wurde. Jeder der genannten Verfahrensschritte birgt das Risiko einer Kontamination der hES-Zell-Linien mit tierischem Material.

Ogleich bei vielen der zwischen 2002 und 2006 hergestellten Linien einzelne der genannten Arbeitsgänge unter teilweiser Vermeidung tierischer Produkte durchgeführt worden sind, wurde im Jahr 2006 erstmals über zwei hES-Zell-Linien berichtet, die von Anbeginn an ohne jegliche Nutzung tierischer Produkte (= xenogen-frei) hergestellt und kultiviert wurden [29, 30], wobei eine der Linien gegenwärtig für die Aufnahme in die *UK Stem Cell Bank* untersucht und voraussichtlich demnächst für die Forschung öffentlich zugänglich sein wird. Für die Forschung zugänglich sollten in naher Zukunft auch die schon genannten 8 Zell-Linien der Firma *ES Cell International* sein, die nach Pressemitteilung der Firma 2006 unter Bedingungen der *cGMP* (*current Good Manufacturing Practice*) hergestellt worden sind [26].

Entsprechend den Angaben in der internationalen Literatur existieren unter den bekannten hES-Zell-Linien mindestens 38 Linien, die ebenfalls aus nicht zu Reprodukti-

onszwecken verwendeten, überzähligen IVF-Embryonen hergestellt wurden und die durch Präimplantationsdiagnostik festgestellte genetische Veränderungen tragen. Diese Veränderungen sind für schwere genetische Erkrankungen verantwortlich (Tab. 1). Die Veröffentlichungen zu diesen Zell-Linien stammen fast ausschließlich aus den Jahren 2005 und 2006. Solche genetisch abweichenden (sog. krankheitsspezifischen) hES-Zell-Linien stellen einzigartige zellbiologische Modelle für die Untersuchung der molekularen Ursachen der betreffenden Krankheiten dar und könnten ferner zur Entwicklung von Medikamenten für die Behandlung dieser Krankheiten eingesetzt werden. Darüber hinaus existieren gegenwärtig ca. 15 weitere hES-Zell-Linien, die chromosomale Veränderungen aufweisen, die zum Teil schwere genetische Erkrankungen bedingen (z. B. des *Klinefelter-Syndroms*, Linie WA16, [31]). In Deutschland ist – aufgrund des Zeitpunktes der Herstellung dieser Zell-Linien (nach dem 01. 01. 2002) und/oder wegen ihrer Herkunft (aus IVF-Embryonen, die nach Diagnose einer genetischen Schädigung nicht auf eine Frau übertragen wurden) – eine Verwendung für Forschungszwecke sowie für die Entwicklung neuer präventiver, diagnostischer oder therapeutischer Verfahren nicht möglich. Die Herstellung entsprechender Zellen aus stichtagsgerechten (NIH-)Linien, beispielsweise durch gezielte Einführung einer genetischen Veränderung,

**Tab. 1.** Sogenannte „krankheitsspezifische“ hES-Zell-Linien, deren Genom für erblich bedingte Erkrankungen verantwortliche genetische Veränderungen enthält. Angaben zu diesen Linien sind u. a. in [75-79] enthalten. Siehe auch [20] und [25].

Genetisch bedingte Erkrankung	Anzahl der hES-Zell-Linien	Jahr der Erstbeschreibung
Thalassämie (β-Locus)	4	2005, 2006
Fanconi-Anämie	1	2005
Zystische Fibrose	3	2005, 2006
Chorea Huntington	5	2005, 2006
Myotone Muskuläre Dystrophie	3	2005
Muskeldystrophie, Typ Becker	1	2005
Muskeldystrophie, Typ Duchenne	3	2005, 2006
Muskeldystrophie, Typ Emery-Dreifuss	2	2006
Marfan-Syndrom	1	2005, 2006
Neurofibromatose, Typ 1	6	2005
Adrenoleukodystrophie	1	2005
Fragiles X-Syndrom	2	2005, 2006
Sichelzell-Anämie	1	2006
Spinale Muskuläre Atrophie	1	2006
Okularer Albinismus	1	2006
Beta-Globin-Mutation IVS	1	2006
Primäre Torsionsdystonie (DYT1)	1	2006
Waardenburg-Syndrom	1	2004
<b>Insgesamt (18 Erkrankungen)</b>	<b>38</b>	

ist derzeit jedoch aufgrund technischer Probleme, die mit der homologen Rekombination in hES-Zellen derzeit noch verbunden sind, sowie wegen des teils komplexen Charakters der Ursachen für die entsprechenden genetischen Erkrankungen nicht möglich.

**Fazit 2: Es ist festzustellen, dass weltweit eine wachsende Zahl von humanen ES-Zell-Linien existiert, die aufgrund der Art ihrer Herstellung und ihrer Eigenschaften für spezifische Fragestellungen in der medizinischen Grundlagenforschung sowie für die langfristige Entwicklung von potentiellen Zelltherapeutika deutlich besser geeignet sind als die verfügbaren NIH-Linien. Eine zunehmende Anzahl dieser neuen hES-Zell-Linien, die nach dem in Deutschland gültigen Stichtag hergestellt worden sind, wird in naher Zukunft, u. a. über die britische Stammzellbank, für die internationale Forschung nutzbar sein.**

**Eigenschaften von derzeit verfügbaren hES-Zell-Linien**

Ende 2006 wurde die erste umfangreiche Studie vorgelegt, in der eine große Anzahl von humanen ES-Zell-Linien aus verschiedenen Quellen bezüglich zahlreicher Charakteristika verglichen wurde [32]. Insgesamt wurden 15 NIH-Linien untersucht, die in 5 verschiedenen Laboren hergestellt worden waren. Dabei wurde zunächst offenbar, dass die Mehrzahl der Linien, die im eingefrorenen Zustand an den Nutzer verschickt worden waren, nur wenige lebensfähige Zellen enthielten. Dies ist auf die Verwendung suboptimaler Einfriermethoden zum Zeitpunkt der Herstellung der Linien zurückzuführen und höchst problematisch. Um nämlich die für die Projektdurchführung benötigten Zellzahlen zu erhalten, ist eine Vermehrung der hES-Zellen über zahlreiche Generationen (sog. Passagierung) nötig, was mit genetischen und epigenetischen Veränderungen (s. u.) einhergehen kann. Optimierte Protokolle für das Einfrieren und Auftauen humaner ES-Zell-Linien liegen erst seit kurzem vor [33, 34]. Hinzu kommt, dass sich die meisten hES-Zell-Linien, wenn sie an die Nutzer verschickt wurden, durchschnittlich bereits in der 30. Passage befanden. Eine der NIH-Linien (Miz-hES1, NIH-Code MI01) war darüber hinaus mit Mycoplasmen kontaminiert, was ihre weitere Nutzung, auch für die Forschung, ausschließt [32].

In der genannten Studie wurde ferner bestätigt, dass hES-Zellen keine homogenen Zellpopulationen darstellen, sondern dass zwischen den Linien erhebliche Unterschiede bestehen. Dies gilt übrigens für NIH-Linien ebenso wie für jüngere hES-Zell-Linien. Zwar werden in allen untersuchten hES-Zell-Linien sogenannte Pluripotenz-assoziierte Gene exprimiert, u. a. die Gene für Oct4, *Tumor-related antigens* (TRA) 1-60 und 1-82, *Stage specific embryonic antigens* (SSEA) 3 und 4, Telomerase und Alkalische Phosphatase, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß [32, 36]. Signifikante Unterschiede in den Genexpressionsprofilen humaner ES-Zellen waren bereits zuvor festgestellt worden. So war annähernd die Hälfte der untersuchten Gene in den NIH-

Linien HSF-1, HSF-6 und H9 unterschiedlich exprimiert [37]. Diese unterschiedlichen Expressionsprofile können diverse Ursachen haben, die in der genetischen Ausstattung der Zell-Linien, den Bedingungen ihrer Ableitung sowie den in verschiedenen Laboren verwendeten unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen und -methoden liegen können.

Die variierenden molekularen Eigenschaften der hES-Zell-Linien finden ihren Ausdruck nicht nur in den verschiedenen Generationszeiten (Zeiten, die für eine Zellverdopplung notwendig sind und die für hES-Zellen zwischen 28 und 56 Stunden betragen), sondern vor allem auch im unterschiedlichen Vermögen von hES-Zell-Linien, in bestimmte spezialisierte Zelltypen zu differenzieren [38]. Trotz Verwendung identischer Kultivierungs- und Differenzierungsprotokolle wiesen die untersuchten hES-Zell-Linien nach Differenzierungsinduktion teilweise Unterschiede im Genexpressionsmuster früher Differenzierungsstadien auf [39]. Daneben zeigten verschiedene hES-Zell-Linien ein deutlich variierendes Vermögen, zu Blutzellen oder zu Herzmuskelzellen zu differenzieren. So konnte beispielsweise nur eine von fünf untersuchten NIH-Linien effizient zu blutbildenden (erythroiden) Vorläuferzellen differenziert werden [40, 41].

Es muss ferner beachtet werden, dass selbst innerhalb einer Linie und einer Kultur die Expression der für ES-Zellen typischen Gene stark schwanken kann (z. B. SSEA3 und SSEA4 [42, 43]). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich bei humanen ES-Zellen derselben Linie im Allgemeinen nicht um eine uniforme Zellpopulation handelt. Da hES-Zell-Linien in der Regel nicht klonalen<sup>5</sup> Ursprungs sein dürften, handelt es sich bei den meisten Linien um eine heterogene Zellpopulation, deren Zellen unter Umständen verschiedene Eigenschaften und Potentiale haben können. Für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen (und erst recht für einen eventuellen therapeutischen Einsatz) wären jedoch Zellen mit einheitlichen Eigenschaften vonnöten, die vorzugsweise klonalen Ursprungs sein sollten. Derartige Klone existieren für einige der NIH-Linien [44–46], jedoch haben diese vermutlich vor ihrer klonalen Kultivierung bereits eine relativ hohe Zahl von Zellpassagen durchlaufen. Hinzu kommt, dass bei klonaler Kultivierung von NIH-Linien eine Zunahme chromosomaler Anomalitäten festgestellt wurde [32]. Effektive Methoden für die Einzelzell-Isolierung von hES-Zellen wurden dagegen erst kürzlich beschrieben [47].

**Fazit 3: Es ist festzuhalten, dass die derzeit verfügbaren hES-Zell-Linien – neben ihrer Kontamination mit tierischen Produkten – bereits während ihrer Etablierung sowie im Verlauf der Vermehrung unter nicht-standardisierten Bedingungen kultiviert wurden, hinsichtlich ihrer Eigenschaften teils heterogen sind und darüber hinaus irreversibel verändert sein können.**

### Genetische und epigenetische Stabilität von hES-Zell-Linien

Da hES-Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur vermehrt werden, ist ihre genetische Stabilität während der Langzeitkultur von größter Relevanz: Chromosomale Veränderungen gehen *in vivo* häufig mit dem Risiko der Bildung von Tumoren einher. Hinsichtlich der genetischen Stabilität humaner ES-Zell-Linien gibt es folglich zahlreiche Studien, die jedoch divergierende Ergebnisse erbracht haben.

Bereits seit etwa drei Jahren ist bekannt, dass die Kultivierung einiger NIH-Linien – sowohl bereits relativ früh (Passage 22) als auch nach längerer Kultivierung – zu chromosomalen Veränderungen in den Zellen führen kann, unter anderem zu Trisomien für die Chromosomen 12, 17 und X [48–50]. Eine Arbeit fand in einigen NIH-Linien hingegen keine chromosomalen Veränderungen [51]. Das Auftreten bestimmter chromosomaler Veränderungen wurde meist mit der klonalen Selektion der Mutanten, z. B. infolge eines schnelleren Wachstums während der Passagierung, in Zusammenhang gebracht. Dabei ist zu beachten, dass chromosomale Veränderungen, wie sie in hES-Zellen nach Langzeitkultivierung beobachtet wurden, regelmäßig auch in embryonalen Karzinomzellen, dem malignen Äquivalent von ES-Zellen, auftreten. Jüngere Arbeiten fanden zudem einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Kultivierungsbedingungen und der genetischen Stabilität der hES-Zell-Linien [52–55]. Wesentlich ist, dass neben (visuell erkennbaren) Veränderungen der Chromosomenzahl und -struktur bei Verwendung sensiblerer Nachweismethoden auch kleinere, jedoch höchst relevante Abweichungen festgestellt werden konnten, beispielsweise in der Kopienzahl bestimmter Gene. So wurde in einer Studie eine erhöhte Kopienzahl des Proto-Onkogens C-myc detektiert [50], das in zahlreichen Tumoren überexprimiert wird und dessen Genprodukt für eine beschleunigte Zellproliferation verantwortlich ist.

Vergleichende aktuelle Studien konnten keine endgültige Klarheit bezüglich der Signifikanz der Veränderungen der genetischen Stabilität von hES-Zell-Linien erbringen. In einer Studie wurden keine Veränderungen in der Zahl und Integrität der Chromosomen in hES-Zellen über durchschnittlich 30 Passagen beobachtet, während bei längerer Passagierung Veränderungen in einigen Linien auftraten [32]. Eine andere Studie berichtete jedoch über verschiedenste Arten chromosomaler Veränderungen sowohl in NIH-konformen als auch in Zell-Linien jüngerer Datums, teils in bereits relativ frühen Passagen [56]. Obwohl derzeit also weder generell noch in Bezug auf einzelne NIH-registrierte oder neu etablierte hES-Zell-Linien allgemeine Aussagen über die genetische Stabilität von hES-Zell-Linien getroffen werden können, gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte jüngere Linien eine hohe genetische Stabilität aufweisen. Dies betrifft beispielsweise verschiedene Linien der Firma *Cellartis* [57–59] und der *Kyoto University* [60].

Wenig untersucht ist die Stabilität des Epigenoms<sup>6</sup> humaner ES-Zellen. Erst in den letzten Jahren wurde dem

Problem der epigenetischen Stabilität von hES-Zell-Linien vermehrt Aufmerksamkeit zuteil. Da hES-Zellen aus frühen Embryonen gewonnen werden, in denen sich umfangreiche Veränderungen des Epigenoms vollziehen, ist in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Herstellung der hES-Zell-Linien eine spezifische epigenetische Konstitution zu erwarten.

Eine umfangreiche Studie aus dem Jahr 2006 zeigte, dass hES-Zellen ein relativ einheitliches – von differenzierten Zellen und Tumorzellen klar unterschiedenes – Epigenom besitzen [61]. Langzeitkultivierung von hES-Zellen ging in den bislang untersuchten Linien meist nicht mit Veränderungen im *Imprinting* monoallelisch exprimierter Gene einher [62, 63]. Sie führte auch nicht zu einer charakteristischen Veränderung der globalen Methylierungsmuster der DNA, obgleich grundsätzlich eine Korrelation zwischen (uneinheitlichen) Veränderungen in den DNA-Methylierungsmustern in hES-Zellen und der Dauer ihrer Kultivierung beobachtet wurde [61].

Während eine grundsätzliche Umgestaltung des Epigenoms von hES-Zellen infolge Langzeitkultivierung bislang also nicht beobachtet wurde, können im Laufe der Kultivierung offenbar lokal begrenzte, jedoch deutliche und von der genutzten hES-Zell-Linie abhängige Veränderungen im Methylierungsmuster der Promotor-Region bestimmter, mit Pluripotenz assoziierter Gene auftreten [50, 64]. Dieser Befund ist von erheblicher Bedeutung für den Einsatz von embryonalen (als auch adulten) Stammzellen für potentielle Zelltherapien, da veränderte Methylierungsmuster (insbesondere in den Promotoren von Onkogenen oder Tumorsuppressor-Genen) zur Entstehung von Tumoren beitragen können.

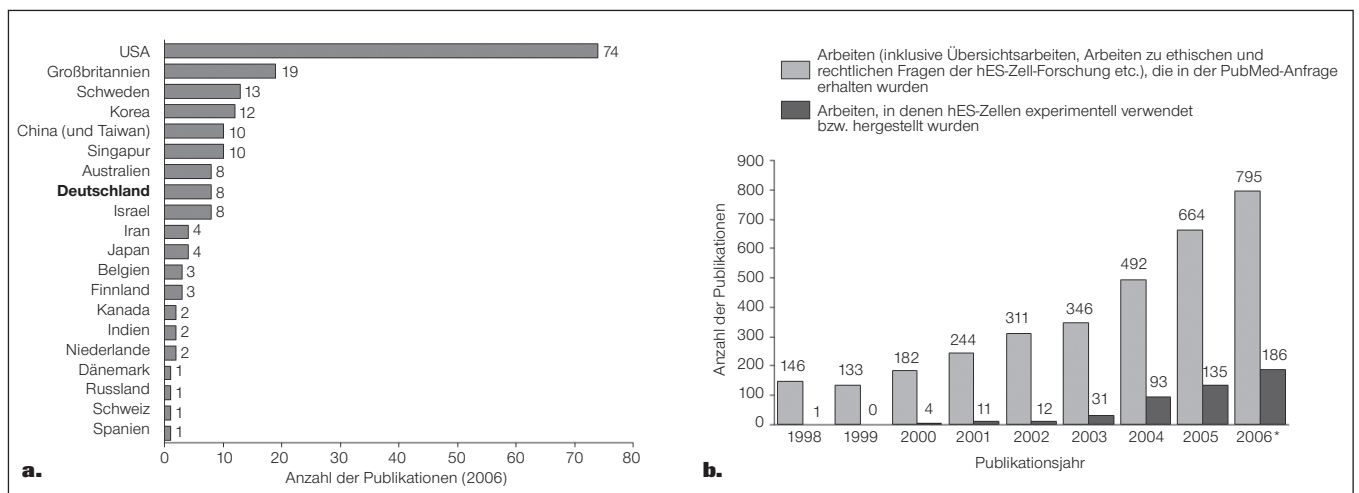
Uneinheitliche Daten liegen gegenwärtig auch darüber vor, ob in hES-Zell-Linien mit weiblichem Chromosomensatz die notwendige Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms korrekt erfolgt und inwieweit hier Veränderungen

– in Abhängigkeit von den untersuchten Zell-Linien und den gewählten Kulturbedingungen – infolge von Langzeitkultivierung der hES-Zellen auftreten können [43, 65, 66]. Obwohl die beobachteten Unterschiede in der Inaktivierung des X-Chromosoms auch auf den Zeitpunkt der Ableitung der Linie aus der Blastozyste rückführbar sein könnten, weisen die unterschiedlichen Befunde, die mit ein- und denselben hES-Zell-Linien erhalten wurden, darauf hin, dass auch bezüglich der epigenetischen Stabilität die Kultivierungsbedingungen von erheblichem Einfluss sind [43].

**Fazit 4: Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die bislang untersuchten NIH-Linien, die in zahlreichen Labors für Forschungszwecke eingesetzt werden, im Laufe ihrer Kultivierung verschiedene genetische Veränderungen und chromosomale Schädigungen erwerben können. Voraussetzung, um eine hES-Zell-Linie über einen langen Zeitraum genetisch und epigenetisch stabil zu halten, ist offensichtlich die Einhaltung standardisierter Kulturverfahren von Beginn an.**

**Verwendung von hES-Zell-Linien in der internationalen experimentellen Forschung**

Bis Ende 2005 lagen 287 wissenschaftliche Arbeiten im Druck vor, in denen die Herstellung oder experimentelle Nutzung humaner ES-Zell-Linien beschrieben wurde. Allein für das Jahr 2006 wurden in der *PubMed*-Datenbank [67] 186 Arbeiten zu hES-Zellen ermittelt (Abb. 2 a, Recherche am 22. 01. 2007, *web links* zu den Publikationen siehe *online Supplement 2*). Diese Zahl wird sich mit der verzögerten Aufnahme weiterer Arbeiten aus dem Jahr 2006 in den *PubMed*-Index vermutlich noch erhöhen. Wie aus Abb. 2 b ersichtlich, wurde die experimentelle Forschung an hES-Zellen somit auch im Jahr 2006 gegenüber dem Vorjahr deutlich ausge-



**Abb. 2.** Zahl der Arbeiten über hES-Zellen. – **a.** Anzahl der 2006 publizierten wissenschaftlichen Arbeiten, in denen die Ableitung und/oder experimentelle Nutzung von hES-Zellen beschrieben wurde. Aufstellung nach Ländern. Enthalten sind alle Arbeiten, die bei der Recherche (22. 01. 2007) für das Jahr 2006 gefunden wurden, also auch vorab *online* publizierte Arbeiten. – **b.** Anzahl der publizierten wissenschaftlichen Arbeiten, die seit 1998 die Ableitung und/oder experimentelle Nutzung von hES-Zell-Linien beschrieben haben. Verändert und ergänzt nach [20]. \*PubMed-Anfrage vom 22. 01. 2007 (einschließlich vorab *online* publizierter Arbeiten).

weitet, was den seit 2003 erkennbaren Trend einer starken Zunahme der internationalen hES-Zell-Forschung bestätigt. Der Umfang des deutschen Beitrags zur internationalen Forschung ist – angesichts von weltweit nahezu 500 Publikationen über die experimentelle Nutzung von hES-Zellen – mit derzeit insgesamt 11 Publikationen zu hES-Zellen (davon 8 Publikationen im Jahr 2006) gegenwärtig als gering einzuschätzen.

Wie in den Jahren zuvor liegen die gegenwärtigen Schwerpunkte der experimentellen Forschung an hES-Zellen auf drei Gebieten:

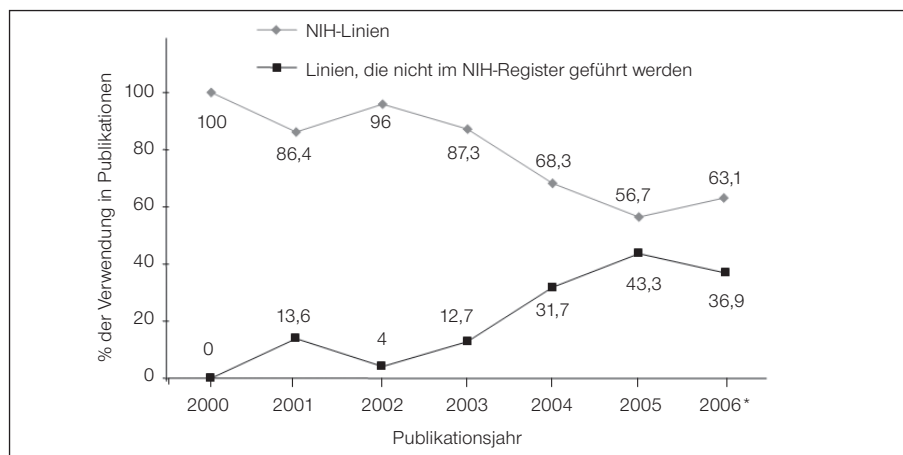
- Ableitung von hES-Zell-Linien und Untersuchung optimaler Bedingungen für die Kultivierung, Vermehrung, Zellvereinzelung, Kryokonservierung u. ä. (ca. 30% der Arbeiten),
- Molekulare Charakterisierung der Zell-Linien, vor allem bezüglich ihrer Genexpressionsprofile im undifferenzierten Zustand und während der Differenzierungsinduktion (ca. 26% der Arbeiten),
- Differenzierung von hES-Zellen in spezifische, therapeutisch relevante Zell- und Gewebetypen mit einem deutlichen Schwerpunkt auf neuraler Differenzierung (ca. 33% der Arbeiten). Dies schließt auch Studien in Tiermodellen mit aus hES-Zellen hergestellten Transplantaten ein.

Weitere thematische Schwerpunkte der 2006 veröffentlichten experimentellen Arbeiten mit hES-Zellen lagen auf dem Gebiet der Entwicklung verbesserter Methoden für den Gentransfer in hES-Zellen sowie in der Untersuchung der immunologischen Eigenschaften von hES-Zellen und ihrer differenzierten Derivate, wobei für letzteres Gebiet weiterhin ungeklärt ist, ob humane ES-Zellen und ihre Differenzierungsprodukte immunprivilegiert sind. Wie in den Jahren zuvor wurden Ergebnisse der hES-Zell-Forschung bevorzugt in renommierten Fachzeitschriften publiziert; der durchschnittliche *Impact Factor* (*Institute for Scientific Information, ISI*) der 2006 erschienenen, hier ausgewerteten experimentellen Arbeiten zur hES-Zell-Forschung betrug 6,02, was das große Interesse an dieser Forschung unterstreicht.

Für die im Jahr 2006 publizierten Arbeiten wurden weiterhin hES-Zell-Linien verwendet, die im NIH-Stammzell-

Register aufgeführt sind. 181 der 186 untersuchten Arbeiten enthielten Angaben zu den verwendeten hES-Zell-Linien. 270 von insgesamt 428 beschriebenen Verwendungen von hES-Zellen<sup>7</sup> betrafen hES-Zell-Linien, die im NIH-Register aufgeführt sind (63,1%). In 61 Arbeiten kamen jedoch auch 158-mal hES-Zell-Linien zum Einsatz, die nicht im NIH-Register aufgeführt sind, bzw. wurden erstmals beschrieben (36,9% der Nutzung von hES-Zell-Linien). Damit liegt die Verwendung bzw. Ableitung neuer (nicht NIH-konformer) hES-Zell-Linien etwa im Bereich der für 2004 und 2005 festgestellten Werte (Abb. 3). Eine Übersicht über die am häufigsten verwendeten hES-Zell-Linien in den im Jahr 2006 veröffentlichten experimentellen Arbeiten gibt Tabelle 2.

Die derzeitige Nutzung NIH-konformer Zellen mag unter anderem in der Tatsache begründet sein, dass jüngere hES-Zell-Linien bislang noch nicht allgemein verfügbar waren bzw. sind und dass sie in den meisten Fällen nur in den Hersteller-Laboren genutzt werden. Es ist weiterhin davon auszugehen, dass die meisten der im Jahr 2006 publizierten Arbeiten wenigstens zwei bis drei Jahre vor ihrer Veröffentlichung konzipiert und begonnen wurden, zu einem Zeitpunkt also, zu dem deutlich weniger hES-Zell-Linien zur Verfügung standen, als dies gegenwärtig der Fall ist. Wesentlich zur Verbreitung der NIH-Linien in den USA dürfte zudem der für Forscher in NIH-geförderten Instituten und Projekten gültige Stichtag (09. 08. 2001) beitragen, der diejenigen Projekte von einer Förderung durch das NIH ausschließt, in denen andere als die beim NIH registrierten hES-Zell-Linien verwendet werden sollen. Insgesamt erhielten 61 der 2006 publizierten Projekte eine Förderung durch das NIH bzw. wurden an NIH-Instituten durchgeführt (32,7% aller Studien weltweit), davon 53 in den USA. Zwei weitere Projekte in den USA erhielten Förderungen durch Organisationen, die die Forschungsförderung ebenfalls von der Beachtung der NIH-Richtlinien für die Verwendung von hES-Zellen abhängig machen. Somit waren insgesamt ca. 74% der in den USA durchgeführten Studien an die Nutzung von NIH-Linien gebunden. Die vorwiegende Nutzung der im NIH-Register aufgeführten Zell-Linien in den USA ist somit vermutlich auf die Forschungspolitik in den USA zurückzuführen und nicht auf die Qualität dieser Zell-Linien. In die-



**Abb. 3.** Verwendung von hES-Zell-Linien des NIH-Registers sowie nicht im NIH-Register aufgeführter hES-Zell-Linien in der experimentellen Forschung (Recherche am 22. 01. 2007). Verändert und ergänzt nach [20]. \*einschließlich vorab *online* publizierter Arbeiten.

**Tab. 2.** Häufigkeit der Verwendung von hES-Zell-Linien in experimentellen Arbeiten, die 2006 publiziert wurden. Eine Tabelle mit entsprechenden Angaben für den Zeitraum 1998 bis 2005 findet sich in [20].

Linie	NIH-Code	Lieferant	Verwendungen
H1	WA01	WiCell Research Institute	62
H9 (einschließlich Subklone)	WA09	WiCell Research Institute	58
BG01 (einschließlich Klon BG01V)	BG01	BresaGen, Inc.	26
HES-3 (einschließlich Subklone)	ES03	ES Cell International	17
BG02	BG02	BresaGen, Inc.	12
H7	WA07	WiCell Research Institute	12
HSF-6	UC06	University of California	12
HES-2	ES02	ES Cell International	11
BG03	BG03	BresaGen, Inc.	9
I6	TE06	Technion	8
HS181	nicht registriert	Karolinska-Institut	7

sem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass zahlreiche NIH-Institute mittlerweile privat finanzierte, eigenständige Forschungslabore ausgegliedert haben, um auch Forschung mit neu etablierten hES-Zell-Linien durchführen zu können. In anderen Ländern, wie z. B. in Deutschland (8 Veröffentlichungen, dies entspricht 4,3% aller Publikationen des Jahres 2006), ist dagegen die gesamte Forschung an die Nutzung der NIH-Linien gebunden.

Ferner ist darauf hinzuweisen, dass die Restriktionen und Kosten, die mit der Beschaffung von NIH-Linien verbunden sind, eher dazu geeignet sind, die Forschung an hES-Zellen zu behindern [32, 68]. Seit Kurzem werden zwar einige NIH-Linien, die in der *National Stem Cell Bank* der USA [69] aufgeführt sind, für rein wissenschaftliche Zwecke und unter bestimmten Bedingungen an Forschungseinrichtungen zu einem relativ günstigen Preis abgegeben. Jedoch müssen Firmen, die in den USA beispielsweise die Linien der Firma WiCell – selbst ausschließlich zu nicht-kommerziellen Forschungszwecken – verwenden wollen, im Allgemeinen eine Einmalzahlung von 125 000 \$ und eine jährliche Zahlung in Höhe von 40 000 \$ pro hES-Zell-Linie leisten [68]. Nicht vom NIH geförderte institutionelle (öffentlich finanzierte) Forschungseinrichtungen, auch aus Deutschland, haben bei Nutzung der WiCell-Linien Kosten von 1500 bis 5000 \$ pro Linie zu tragen [70].

In den Ländern, in denen hES-Zell-Linien jüngerer Datums verwendet bzw. neue Linien hergestellt werden dürfen, wird dagegen überwiegend mit Linien gearbeitet, die nicht im NIH-Register aufgeführt sind. So betrafen beispielsweise in britischen Studien 23 von 42 Verwendungen (ca. 55%) und in Studien aus Schweden sogar 31 von 36 Verwendungen (86%) neue hES-Zell-Linien, die nicht im NIH-Register aufgeführt sind. Dies mag ebenfalls nicht ausschließlich wissenschaftliche Gründe haben, da es bei Vorhandensein eigener Linien nicht nachvollziehbar wäre, Zellen der NIH-Linien zu importieren, deren Erwerb mit Kosten und unerwünschten Abhängigkeiten vom Herstellerlabor bzw. Lizenzgeber verbunden ist [68].

Trotz unterschiedlicher rechtlicher Voraussetzungen, unter denen die Forschung an hES-Zellen in einzelnen Ländern durchgeführt wird [71], zeichnet sich in der internationalen Forschung die Tendenz ab, nach einheitlichen ethischen Rahmenbedingungen zu arbeiten. Jüngstes Beispiel dafür ist die Stellungnahme der *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR) [72]. Darin wird gefordert, dass alle Arbeiten auf dem Gebiet der Forschung mit hES-Zellen – sowohl in der öffentlich geförderten als auch in der privat finanzierten Forschung – die festgelegten ethischen Standards beachten müssen. Ähnliche Empfehlungen existieren auch auf nationaler Ebene, beispielsweise in den USA die *Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research* der Nationalen Akademien der Wissenschaften der USA [73].

**Fazit 5: International wird derzeit ein breites Spektrum an hES-Zell-Linien genutzt, das sowohl NIH-Linien als auch neue, nach dem in Deutschland gültigen Stichtag hergestellte hES-Zell-Linien umfasst.**

**Zusammenfassung und Ausblick**

Die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen hat sich auch im Jahr 2006 deutlich ausgeweitet, was seinen Ausdruck u. a. in der wachsenden Anzahl entsprechender Publikationen findet. Der Einsatz von hES-Zellen bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe, für die Toxizitätstestung von Arzneimitteln und Chemikalien sowie zur Identifizierung medizinisch nutzbarer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren hat bereits begonnen, wohingegen eine mögliche therapeutische Nutzung dieser Zellen voraussichtlich einen längerfristigen zeitlichen Horizont hat.

Mittlerweile existieren weltweit ca. 500 hES-Zell-Linien, von denen eine zunehmende Anzahl charakterisiert und für die internationale Forschung verfügbar ist. Unter den 2006 veröffentlichten neuen Linien sind erstmals auch solche, die gänzlich ohne tierische Produkte hergestellt und kultiviert wurden. Weiterhin existieren neue „krankheitsspezifische“



hES-Zell-Linien, die bei der Ursachenforschung für genetisch bedingte Erkrankungen sowie zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Verfahren für diese Krankheiten eingesetzt werden können. Hingegen bleibt die Anzahl der verwendbaren NIH-Linien mit 21 unverändert gering: Seit nunmehr 5 Jahren ist ein Großteil der NIH-Linien nicht von der Wissenschaft nutzbar, und es ist nicht absehbar, ob diese Linien jemals der Forschung zur Verfügung stehen werden. Die für die internationale Forschung verfügbaren 21 NIH-Linien werden in der Forschung nach wie vor eingesetzt, jedoch wird in der Literatur zunehmend auf Qualitätsmängel dieser Linien hingewiesen. So können suboptimale Kultivierungsbedingungen während der Ableitung dieser Linien sowie im Verlauf ihrer frühen Passagierung für die Entstehung (irreversibler) Veränderungen verantwortlich sein. Hinzu kommen restriktive Bedingungen seitens der Lieferanten zur Nutzung vieler NIH-Linien, die ihrer breiten Verwendung für Forschungszwecke entgegenstehen.

Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion um die Gestaltung der Rahmenbedingungen für die deutsche Forschung ist zu berücksichtigen, dass selbst die hier dargestellten aktuellen Daten auf Arbeiten beruhen, die vor einigen Jahren konzipiert und begonnen worden sind. Der Schwerpunkt gegenwärtig laufender Forschungsvorhaben an hES-Zellen mag sich bereits anderen, z.B. stärker therapieorientierten, Fragestellungen zuwenden, wobei andere Zell-Linien als die bislang beschriebenen verwendet werden können. Eine ständige Beobachtung des Forschungsfeldes und die regelmäßige Auswertung der jüngsten Ergebnisse der hES-Zell-Forschung sind angesichts der äußerst rasanten Entwicklung in dieser Forschung für eine sachgerechte Diskussion der Thematik unabdingbar.

### Abkürzungen

*hES-Zellen*, humane embryonale Stammzellen

*NIH-Linien*, hES-Zell-Linien, die im Register der National Institutes of Health aufgeführt sind

### Anmerkungen

- <sup>1</sup> Unter *adulten Stammzellen* werden hier sowohl somatische Stammzellen des postnatalen Organismus als auch Stammzellen aus dem Nabelschnurblut zusammengefasst.
- <sup>2</sup> Im Rahmen des Internationalen Stammzellforums (ISCF) sind derzeit 59 hES-Zell-Linien vergleichend charakterisiert worden [74], die britische Stammzellbank enthält derzeit 41 (Nicht-NIH-)Linien, die entweder bereits charakterisiert sind bzw. sich im Prozess der Charakterisierung befinden [24].
- <sup>3</sup> Die Anzahl von 259 Linien ergibt sich aus den 169 bis Ende 2005 dokumentierten Linien, zuzüglich der 70 Linien aus dem Jahr 2006, zuzüglich 20 Linien, die bereits Ende 2005 bekannt waren, jedoch erst im Jahr 2006 in wissenschaftlichen Arbeiten publiziert wurden.

- <sup>4</sup> Die Anzahl von 507 Linien ergibt sich aus den 412 bis 2005 bekannten Linien [20], zuzüglich der in der Literatur dokumentierten 70 Linien aus dem Jahr 2006, zuzüglich 25 Linien, die 2006 öffentlich bekannt wurden, aber bislang noch nicht publiziert worden sind.
- <sup>5</sup> *klonal* bezeichnet hier die Ableitung der hES-Zell-Kultur aus einer einzigen Zelle der Inneren Zellmasse der Blastozyste (und nicht durch „Klonierung“ im Sinne eines somatischen Zellkerntransfers entstanden).
- <sup>6</sup> Als *Epigenetik* wird die Modifikation der Genexpression somatischer Zellen ohne Änderung der DNA-Sequenz im Genom der Zelle bezeichnet, beispielsweise durch Variation der DNA-Methylierung oder der Acetylierung/Methylierung von DNA-assoziierten Proteinen des Chromatins. Darunter fallen auch Prozesse der frühen Embryonalentwicklung wie z. B. das *Imprinting* einschließlich der Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Embryonen. Regulation von Genaktivität, z. B. bei Entwicklungsvorgängen, ist häufig mit der Umgestaltung des Epigenoms der Zelle verbunden.
- <sup>7</sup> In einem Teil der Arbeiten wurden mehrere verschiedene hES-Zell-Linien verwendet, so dass die Zahl der Verwendungen von hES-Zell-Linien die Zahl der publizierten experimentellen Arbeiten deutlich übersteigt.

### Literatur

Die zitierte Literatur sowie zwei Supplemente mit Links zu den Publikationen sind als Dokumente auf unserer Homepage niedergelegt (<http://www.naturwissenschaftliche-rundschau.de>) und können von dort heruntergeladen werden. Auf Wunsch schicken wir eine Literaturliste zu.

Dr. **Peter Löser** (Jahrgang 1965) studierte Biochemie an der Humboldt-Universität Berlin und promovierte 1997 im Fach Molekulare Zellbiologie. Von 1997 bis 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Projektleiter in den Firmen HepaVec und DeveloGen; Schwerpunkt der Arbeiten waren virale Vektorentwicklung und Untersuchung von Virus-Zell-Interaktionen. Seit 2003 Mitarbeiter am Robert Koch-Institut (RKI), Geschäftsführer der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellenforschung, und seit Anfang 2007 Leiter der Zulassungsstelle für Anträge nach dem Stammzellgesetz am RKI.

*Robert Koch-Institut, Seestr. 10, 13353 Berlin, E-Mail: loeserp@rki.de*

Prof. Dr. **Anna M. Wobus** (Jahrgang 1945) absolvierte gemeinsam Abitur und Facharbeiterausbildung (Landwirt Saatzucht) und schloss ihr Biologie-Studium 1969 in Greifswald ab. Von 1969 bis 1991 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung der Akademie der Wissenschaften, Gatersleben, tätig auf den Gebieten Mutationsforschung, Zell- und Entwicklungsbiologie. Seit 1980 Arbeiten mit embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomzellen, Etablierung von embryonalen Stammzell-Linien der Maus und Etablierung von Differenzierungsmodellen. Seit 1992 Leiterin der Arbeitsgruppe „In vitro-Differenzierung“ am IPK Gatersleben. 1997 Habilitation im Fach Zellbiologie, 2004 Außerordentliche Professur an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften; u. a. Koordinatorin des DFG-Schwerpunktprogramms 1109 „Embryonale und adulte Stammzellen“ (2001–2007).

*Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, E-Mail: wobusam@ipk-gatersleben.de*

## Aktuelle Entwicklungen in der Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen

- [1] M. Mimeault, S. K. Batra, *Stem Cells* **24**, 2319 (2006)
- [2] A. Giordano et al., *J. Cell. Physiol.* **211**, 27 (2007)
- [3] L. Ye et al., *Exp. Med. Biol.* **231**, 8 (2006)
- [4] *New Scientist*, 17.06.2006, <http://www.newscientist.com/channel/health/dn9349-first-embryonic-stem-cell-trial-on-the-cards.html>
- [5] A. Fossgree, *Der Tagesanzeiger*, 09.10.2006
- [6] W. McNeish, *Nature Rev. Drug Disc.* **3**, 70 (2004)
- [7] P. Sartipy, *IDrugs* **9**, 702, (2006)
- [8] Y. W. Zhang et al. *Stem Cells Dev.* **47**, 943 (2007)
- [9] A. E. Seiler et al., *Methods Mol. Biol.* **329**, 371 (2006)
- [10] G. Sinha, *Science* **308**, 1538 (2005)
- [11] X. Zeng et al., *Neuropsychopharmacology* **31**, 2708 (2006)
- [12] H. Breithaupt, *EMBOReports* **7**, 968 (2006)
- [13] P. Menendez et al., *Cytotherapy* **8**, 530 (2006)
- [14] Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG) vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277) ([http://217.160.60.235/BGBL/bgbl1f/BGBL102042s\\_2277.pdf](http://217.160.60.235/BGBL/bgbl1f/BGBL102042s_2277.pdf))
- [15] Stammzellregister des *National Institute of Health* (NIH) der USA <http://stemcells.nih.gov/research/registry>
- [16] Register des Robert Koch-Instituts (RKI) über genehmigte Vorhaben nach dem Stammzellgesetz (StZG): [http://www.rki.de/cln\\_048/nn\\_207072/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register\\_\\_node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_048/nn_207072/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Register/register__node.html?__nnn=true)
- [17] Vierter Tätigkeitsbericht der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellenforschung (ZES): [http://www.bmg.bund.de/cln\\_040/nn\\_605030/SharedDocs/Download/DE/Themenschwerpunkte/Gesundheit/Biomedizin-Stammzellenforschung/4taetigkeitsberichtZES,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/4taetigkeitsberichtZES.pdf](http://www.bmg.bund.de/cln_040/nn_605030/SharedDocs/Download/DE/Themenschwerpunkte/Gesundheit/Biomedizin-Stammzellenforschung/4taetigkeitsberichtZES,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/4taetigkeitsberichtZES.pdf)
- [18] A. M. Wobus et al.: Stammzellforschung und Zelltherapie – Stand des Wissens und der Rahmenbedingungen in Deutschland: Supplement zum Gentechnologiebericht. Forschungsberichte der Interdisziplinären Arbeitsgruppen der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften. ELSEVIER. München 2006
- [19] Stammzellforschung in Deutschland – Möglichkeiten und Perspektiven. Stellungnahme der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Oktober 2006, [http://www.dfg.de/aktuelles\\_presse/reden\\_stellungnahmen/2006/download/stammzellforschung\\_deutschland\\_lang\\_0610.pdf](http://www.dfg.de/aktuelles_presse/reden_stellungnahmen/2006/download/stammzellforschung_deutschland_lang_0610.pdf).
- [20] A. Guhr et al., *Stem Cells* **24**, 2187 (2006), Volltext und Daten frei zugänglich unter <http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/reprint/24/10/2187.pdf>
- [21] A. Abbott et al., *Nature* **442**, 336 (2006)
- [22] J. Owen-Smith & J. McCormick, *Nat. Biotechnol.* **24**, 391 (2006)
- [23] Zweiter Erfahrungsbericht der Bundesregierung über die Durchführung des Stammzellgesetzes, [http://www.bmg.bund.de/cln\\_041/nn\\_605030/SharedDocs/Download/DE/Themenschwerpunkte/Gesundheit/Biomedizin-Stammzellenforschung/2-Stammzellbericht,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/2-Stammzellbericht.pdf](http://www.bmg.bund.de/cln_041/nn_605030/SharedDocs/Download/DE/Themenschwerpunkte/Gesundheit/Biomedizin-Stammzellenforschung/2-Stammzellbericht,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/2-Stammzellbericht.pdf)
- [24] *UK Stem Cell Bank, Stem Cell Catalogue*, <http://www.ukstemcellbank.org.uk/catalogue.html>
- [25] *StemRide International*, [http://www.stemride.com/Stem\\_Cell\\_Bank.htm](http://www.stemride.com/Stem_Cell_Bank.htm)
- [26] Pressemitteilung von *ES Cell International* vom 27.07.2006 [http://www.escellinternational.com/pdfs/inthenews/ESI\\_27Jul06.pdf](http://www.escellinternational.com/pdfs/inthenews/ESI_27Jul06.pdf)

## Literaturverzeichnis

- [27] M. Amit et al., *Semin. Reprod. Med.* **24**, 298 (2006)
- [28] D. Solter, B. B. Knowles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 5099 (1975)
- [29] C. Ellerström et al., *Stem Cells* **24**, 2170 (2006)
- [30] J. Fletcher et al., *Cloning Stem Cells* **8**, 319 (2006)
- [31] T. E. Ludwig et al., *Nat. Biotechnol.* **24**, 185 (2006)
- [32] C. B. Ware et al., *Stem Cells* **24**, 2677 (2006)
- [33] M. Richards et al., *Stem Cells* **22**, 779 (2004)
- [34] C. F. Wu et al., *Reprod. Biomed. Online*, 6, 733 (2005)
- [35] M. J. Abeyta et al., *Hum. Mol. Gen.* **13**, 601 (2004)
- [36] S. S.-L. Li et al., *Stem Cells Dev.* **15**, 532 (2006)
- [37] M. J. Abeyta et al., *Hum. Mol. Gen.* **13**, 601 (2004)
- [38] J. B. Lee et al., *Mol. Cells* **19**, 31 (2005)
- [39] C. Allegrucci & L. E. Young, *Human Reprod.* **13**, 103 (2006)
- [40] K.-H. Chang et al., *Blood* **108**, 1515 (2006)
- [41] P. W. Burrige et al., *Stem Cells*, Vorab-Publikation *online* 21.12.2006 (2006)
- [42] M. C. Carpenter, *Dev. Dyn.* **229**, 243 (2004)
- [43] T. Enver et al., *Hum. Mol. Gen.* **14**, 3129 (2005)
- [44] M. Amit et al., *Dev. Biol.* **227**, 271 (2000)
- [45] M. Costa et al., *Nat. Meth.* **2**, 259 (2005)
- [46] K. S. Shidu, *Stem Cell Dev.* **15**, 61 (2006)
- [47] Z. Hewitt et al., *Cloning Stem Cells* **8**, 225 (2006)
- [48] J. S. Draper et al., *Nat. Biotechnol.* **22**, 53 (2004)
- [49] Rosler et al., *Dev. Dyn.* **229**, 259 (2004)
- [50] A. Maitra et al., *Nat. Genet.* **37**, 1099 (2005)
- [51] J. J. Buzzad et al., *Nat. Biotechnol.* **22**, 381 (2004)
- [52] S. N. Brimble et al., *Stem Cells Dev.* **13**, 585 (2004)
- [53] M. M. Mitalipova et al., *Nat. Biotechnol.* **23**, 19 (2005)
- [54] M. P. Imreh et al., *J. Cell. Biol.* **99**, 508, (2006)
- [55] N. R. Forsyth et al., *Cloning Stem Cells* **8**, 16 (2006)
- [56] D. C. E. Baker et al., *Nat. Biotechnol.* **25**, 207 (2007)
- [57] C. Darnfors et al., *Stem Cells* **23**, 483 (2005)
- [58] E. Sjögrön-Jansson et al., *Dev. Dyn.* **233**, 1304 (2005)
- [59] G. Caissander et al., *Chromosome Res.* **14**, 131 (2006)
- [60] H. Suemori et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 926 (2006)
- [61] M. Bibikova et al., *Genome Res.* **16**, 1075 (2006)
- [62] P. J. Rugg-Gun et al., *Nat. Genet.* **37**, 585 (2005)
- [63] B. W. Sun et al., *Hum. Mol. Gen.* **15**, 65 (2006)
- [64] M. A. Largakova et al., *Cell Cycle* **5**, 516 (2006)
- [65] S. K. Dhara & N. Benvenisty, *Nucl. Acids Res.* **32**, 3995 (2004)
- [66] L. M. Hoffmann et al., *Stem Cells* **23**, 1468 (2005)
- [67] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>
- [68] J. F. Loring, C. Campbell, *Science* **311**, 1716 (2006)
- [69] *NCBS Stem Cell Bank*, <http://www.nationalstemcellbank.org/>
- [70] M. Wadman, *Nature* **435**, 272 (2005)
- [71] siehe *The Hinxtongroup, World Stem Cell Politics*, <http://www.hinxtongroup.org/wp.html>
- [72] Guidelines for the conduct of human embryonic stem cell research, 1. Februar, 2007, <http://www.isscr.org/guidelines/ISSCRhESCguidelines2006.pdf>
- [73] Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research, The national Academies of Science, Engineering, and Medicine, 2005, <http://dels.nas.edu/bls/stemcells/guidelines.shtml>
- [74] P. Andrews, persönliche Mitteilung
- [75] S. J. Pickering et al., *Reprod. Biomed. Online*, 10, 390 (2005)
- [76] Y. Verlinsky et al., *Reprod. Biomed. Online*, 10, 105 (2005)
- [77] I. Mateizel et al. *Hum. Reprod.* **21**, 503 (2006)
- [78] Y. Verlinsky et al., *Reprod. Biomed. Online*, 13, 547 (2006)
- [79] M. Amit, 2<sup>nd</sup> Annual Meeting of the *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR), Boston, ISSCR Poster Abstracts, 65 (2004)