

Durchbruch in der Stammzellforschung?

Die Reprogrammierung von Körperzellen zu pluripotenten Stammzellen. Übersicht und Ausblick

Hintergrund

Stammzellen und Pluripotenz

Stammzellen sind Zellen, die sich einerseits unter Wahrung ihrer Identität vermehren (Selbsterneuerung), andererseits verschiedene differenzierte Zelltypen des Körpers bilden können. Stammzellen unterscheiden sich nach ihrer Herkunft und ihrem Differenzierungspotenzial (■ **Tabelle 1**). Allgemein nimmt das Differenzierungspotenzial der Zellen mit fortlaufender Embryonalentwicklung ab. Die Zellen des sich entwickelnden Organismus befinden sich gewissermaßen auf einer Einbahnstraße, es scheint für sie keinen Weg zurück in einen weniger differenzierten Zustand zu geben. Eine Besonderheit stellen die Zellen der Keimbahn dar, da sie die Gameten (Eizellen und Spermien) bilden, aus denen nach der Befruchtung die wieder totipotente Zygote hervorgeht. In dieser Hinsicht wird in Keimbahnzellen die Fähigkeit gewahrt, einen ganzen Organismus zu bilden.

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung können Stammzellen isoliert und in der Zellkultur, d. h. in vitro, propagiert werden. Voraussetzung für die Stabilisierung des undifferenzierten Zustandes der Zellen in der Kultur ist jedoch, dass man ihnen geeignete Signalstoffe anbietet. Idealerweise handelt es sich dabei um

Tabelle 1	
Definition einiger Begriffe	
Totipotent	Potenzial, sämtliche Körperzellen des Fötus sowie extraembryonale Gewebe hervorzubringen. Beispiel: befruchtete Eizelle
Pluripotent	Potenzial zur Bildung sämtlicher somatischer Gewebe und Keimzellen. Beispiel: ES-Zellen/innere Zellmasse der Blastozyste
Multipotent	Potenzial zur Bildung mehrerer Zelltypen innerhalb einer Keimblattlinie. Beispiel: hämatopoetische Stammzellen/adulte somatische Stammzellen
Unipotent	Potenzial zur Bildung nur eines differenzierten Zelltyps. Beispiel: spermatogoniale Stammzelle

Substanzen, die die Zellen auch in ihrer natürlichen Mikroumgebung (Nische) vorfinden. Auf diese Weise gelang zunächst die Kultivierung und Vermehrung pluripotenter Zellen, die aus Blastozysten der Maus isoliert worden waren. Die kultivierten Zellen wurden als embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bezeichnet. ES-Zellen können unter geeigneten Bedingungen im undifferenzierten Zustand gehalten und im Grunde unbegrenzt vermehrt werden. Wenn man sie wieder in Blastozysten einführt und diese in die Gebärmutter einer scheinsschwangeren Maus überträgt, beteiligen sie sich – unter Entstehung sogenannter chimärer Tiere – am Aufbau sämtlicher Gewebe des murinen Fötus. Eine ähnliche Methode erlaubt es sogar, Mäuse zu generieren, deren Gewe-

be vollständig aus den eingebrachten ES-Zellen abgeleitet sind. Diese Ergebnisse sind eindeutige Nachweise für die Pluripotenz von ES-Zellen [1]. Für menschliche ES-Zellen gilt die Ausbildung gutartiger Tumore, die aus verschiedenen Geweben der 3 Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm bestehen (Teratome), in Versuchsmäusen als stringentester Pluripotenznachweis.

Die Wahrung der Pluripotenz in vitro, die durch diese Tests belegt ist, sowie ihre praktisch unbegrenzte Vermehrbarkeit machen humane ES-Zellen als Ausgangsmaterial für mögliche Zellersatztherapien interessant. Eine Vielzahl schwerer Krankheiten, die eine große Belastung für das Gesundheitswesen darstellen, beruhen auf zellulären Defizienzen [2]. Als Beispiel

für die Umsetzbarkeit und den Erfolg von Zellersatztherapien kann die seit Langem erfolgreich praktizierte Knochenmarkstransplantation genannt werden. Sie basiert auf den blutbildenden Eigenschaften somatischer hämatopoetischer Stammzellen im adulten Knochenmark. Der potenzielle medizinische Wert eines gegebenen Stammzelltyps ist allerdings umso größer, je höher sein Differenzierungspotenzial, d. h. seine Fähigkeit ist, sich in verschiedene Zelltypen zu entwickeln. Die Erforschung des Potenzials adulter, somatischer Stammzellen hat vor einigen Jahren durch Arbeiten Auftrieb erhalten, die über die Möglichkeit ihrer Differenzierung über Keimblattgrenzen hinweg berichteten [3]. Diese Befunde waren überraschend, da somatische Stammzellen aufgrund ihres späten ontogenetischen Ursprungs eigentlich keine pluripotenten Eigenschaften besitzen sollten. In der Tat gibt es an diesen Ergebnissen ernst zu nehmende Zweifel, d. h., es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie auf Kultivierungsartefakte, mangelhafte Dateninterpretationen sowie eine unzureichende Stringenz beim Nachweis des Differenzierungspotenzials beruhen. Die Beweislage für die Plastizität adulter somatischer Stammzellen ist somit unbefriedigend [1]. Im Gegensatz dazu ist die Pluripotenz von ES-Zellen zweifelsfrei belegt und steht in Übereinstimmung mit ihrem frühen embryonalen Ursprung.

Patientenspezifische ES-Zellen

Da sich ES-Zellen nach ihrer Wiedereinführung in Blastozysten am Aufbau sämtlicher somatischer Gewebe beteiligen, sollte es prinzipiell möglich sein, aus ihnen auch in vitro jedes beliebige Körpergewebe zu generieren. Um ES-Zellen in der Kulturschale gezielt in die gewünschte Richtung zu differenzieren, ist es am besten, sie dort den Signalen auszusetzen, die auch in vivo wirken, d. h., diese Signale in vitro zu imitieren. Es gilt hier also, das Wissen über die Embryonalentwicklung von Säugetieren zu nutzen – was übrigens als gutes Beispiel für den Wert der Grundlagenforschung für angewandte Zwecke angeführt werden kann [2]. Ein in dieser Hinsicht sehr gutes Beispiel ist die Differenzierung humaner ES-Zellen in insulin-

produzierende Pankreaszellen unter adhärenten Bedingungen. Kroon et al. [4] differenzierten aus hES-Zellen in einem mehrstufigen Prozess, der die Abläufe während der Embryonalentwicklung simulierte, Pankreaszellen, die nach Transplantation in Mäuse funktionelle β -Zellen bildeten. Nach Glukose-Stimulation konnte im Blut der Tiere menschliches Insulin nachgewiesen werden. Dieses Beispiel zeigt recht gut, wie weit Versuche, hES-Zellen für mögliche Zellersatztherapien zu nutzen, bereits fortgeschritten sind.

Ein grundsätzliches Problem von Zellersatztherapien ist die Möglichkeit der Abstoßung der transplantierten Zellen (bei einer hES-Zelltherapie also die der ES-Zellabkömmlinge) durch das Immunsystem des behandelten Patienten [3]. Der eleganteste Weg, dem zu begegnen, wäre die Generierung patientenspezifischer ES-Zellen und ihre anschließende Differenzierung in das erforderliche Gewebe. Da hES-Zellen aber nur aus Präimplantationsembryonen gewonnen werden können, ist dieser Weg nicht gangbar. Entsprechend wurden erste Versuche unternommen, um adulte somatische Zellen in einen Zustand zurückzusetzen, der dem humaner ES-Zellen entspricht. Zum Verständnis der hier eingesetzten Verfahren ist es sinnvoll, sich zunächst die spezifischen Eigenschaften von ES-Zellen im Vergleich zu differenzierten somatischen Zellen zu verdeutlichen.

Vergleich der Eigenschaften von ES-Zellen und differenzierten somatischen Zellen

Transkriptionsfaktoren

Neben ihrer Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, sind ES-Zellen – bzw. die Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste als ihre In-vivo-Entsprechung – jederzeit in der Lage, in die Gewebe und Organe der drei Keimblätter zu differenzieren. Maßgeblich für ihre Differenzierungsrichtung sind Signalstoffe in der unmittelbaren Umgebung der Zellen. Unter Bedingungen, die die Selbsterneuerung der Zellen fördern, müssen Gene, deren Produkte Differenzierung auslösen können, inaktiv gehalten werden. Hierfür sind insbeson-

dere drei Gene – das Oct4-, Nanog- und Sox2-Gen – verantwortlich, die spezifisch in undifferenzierten ES-Zellen aktiv sind. Alle drei kodieren für Transkriptionsfaktoren, d. h. für Proteine, die an regulatorische DNA-Sequenzen binden und auf diese Weise Zielgene aktivieren oder reprimieren. Die Expression der Gene für Oct4, Nanog und mit Einschränkung Sox2 wird herabreguliert, wenn ES-Zellen differenzieren. Sie sind in somatischen Geweben inaktiv. Oct4 spielt auch in somatischen Stammzellen keine Rolle [5]. Wird Oct4 in somatischen Zellen von Mäusen zwangsweise exprimiert, führt dies zur massiven Expansion weitgehend undifferenzierter Zellen und zum frühen Tod der Tiere [6]. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Oct4 und der anderen beiden Faktoren in ES-Zellen essenziell. Inaktiviert man sie, verlieren ES-Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und differenzieren spontan [7]. Die drei Genprodukte sind also direkt mit den spezifischen Eigenschaften von ES-Zellen (Selbsterneuerung und Pluripotenz) assoziiert. Diese Fähigkeiten sind allerdings nicht auf ES-Zellen bzw. die innere Zellmasse der Blastozyste beschränkt, sondern auch in verschiedenen Stadien des Keimbahnzyklus konserviert. Im Einklang damit sind die Pluripotenzfaktoren Oct4, Nanog und Sox2 in den meisten Stadien dieser „unsterblichen“ Linie (Zygote, Blastozyste, Epiblast, Keimzellen) aktiv [8].

Einen großen Erkenntnisgewinn über die Funktionsweise der 3 zentralen Transkriptionsfaktoren hat die Identifizierung und Analyse ihrer Zielgene erbracht [9]. Es hat sich gezeigt, dass Oct4, Nanog und Sox2 zunächst einmal die Transkription ihres eigenen Gens sowie jeweils die der Gene für die beiden anderen Faktoren aktivieren. Damit bildet sich ein selbstaktivierender Schaltkreis. Dies erklärt, wie die Selbsterneuerung von ES-Zellen, die unter anderem durch die Aufrechterhaltung der Expression von Oct4, Nanog und Sox2 gekennzeichnet ist, auf molekularer Ebene gesteuert wird. Des Weiteren ist das Zusammenwirken dieser 3 Faktoren maßgeblich für die Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Zielgene, deren Genprodukte in ES-Zellen spezifische Funktionen wahrnehmen – z. B. bei der Generierung

und Verarbeitung extrazellulärer Signale, die die Selbsterneuerung indirekt fördern [10]. Die Koregulation dieser Gene durch diese 3 (und vielleicht einige wenige weitere) Faktoren lässt den Schluss zu, dass die Selbsterneuerung von ES-Zellen nur möglich ist, wenn die Integrität der aus ihnen bestehenden Kernmaschinerie gewährleistet ist. Umgekehrt könnte diese hinreichend sein, um ein ES-Zellprogramm zu etablieren: Die Aktivität der zentralen Transkriptionsfaktoren würde zur Aktivierung weiterer ES-zellspezifischer Gene führen, deren Genprodukte ihre Funktion wahrnehmen und z. T. weitere Gene aktivieren usw. – Oct4, Nanog, Sox2 stellen den Kern des Selbsterneuerungssystems in ES-Zellen dar, weil sie an der Spitze dieses hierarchischen Netzwerkes stehen.

Schließlich setzt die Selbsterneuerung von ES-Zellen voraus, dass Differenzierungsprogramme unterdrückt werden. Von extrazellulären Signalen gesteuert, wird die zelluläre Differenzierung u. a. durch die Aktivierung von Genen für spezifische Transkriptionsfaktoren vermittelt. Einige solcher Faktoren besitzen das Potenzial, zelluläre Programme vollständig zu modifizieren. So ist z. B. die Expression des Cdx2-Transkriptionsfaktors in ES-Zellen ausreichend, um sie in extraembryonale Zellen (Trophektoderm-Zellen, TE-Zellen) zu differenzieren [11]. Um den undifferenzierten Zustand in ES-Zellen aufrechtzuerhalten, müssen also Gene, die für Proteine mit Differenzierungspotenzial kodieren, reprimiert werden bzw. reprimiert bleiben. Daten von Boyer und Kollegen [9] sprechen dafür, dass auch diese Aufgabe von den 3 Proteinen Oct4, Nanog und Sox2 wahrgenommen wird. Gemeinsam oder einzeln binden sie an regulatorische Sequenzen einer Vielzahl von Genen für entwicklungsrelevante Transkriptionsfaktoren und halten diese in einem inaktiven Zustand. Somit scheinen wenige zentrale Faktoren auszureichen, um das Genexpressionsprofil (Transkriptom) von ES-Zellen zu etablieren und zu erhalten.

Epigenetische Mechanismen

Der Übergang embryonaler Stammzellen aus dem undifferenzierten in den differenzierten Zustand wird nicht nur über

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2008 · 51:1005–1013
DOI 10.1007/s00103-008-0628-0
© Springer Medizin Verlag 2008

B. Greber · H. Schöler

Durchbruch in der Stammzellforschung? Die Reprogrammierung von Körperzellen zu pluripotenten Stammzellen. Übersicht und Ausblick

Zusammenfassung

Humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen) sind in der Lage, sämtliche Gewebe des Körpers zu bilden, und stellen damit ein attraktives Ausgangsmaterial für zukünftige zelltherapeutische Ansätze dar. Dem möglichen Problem der Abstoßung der aus diesen Zellen generierten und transplantierten Gewebe durch das Immunsystem des behandelten Patienten könnte durch die Herstellung patientenspezifischer hES-Zellen begegnet werden. Zur Erzeugung solcher Zellen müssten die Kerne körpereigener, bereits ausdifferenzierter Zellen in einen frühen embryonalen

Zustand zurückversetzt, d. h. reprogrammiert werden. Im vorliegenden Beitrag sollen die verschiedenen Strategien zur Reprogrammierung von Körperzellen in embryonale Stammzellen besprochen und bewertet sowie Hintergrundinformationen zum Verständnis dieser Technologie gegeben werden.

Schlüsselwörter

Reprogrammierung · Zellkerntransfer · Zellfusion · Epigenetik · Transkriptionsfaktoren

A breakthrough in stem cell research? Reprogramming somatic cells into pluripotent stem cells

Abstract

Embryonic stem (ES) cells are capable of generating all cell types and tissues of the body. As such they represent an attractive source for therapeutic approaches. However, transplanted cells may be rejected by the immune system. One way to address this problem is to generate patient-specific ES cells. This, however, requires the transformation of the genetic program of somatic cells back to that of an early embryonic state. The field of stem cell research and

reprogramming is rapidly evolving. This article aims at providing background information to understand some of the most exciting recent developments. Subsequently, the different existing strategies of converting somatic cells into ES-like cells are reviewed and evaluated.

Keywords

Reprogramming · nuclear transfer · cell fusion · epigenetics · transcription factors

die Kontrolle der Genexpression mittels spezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert, sondern auch über epigenetische Mechanismen/Prozesse. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang chemische Modifikationen der DNA oder DNA-assoziiierter Proteine (z. B. Histone), die die Zugänglichkeit des Transkriptionsapparates zu bestimmten Genabschnitten erleichtern oder unterbinden können.

DNA-Methylierung. So unterbindet z. B. eine DNA-Methylierung in regulatorischen Genbereichen (Promotoren) im Allgemeinen die Transkription/Expression eines Gens, d. h., sie wirkt repressiv. Die DNA somatischer bzw. differenzierter Zellen ist stärker methyliert als die der Zellen der inneren Zellmasse bzw. die von ES-Zellen. Diese Beobachtung steht im direkten Zusammenhang mit der Tatsache, dass Zellen eines späteren Entwicklungsstadiums in ihrem Potenzial eingeschränkter sind als frühe embryonale Zellen. Gene mit einem relativ hohen GC-Gehalt im Promoterbereich (also mit CpG-Inseln, die meist nicht methyliert werden) sind in ES-Zellen zumeist aktiv [12]. Ein großer Teil von ihnen bleibt dies auch in differenzierten Zellen. Eine Reihe von Schlüsselgenen der Embryonalentwicklung wird jedoch im Laufe der fortschreitenden Entwicklung/Differenzierung inaktiviert. Prominente diesbezügliche Beispiele sind die Gene für die Pluripotenzfaktoren Oct4 und Nanog, deren Promotorbereiche in somatischen Geweben methyliert sind. Die DNA-Methylierung ist somit ein Mechanismus, um vollzogene Entwicklungs-/Differenzierungsschritte zu fixieren, d. h. unumkehrbar zu machen [13]. Sollen somatische Zellen „künstlich“ in einen pluripotenten Zustand zurückversetzt werden, so sind reprimierende epigenetische Modifikationen wie die DNA-Methylierung im Oct4-Promoter wieder aufzulösen.

Histonacetylierung. Neben der DNA-Methylierung sind verschiedene chemische Modifikationen an DNA-Verpackungsproteinen, hier in erster Linie von Histonen, beschrieben worden. Eine Möglichkeit ist ihre Acetylierung. Die Bindung der Acylgruppe an den N-Terminus der Histon-Proteine neutralisiert ihre positive

Ladung und lockert die Wechselwirkung mit negativ geladenen Phosphatgruppen in der DNA. Dies bedingt wiederum eine Auflockerung der Chromatinstruktur, wodurch die DNA für die Transkriptionsmaschinerie leichter zugänglich wird. Histonacetylierung ist daher allgemein mit Genaktivierung korreliert [14]. ES-Zellen exprimieren zwar nicht notwendigerweise mehr Gene als differenzierte Zellen, müssen aber jederzeit in der Lage sein, unterschiedliche Differenzierungsprogramme zu aktivieren. Insgesamt liegt daher das Chromatin in ES-Zellen in einer relativ offenen, decondensierten Form vor und zeigt eine allgemein ausgeprägtere Histonacetylierung. Die Differenzierung der Zellen geht mit der Kondensation des Chromatins und einem Verlust der Chromatindynamik einher [15]. Auch solche strukturellen Besonderheiten des ES-Zellchromatins gilt es, beim Reprogrammieren somatischer Zellen wiederherzustellen.

Histonmethylierung. Eine weitere Klasse wichtiger epigenetischer Modifikationen stellen Methylierungen an Lysinresten von Histonen dar. Im Gegensatz zur Acetylierung wird der Effekt der Histonmethylierung auf die Genexpression von der jeweiligen Methylierungsposition bestimmt: Die Methylierung des Histons H3 am Lysinrest 27 wirkt z. B. repressiv und wird durch die sogenannten Polycomb-Proteinkomplexe vermittelt. Genomweite Lokalisierungsstudien haben gezeigt, dass Polycomb-Komplexe in ES-Zellen an eine Vielzahl von Genen binden, die in Entwicklungsprozessen – u. a. bei der zellulären Differenzierung – eine wichtige Rolle spielen [16, 17]. Die Methylierung des Histons H3 am Lysinrest 4 korreliert hingegen mit Genaktivierung [18]. Man sollte meinen, dass sich das gleichzeitige Auftreten aktivierender und repressiver Histonmethylierungen an definierten Genen gegenseitig ausschließt. Völlig überraschend war deshalb die Erkenntnis, dass sich bei einem Teil der Gene in ES-Zellen, und zwar wieder bevorzugt bei jenen, die für Differenzierungsfaktoren kodieren, beide Methylierungstypen finden [12]. Diese „bivalenten“ Gene müssen in sich selbst erneuernden ES-Zellen reprimiert werden. Ihre Produkte werden aber auch

für die spätere zelluläre Differenzierung benötigt, die in der Zelle jederzeit induziert werden kann. Entwicklungsrelevante Gene könnten daher über epigenetische Mechanismen in einem Schwebestadium zwischen Repression und potenzieller Aktivierung gehalten werden [1, 14]. Diese Hypothese ist attraktiv, aber auch umstritten – unter anderem weil bivalente Domänen nicht ausschließlich in ES-Zellen vorkommen scheinen [12]. Eindeutig ist aber, dass sich in ES-Zellen ein spezifisches Muster an aktivierenden und reprimierenden Histonmethylierungen findet. Auch dieses gilt es, im Zuge der Reprogrammierung somatischer Zellen wiederherzustellen.

Ansätze zur Reprogrammierung somatischer Zellen

Reprogrammierung durch Zellkerntransfer

Die vorangehenden Ausführungen sollen verdeutlichen, dass das Zurückversetzen somatischer Zellen in einen frühen embryonalen Zustand (Reprogrammierung) ein äußerst komplexer Prozess wäre, der viele Schritte umfasst, die in ihrer Summe natürlicherweise nicht durchlaufen werden. Nur einzelne der erforderlichen Reprogrammierungsstufen finden sich zu speziellen Zeitpunkten in der Entwicklung eines Säugers. Ein Beispiel dafür ist die umfassende Demethylierung der DNA des männlichen Vorkerns unmittelbar nach der Befruchtung einer Eizelle [8]. Diese Demethylierungs-/Reprogrammierungsaktivität wirkt sogar auf Zellkerne, die aus differenzierten Körperzellen in eine unbefruchtete, entkernte Eizelle übertragen werden: Das Klonschaf Dolly war der lebende Beweis dafür, dass sich in Eizellen von Säugetieren in der Tat eine solche Reprogrammierungsaktivität findet und die Umkehr der Entwicklung, die somatische Zellen auf molekularer Ebene durchlaufen haben, möglich ist. Obgleich technisch anspruchsvoll, ist die Reprogrammierung durch Zellkerntransfer konzeptionell einfach: Aus einer unbefruchteten Eizelle wird der Kern/die Chromosomen entfernt und der Kern einer somatischen Zelle eingeführt. Da dies keine Befruchtung darstellt, muss die re-

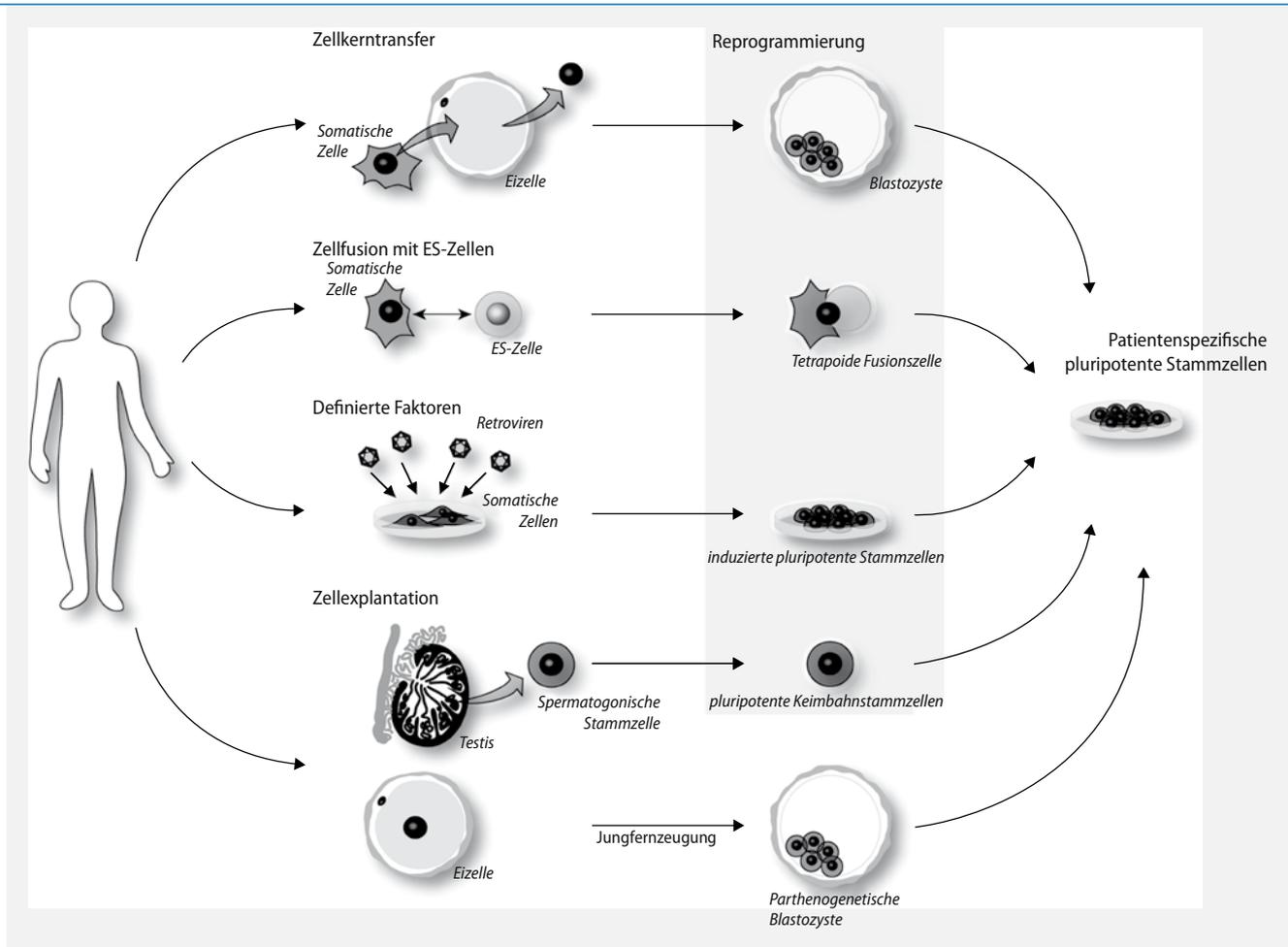


Abb. 1 ▲ Ansätze zur Generierung patientenspezifischer ES-Zellen. In allen Fällen wird von Körperzellen eines Spenders ausgegangen. Die Reprogrammierung durch Zellkerntransfer erfordert zusätzlich Spendereizellen. ES-Zellen können aus den entstehenden Blastozysten abgeleitet werden. Die Fusion somatischer Zellen mit ES-Zellen ergibt ES-zellartige Zellen mit doppeltem Chromosomensatz. Die Reprogrammierung mit definierten Faktoren basiert derzeit auf deren Einschleusung in Körperzellen mithilfe von Retroviren. Explantierte spermatogoniale Stammzellen können unter geeigneten Bedingungen spontan zu ES-Zellen reprogrammiert werden. Die Ableitung von parthenogenetischen ES-Zellen durch Jungfernzeugung beinhaltet hingegen keine Reprogrammierung

konstruierte Eizelle anschließend mittels spezieller Chemikalien zur Teilung ange regert werden und vollzieht in der Zellkul tur im Idealfall die gleiche Entwicklung zur Blastozyste wie eine natürlich befruchte te Eizelle. Beim reproduktiven Klonen von Säugetieren wird der Embryo dann im Blastozystenstadium in die Gebärmu ter eines schein schwangeren Tieres über tragen. Beim therapeutischen Klonen hingegen würden die erzeugten mens chlichen Blastozysten für die Gewinnung patientenspezifischer ES-Zellen verwen det (■ Abb. 1).

Reproduktives Klonen. Das reproduktive Klonen von Säugetieren ist sehr ineffizi ent, und die wenigen lebend geborenen Tiere zeigen oft Anomalien [19]. Dies ist

in den meisten Fällen auf eine fehlerhafte Reaktivierung des embryonalen Ent wicklungsprogramms auf molekularer Ebene, also auf eine unvollkommene Reprogram mierung des Genoms im übertragenen Kern der ausdifferenzierten somatischen Donorzelle, zurückzuführen [20]. Dies ist nicht verwunderlich, da der Eizelle für diesen Prozess nur ein kurzer Zeitraum zur Verfügung steht. Entsprechend lag die Frage nahe, ob Donorzellen, die einer totipotenten, natürlichen Zygote bezüglich ihres epigenetischen Entwicklungsstandes näher stehen, leichter zu reprogrammieren sind. In der Tat ist die Effizienz des Klonens nach der Übertragung von Zell kernern aus embryonalen Stammzellen höher als z. B. nach einer Übertragung von Kernen aus embryonalen Fibroblas-

ten und deutlich höher als bei der Ver wendung einer terminal differenzierten Körperzelle als Kerndonor [19]. Nach wie vor ist unklar, welche Faktoren in der Säuge reizeille Träger der Reprogrammie rungsaktivität sind. Wahrscheinlich ist aber, dass sich unter ihnen Chromatinre modellierungsfaktoren befinden [21]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass nicht nur unbefruchtete Eizellen, sondern auch Zygoten in der Lage sind, somatische Zellkerne zu reprogrammieren – aber nur, wenn sie künstlich in einem bestimmten Kernteilungsstadium arretiert werden [22]. In diesem Stadium liegen im Zyto plasma Reprogrammierungsfaktoren vor, die nach dem Kernaustausch auf das ein geführte somatische Chromatin einwir ken können. Diese Ergebnisse sind mit

Blick auf das therapeutische Klonen (siehe unten) von Bedeutung, da – als Resultat künstlicher Befruchtungen – weltweit deutlich mehr überzählige menschliche Zygoten als unbefruchtete Eizellen eingefroren gelagert sind.

Therapeutisches Klonen. Der Ansatz des therapeutischen Klonens wurde bereits in Mäusen erprobt: R. Jaenisch und seinen Mitarbeitern gelang es auf diese Weise, bei den Tieren einen Gendefekt zu korrigieren [23]: Sie entnahmen Körperzellen erkrankter Tiere [immundefiziente Rag2(-/-)-Mäuse] Zellkerne, führten diese in entkernte Eizellen ein und ließen diese in der Zellkultur zu Blastozysten entwickeln. Aus der inneren Zellmasse dieser Blastozysten wurden ES-Zellen gewonnen, der in ihnen vorliegende Gendefekt durch homologe Rekombination korrigiert und die resultierenden korrigierten Zellen in hämatopoetische Vorläufer differenziert, die schließlich zur Zelltherapie der erkrankten Tiere eingesetzt wurden. Auch bei Menschen und Primaten sind in Bezug auf das therapeutische Klonen Fortschritte erzielt worden. So gelang kürzlich die Erzeugung menschlicher Blastozysten nach dem Transfer adulter Bindegewebszellkerne in entkernte Eizellen [24]. Bei Rhesusaffen konnten bereits ES-Zelllinien aus geklonten Blastozysten gewonnen werden [25]. Interessanterweise sind durch Klonen erzeugte ES-Zellen (NT-ES-Zellen) von herkömmlich gewonnenen ES-Zellen nicht zu unterscheiden [26]. NT-ES-Zellen hätten gegenüber diesen mit Blick auf ihre Anwendung als Zelltherapeutikum keine Nachteile, dafür aber den Vorteil, dass sie spezifisch für einen Patienten erzeugt und damit immunkompatibel wären. Die Tatsache der funktionellen Äquivalenz zwischen NT- und normalen ES-Zellen legt weiterhin nahe, dass die zumeist unvollkommene Reprogrammierung durch die Faktoren in der entkernten Eizelle im Zuge der ES-Zellkultivierung vervollständigt wird. ES-Zellen selektieren sich gewissermaßen selbst auf funktionelle Integrität. Dies sollte heißen, dass auch ES-Zellen selbst Reprogrammierungsaktivität besitzen.

Reprogrammierung durch Zellfusion mit ES-Zellen

Dass ES-Zellen eine Reprogrammierungsaktivität besitzen, zeigt sich daran, dass sich Fusionsprodukte aus ihnen und somatischen Zellen der Maus wie ES-Zellen verhalten. Eine solche Fusion wird nach Vermischung beider Zelltypen auf chemischem oder elektrischem Wege induziert (■ **Abb. 1**). Die Ausbeute an fusionierten Zellen ist gering, sie lassen sich aber über zuvor eingeführte Selektions- oder Fluoreszenzmarker isolieren. Fusionierte Zellen zeigen die Morphologie von ES-Zellen, besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und – mit Einschränkung – ein Differenzierungspotenzial in vivo, d. h. nach Injektion in Maus-Blastozysten. Sie sind aber in einem weitaus geringeren Maße an der Ausbildung der Gewebe und Organe beteiligt als normale ES-Zellen [27]. Die diesbezügliche Erklärung liegt in der Tetraploidie der fusionierten Zellen, d. h., sie enthalten im Vergleich zu den diploiden ES-Zellen die doppelte Anzahl an Chromosomen, was für sie nachteilig ist. Dass das somatische Genom nach der Fusion tatsächlich reprogrammiert wird, zeigen epigenetische Veränderungen, wie z. B. die DNA-Demethylierung im Oct4-Promoter [28]. Die Reaktivierung des somatischen Oct4-Gens in den Fusionszellen erfolgt überraschend schnell [29], was auf das Vorliegen aktiver Reprogrammierungsfaktoren in den ES-Zellen hindeutet. Auch die Genome menschlicher Körperzellen lassen sich auf diese Weise reprogrammieren [30]. Jedoch ist die Tetraploidie der resultierenden fusionierten Zellen ein großes Hindernis für ihre mögliche medizinische Anwendung. Zwar gibt es bereits erste Ansätze, um einzelne Chromosomen aus den Zellen zu entfernen [31], doch bedarf es neuer Methoden, um die Zellen vollständig vom ES-Zellgenom zu befreien.

Die Reprogrammierungsaktivität von ES-Zellen findet sich im Kern [32]. Um das oben dargelegte Problem der Tetraploidie nach Zellfusion zu umgehen, wurden daher vorübergehend permeabilisierte somatische Zellen mit ES-Kernextrakten behandelt, um ihr Genom zu reprogrammieren [33]. Die durch die Anwendung dieser Methode induzierten epi-

genetischen Veränderungen – wie z. B. die DNA-Demethylierung im Oct4-Promoter – sind allerdings unvollständig, und es konnte bislang keine echte Pluripotenz der behandelten Zellen erreicht werden.

Reprogrammierung durch Zellexplantation

Ein weiterer Reprogrammierungsansatz nutzt die Tatsache, dass Zellen der Keimbahn in dem Sinne mit ES-Zellen/Zellen der inneren Zellmasse verwandt sind, dass sie totipotent/pluripotent sind bzw. dem Erhalt der Toti-/Pluripotenz über Generationengrenzen hinweg dienen. Diese Gemeinsamkeit zeigt sich auf molekularer Ebene z. B. an der Expression des Markergens für Toti-/Pluripotenz, des Oct4-Gens. Spermatogoniale Stammzellen in den Testis sind zwar in vivo unipotent, sie sind die Vorläufer der Spermien (■ **Tabelle 1**). Mann kann sie aus Hoden von Mäusen isolieren und kultivieren. Drei Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass sich dabei jedoch spontan Kolonien bilden können, die ES-Zellen ähneln (■ **Abb. 1**). Diese Zellen lassen sich zudem unter den bekannten ES-Zellkulturbedingungen vermehren. Sie zeigen auch eine umfassende Differenzierungskompetenz, d. h., sie beteiligten sich nach ihrer Injektion in Maus-Blastozysten an der Ausbildung der Gewebe und Organe des sich entwickelnden Mausembryos (Chimärenbildung) [34, 35, 36]. Auch wenn es nahezu liegen scheint, so ist es noch ungeklärt, ob es tatsächlich die spermatogoniale Stammzellen sind, die sich in der Zellkultur in ES-zellähnliche Zellen umwandeln. Ungeklärt ist auch, wie dies geschieht. Jedoch scheint dieser Vorgang nicht hoch komplex zu sein, da er in der Zellkultur spontan durchlaufen wird. In diesem Zusammenhang gibt es interessante Spekulationen über die Pluripotenz als Grundzustand einer Zelle [37]. Bislang ist es noch nicht gelungen, vergleichbare Zellen aus menschlichen Testisbiopsien in der Zellkultur zu etablieren. Ihr therapeutisches Potenzial läge auf der Hand.

Auch aus weiblichen Keimbahnzellen bzw. deren Produkten, den Eizellen (Oozyten), könnten autologe ES-Zellen generiert werden – wenn auch nicht durch Reprogrammierung: Oozyten, die die

zweite meiotische Kernteilung noch nicht vollzogen haben, also diploid sind, können mithilfe von Chemikalien zur Teilung angeregt werden (Jungfernezeugung). Aus der resultierenden Blastozyste lassen sich dann ES-Zellen isolieren und kultivieren (■ **Abb. 1**). Es ist bereits gelungen, auf diese Weise menschliche ES-Zellen zu gewinnen [38].

Induzierte Reprogrammierung: Reprogrammierung mittels Expression definierter Faktoren

Ein Meilenstein auf dem Gebiet der induzierten Reprogrammierung wurde 2006 von der Arbeitsgruppe um Shinya Yamanaka erreicht [39]. Sie gingen bei ihrer Arbeit von der Hypothese aus, dass definierte, für ES-Zellen spezifische Faktoren Träger der ihnen innewohnenden Reprogrammierungsaktivität sein müssen. Yamanaka und Kollegen wählten daher 24 Gene aus, die für den Erhalt der Pluripotenz in ES-Zellen von Bedeutung sind, und exprimierten sie in murinen embryonalen Bindegewebszellen. Ein in diese somatischen Zellen eingeführtes Selektionssystem auf der Basis eines unabhängigen ES-zellspezifischen Gens (Fbx15) sollte es ermöglichen, erfolgreich reprogrammierte Zellen zu isolieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Überexpression von 4 Genen – des Oct4-, Sox2-, Klf4- und c-Myc-Gens – in den Bindegewebszellen ausreicht, um ES-zellähnliche Zellen zu generieren (■ **Abb. 1**). Das Verfahren erfordert zwar viel Zeit (ca. 3 Wochen) und ist wenig effizient (nur ca. eine von 10.000 Zellen wird reprogrammiert). Die resultierenden Zellen sind aber zur Selbsterneuerung befähigt und scheinen sich nach Injektion in Maus-Blastozysten an der Ausbildung der verschiedenen Organe/Gewebe des sich entwickelnden Mausembryos zu beteiligen. Sie wurden daher als „induziert pluripotente Stammzellen“ (iPS-Zellen) bezeichnet. Allerdings unterscheiden sich diese Fbx15-selektierten iPS-Zellen noch von ES-Zellen, d. h., sie scheinen nicht vollständig reprogrammiert zu sein. Ein Austausch des Fbx15-Selektionsmarkers gegen einen, der von den Promotoren des Oct4- oder Nanog-Gens kontrolliert wird, führte zu iPS-Zellen, die von ES-

Zellen nicht mehr zu unterscheiden waren [40, 41, 42]. Diese iPS-Zellen „der zweiten Generation“ erfüllen alle oben skizzierten Kriterien für vollständige Reprogrammierung: Reaktivierung der endogenen Oct4- und Nanog-Expression nach Demethylierung des jeweiligen Gen-Promoters, Übereinstimmung der Genexpressionsmuster mit dem von ES-Zellen, erhöhte Histonacetylierung, ES-zelltypisches aktivierendes und reprimierendes Histonmethylierungsmuster sowie volles Entwicklungspotenzial.

Voraussetzung für die Fähigkeit von iPS-Zellen, wie ES-Zellen in sämtliche Körpergewebe differenzieren zu können, scheint die Inaktivierung der zuvor eingeschleusten 4 Faktoren nach erfolgter Reprogrammierung zu sein [43]. Bei Verwendung retroviraler Vektoren zur Übertragung der genannten Faktoren erfolgt diese im Verlauf der Reprogrammierung automatisch. Allerdings besteht die Gefahr, dass die Transgene im Verlauf der späteren Differenzierung der Zellen wieder reaktiviert werden. c-Myc ist als Onkogen bekannt, und tatsächlich entwickelten 20 % der aus iPS-Zellen abgeleiteten Mäuse Tumoren [42]. Daher ist es als wichtiger Fortschritt zu werten, dass iPS-Zellen auch ohne Beteiligung des c-Myc-Gens generiert werden können, wenn auch mit geringerer Ausbeute [44]. Von entsprechender Bedeutung ist zudem die Möglichkeit, iPS-Zellen ohne die vorangehende genetische Manipulation der ursprünglichen Zellpopulation erzeugen zu können [45]. Beide Verfahren wurden bereits zur Gewinnung erster humaner iPS-Zellen eingesetzt. Ähnlich wie NT-ES-Zellen [23] wurden auch iPS-Zellen im Mausmodell (Mausmodell für die Sichelzellanämie) im Hinblick auf ihr therapeutisches Potenzial erprobt [46].

Die obigen Ausführungen verdeutlichen die rasante Entwicklung der Techniken zur induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen. Die ihr zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch nach wie vor nicht gut verstanden. Bekannt ist, dass alle 4 für die Reprogrammierung erforderlichen Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren. Die zentralen Funktionen der Faktoren Oct4 und Sox2 bei der Kontrolle der ES-zellspezifischen Genexpression wurden oben er-

läutert. Beide sind für die Reprogrammierung unabdingbar. Die Rolle von Klf4 und c-Myc ist hingegen noch ungeklärt. Diskutiert wird, dass Klf4 und c-Myc unterschiedliche akzessorische Funktionen im Reprogrammierungsprozess wahrnehmen und unter anderem eine Öffnung des somatischen Chromatins bewirken, um Oct4 und Sox2 Zugang zu ihren Zielgenen zu verschaffen [21]. Allerdings können Klf4 und c-Myc wohl auch gegen andere Faktoren ausgetauscht werden [47]. Angesichts der epigenetischen Besonderheiten von ES-Zellen ist dies durchaus überraschend, d. h., es erstaunt, dass für die Chromatinremodellierung offensichtlich keine hoch spezialisierten Proteine benötigt werden. Jedoch ist festzuhalten, dass die durch die 4 Faktoren induzierte Reprogrammierung sehr viel mehr Zeit erfordert als z. B. die durch Zellfusion vermittelte. Möglicherweise fehlen hier noch wichtige Komponenten. So wie sich die 4-Faktor-Reprogrammierung derzeit darstellt, erfolgt sie asynchron und graduell, d. h., es lassen sich mehrere Zwischenstufen charakterisieren [43, 48]. Die zahlreichen erforderlichen epigenetischen Veränderungen erfolgen stochastisch, in kleinen Schritten, die durch die kontinuierliche Expression der 4 in die Zellen von außen eingebrachten Faktoren festgeschrieben werden. Erst in einem späten Stadium (nach ca. 2 Wochen) werden die endogenen, d. h. zellulären Oct4-, Nanog- und Sox2-Gene aktiviert und die Fähigkeit zur Selbst-Erneuerung der Zellen induziert, sodass sie von den eingeschleusten Faktoren unabhängig werden.

Ausblick

Die Reprogrammierung somatischer Zellen zurück zu einem ES-zellähnlichen Zustand bietet sich als Grundlage für die zukünftige Entwicklung patientenspezifischer Zelltherapieverfahren an. Die gegenwärtig bekannten, oben dargelegten Reprogrammierungsmethoden haben verschiedene Vor- und auch Nachteile:

Zellkerntransfer. NT-ES-Zellen sind normalen ES-Zellen in ihrem Entwicklungspotenzial ebenbürtig. Ihre Generierung ist jedoch technisch anspruchsvoll und wenig effizient. Da der Zugang zu mensch-

lichen Eizellen (oder Zygoten) zudem limitiert ist, ist nicht zu erwarten, dass das therapeutische Klonen jemals breite Anwendung finden wird. Zudem ist die Methode ethisch umstritten, da die Ableitung von NT-ES-Zellen die Erzeugung von NT-Embryonen erfordert.

Zellfusion. Das Verfahren der Zellfusion ermöglicht es, somatische Zellen in recht einfacher Weise und innerhalb kurzer Zeit zu reprogrammieren. Sein gravierender Nachteil liegt aber in der Tetraploidie der entstehenden Zellen. Bislang gibt es keine Methoden, um das ES-Zellgenom in den Fusionsprodukten vollständig zu eliminieren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass in Zukunft erfolgreiche diesbezügliche Ansätze entwickelt werden.

Zellimplantation. Eine Reprogrammierung durch Zellimplantation ist wohl nur bei Stammzellen der Keimbahn möglich. Ethische Bedenken könnten gegen die Methode nicht erhoben werden. Allerdings ist sie technisch aufwendig und schwierig. Zudem nimmt die Reprogrammierungseffizienz wohl mit zunehmendem Alter des Keimbahnzellenspenders ab. Menschliche ES-zellartige Linien konnten auf diese Weise noch nicht erzeugt werden, obwohl entsprechende Anstrengungen unternommen werden.

Induzierte Reprogrammierung. Am dynamischsten entwickelt sich derzeit das Gebiet der induzierten Reprogrammierung somatischer Zellen durch das Einbringen definierter Faktoren. Die Methode ist attraktiv, weil sie mit relativ einfachen Mitteln auskommt und an leicht zugänglichen Bindegewebszellen, z. B. aus der Haut, durchgeführt werden kann. Dass nach dem derzeitigen Stand der Technik nur etwa eine von 10.000 Zellen vollständig reprogrammiert wird, ist in der Praxis eher unerheblich, da eine Zellkultur in der Regel ein Vielfaches dieser Zellzahl enthält. Einen Nachteil stellt allerdings die bislang noch erforderliche Integration der Vektoren, die für die Faktoren kodieren, in das Genom der Zellen dar: Zum einen könnten auf diese Weise Gene, die für die Zelle von Bedeutung sind, inaktiviert werden. Zum anderen besteht die Gefahr der späteren Reaktivie-

rung der eingebrachten Gene, was zumindest im Falle des *c-Myc*-Gens die Ausbildung von Tumoren verursachen kann. Mit Blick auf den eventuell möglichen späteren Einsatz von iPS-Zellen zu therapeutischen Zwecken ist das Auftreten solcher Effekte natürlich völlig inakzeptabel. Seit 2006 werden deshalb Anstrengungen unternommen, um die genetischen Veränderungen in den Zellen möglichst zu minimieren. So wird z. B. versucht, die 4 Gene ohne Verwendung viraler Vektoren in die Zellen einzubringen und sie dort in ausreichender Menge transient überzuexprimieren. Es gäbe vielleicht sogar die Möglichkeit, in die Zellen lediglich die Genprodukte (also Oct4 usw. in Proteinform) einzuführen [49]. Vor der Umsetzung dieser Option wäre aber z. B. das Problem ihrer Ausdünnung durch Zellteilung, was den Reprogrammierungsprozess abbrechen würde, zu lösen. Es erscheint daher zunächst sinnvoller, nach Genen zu suchen, deren Genprodukte den Reprogrammierungsprozess beschleunigen, z. B. nach Faktoren, die die epigenetische Umgestaltung des somatischen Genoms gezielter bewerkstelligen. Dieser Prozess ließe sich aber eventuell auch über kleine, pharmakologisch aktive Moleküle vermitteln, die modulierend auf Signalwege in den zu reprogrammierenden Zellen einwirken [50]. Auf jeden Fall sind mit Blick auf die faktorinduzierte Reprogrammierung weitere Verbesserungen zu erwarten. Sie ist wohl die Methode mit dem größten Potenzial.

Korrespondierende Autoren

Dr. Boris Greber, Prof. Dr. Hans Schöler

Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin
Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie
Röntgenstraße 20
48149 Münster, BRD
E-Mail: office@mpi-muenster.mpg.de
(Sekretariat)

Literatur

1. Jaenisch R, Young R (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132:567–582
2. Murry CE, Keller G (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132: 661–680

3. Schöler HR (2004) Das Potenzial von Stammzellen. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 47:565–577
4. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, et al. (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26: 443–452
5. Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, et al. (2007) Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 1:403–415
6. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 121:465–477
7. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, et al. (2006) Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442:533–538
8. Surani MA, Hayashi K, Hajkova P (2007) Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128:747–762
9. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947–956
10. Greber B, Lehrach H, Adjaye J (2007) Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ES cells to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25:455–464
11. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123:917–929
12. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, et al. (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448:553–560
13. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6–21
14. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669–681
15. Meshorer E, Misteli T (2006) Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:540–546
16. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, et al. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441:349–353
17. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125:301–313
18. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, et al. (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130:77–88
19. Hochedlinger K, Jaenisch R (2006) Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441: 1061–1067
20. Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* 16:1209–1219
21. Yamanaka S (2007) Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1:39–49
22. Egli D, Rosains J, Birkhoff G, Eggan K (2007) Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 447:679–685
23. Rideout WM, Hochedlinger K, Kyba M, et al. (2002) Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109:17–27

24. French AJ, Adams CA, Anderson LS, et al. (2008) Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 26:485–493
25. Byrne J, Pedersen D, Clepper L, et al. (2007) Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450:497–502
26. Brambrink T, Hochedlinger K, Bell G, Jaenisch R (2006) ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 933–938
27. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545–548
28. Do JT, Han DW, Scholer HR (2006) Reprogramming somatic gene activity by fusion with pluripotent cells. *Stem Cell Rev* 2:257–264
29. Han DW, Do JT, Gentile L, et al. (2008) Pluripotential reprogramming of the somatic genome in hybrid cells occurs with the first cell cycle. *Stem Cells* 26:445–454
30. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K (2005) Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309:1369–1373
31. Matsumura H, Tada M, Otsuji T, et al. (2007) Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat Methods* 4:23–25
32. Do JT, Scholer HR (2004) Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* 22: 941–949
33. Taranger CK, Noer A, Sorensen AL, et al. (2005) Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 16:5719–5735
34. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, et al. (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119:1001–1012
35. Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440:1199–1203
36. Seandel M, James D, Shmelkov SV, et al. (2007) Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* 449:346–350
37. Silva J, Smith A (2008) Capturing pluripotency. *Cell* 132:532–536
38. Kim K, Ng K, Rugg-Gunn PJ, et al. (2007) Recombination signatures distinguish embryonic stem cells derived by parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer. *Cell Stem Cell* 1:346–352
39. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
40. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1:55–70
41. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318–324
42. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313–317
43. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2:151–159
44. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26:101–106
45. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25:1177–1181
46. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318:1920–1923
47. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920
48. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K (2008) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2:230–240
49. Joliet A, Prochiantz A (2004) Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6:189–196
50. Chen S, Takahashi S, Zhang Q, et al. (2007) Reverse increases the plasticity of lineage-committed mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10482–10487

Deutsche sind Spitzenreiter im Alkoholkonsum

Im Weltvergleich liegen die Deutschen mit einem jährlichen Alkoholkonsum von 10,2 Litern Reinalkohol pro Person auf Platz 5. Die Gesundheitsberichterstattung (GBE) gibt einen Überblick über die Auswirkungen des Alkoholkonsums und -missbrauchs.

Ungefähr 22 Prozent der 18–59 jährigen Deutschen trinken Alkohol in einem Ausmaß, in dem auf die Dauer physische, psychische und soziale Schäden zu erwarten sind. Dazu gehören Krebs, neurologische und psychische Störungen, kardiovaskuläre und Magen-Darm-Krankheiten, Alkoholvergiftungen, Unfälle, Selbstmorde, sowie soziale Folgen wie Gewalt und Vandalismus, familiäre und finanzielle Probleme.

Nach Tabak und Bluthochdruck stellt der Alkoholkonsum die dritthäufigste Ursache für einen frühzeitigen Tod dar. Vor allem im Osten Deutschlands sowie den Stadtstaaten liegt die alkoholbedingte Sterblichkeit durch z.B. Leberzirrhose oder alkoholische Myokardiopathie, deutlich über dem Bundesdurchschnitt von 17,6 alkoholbedingten Todesfällen pro 100.000 Einwohner. In Mecklenburg-Vorpommern lag im Jahr 2005 die alkoholbedingte Mortalitätsrate mit 34,4 Todesfällen pro 100.000 im Vergleich fast doppelt so hoch. Weiterhin erfolgten im Jahr 2006 bundesweit 40 Prozent der Totschlagsfälle unter Alkoholeinfluss.

Zusätzlich zur Darstellung solcher Konsumentenmuster und ökonomischen Auswirkungen des Alkoholmissbrauchs bietet das Heft „Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen“ der GBE eine Übersicht über Therapiemethoden, präventive Maßnahmen und neue Forschungsperspektiven.

Quelle:

*Robert Koch-Institut, GBE, Berlin
www.rki.de*