

Das Potenzial von Stammzellen

Eine Bestandsaufnahme

Bis vor einigen Jahren in der Öffentlichkeit nahezu unbekannt, ist der Begriff „Stammzellen“ zu einer Zauberformel geworden, der in Zukunft nahezu alle unsere medizinischen Probleme lösen soll. Aktuelle Schätzungen für die USA besagen, dass mehr als 128 Millionen Menschen durch Stammzellen geholfen werden könnte – das ist fast die Hälfte der Bevölkerung. Legt man denselben Prozentsatz für Deutschland zugrunde, so wären dies mehr als 38 Millionen Menschen. Die folgende Bestandsaufnahme soll zeigen, was durch Stammzelltherapie machbar oder zumindest im Bereich des Möglichen ist und wo die Grenzen zum Unmöglichen liegen [1]. Sie sollte auch die Basis für ethische und gesellschaftspolitische Diskussionen schaffen, die nicht Gegenstand dieses wissenschaftlichen Überblicks sind.

Adulte Stammzellen

Die Hoffnung, dass viele Krankheiten eines Tages mit Stammzellen behandelt werden könnten, beruht vor allem auf dem langjährigen Erfolg von Transplantationen des Knochenmarks. Vor mehr als 40 Jahren wurde festgestellt, dass sich in dem transplantierten Material eine Blut bildende Stammzelle, hämatopoetische Stammzelle (HSZ) genannt, befindet und dass diese für den Erfolg der Transplantationen verantwortlich ist [2]. Einen gewaltigen Aufschwung hat das Feld der Stammzellforschung vor etwa 4 Jahren erhalten, als Veröffentlichungen nahe legten, dass adulte Stammzellen in viele unterschiedliche Zelltypen differenzieren können. Bis dahin schien

diese Eigenschaft embryonalen Stammzellen vorbehalten.

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in einem ansonsten differenzierten Gewebe oder Organ vorkommen. Sie erneuern sich ein Leben lang, wobei sie einerseits identische Kopien ihrer selbst erzeugen, andererseits in spezialisierte Zellen des jeweiligen Gewebes differenzieren [3]. Man hat adulte Stammzellen in einer Vielzahl von Organen und Geweben entdeckt: Knochenmark, Gehirn, Epidermis, Blut, Leber, Haut, Auge, Darm, Bauchspeicheldrüse (Pankreas) und Skelettmuskel sind Beispiele dafür. Die Verwendung adulter Stammzellen für die Therapie von Krankheiten des Menschen wäre aus verschiedenen Gründen von Interesse. Zum einen ist es die Aufgabe einer adulten Stammzelle, unterschiedliche Zellen eines bestimmten Gewebes zu bilden. Daher sollte es bei der Transplantation adulter Stammzellen im Idealfall möglich sein, all diese unterschiedlichen Zelltypen zu regenerieren. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass zumindest einige Stammzellen auch zum beeinträchtigten Gewebe wandern können [4]. Eine solche Fähigkeit würde Operationen erheblich erleichtern, weil man bei der Transplantation das Zielgewebe weniger präzise treffen müsste. Außerdem ist (zumindest für neuronale Stammzellen) nachgewiesen worden, dass sie Wachstumsfaktoren ausschütten, die andere Zellen im betroffenen Gewebe möglicherweise schützen oder sogar mobilisieren [5, 6]. Sollte dieser Befund allgemein gültig sein, könnte die Heilung des betroffenen Gewebes auf diese Weise erleichtert werden.

Vielleicht ist es sogar möglich, Stammzellen vor der Transplantation zur Bildung von mehr Wachstumsfaktoren anzuregen oder sie genetisch so zu verändern, dass sie die zur Regenerierung des Gewebes wichtigen Substanzen bilden.

Völlig überraschend war die Entdeckung, dass selbst adulte Stammzellen in einem ausgewachsenen Organismus noch eine hohe Plastizität aufweisen. Plastizität ist die Fähigkeit einer Zelle, sich nicht nur in Zellen des Gewebetyps, in dem sie sich befindet, sondern auch in Zellen eines anderen Gewebes entwickeln zu können. Je nach Grad der Plastizität werden solche Zellen als unipotent, oligopotent, multipotent oder pluripotent bezeichnet (Übersicht 1, [7]). Dass adulte Stammzellen eine Pluripotenz besitzen, war überraschend und nahezu unvorstellbar, hatte man doch angenommen, dass Stammzellen, die von einem der 3 Keimblätter des Embryos (Ektoderm, Mesoderm oder Entoderm) abstammen, nicht Abkömmlinge eines der anderen beiden Keimblätter generieren können. Diese Annahme wurde aber von verschiedenen Forschern widerlegt. So konnten Stammzellen aus dem Knochenmark, die selber mesodermalen Ursprungs sind, in die Hauptzelltypen des Gehirns (Neuronen, Gliazellen und Astrocyten) differenzieren, die wiederum vom Ektoderm abstammen [8]. Umgekehrt wurden Stammzellen des Gehirns in Blut- und Muskelzellen differenziert [9]. Schließlich wurde berichtet, dass neuronale Stammzellen aus dem Gehirn ausgewachsener Mäuse Zellen aller 3 Keimblätter bilden können, wenn man sie in Blastozysten injiziert [10].

Übersicht 1

Der Begriff der Potenz in der Entwicklungs- und Zellbiologie

Mit „Potenz“ bezeichnet man in der Entwicklungsbiologie die Fähigkeit bestimmter Zellen und Gewebe, sich zu differenzieren. Bei einigen Organismen erfahren die Zellen mit jeder Zellteilung eine immer stärkere Einengung ihrer Entwicklungsmöglichkeiten. Ein bekanntes Beispiel ist die streng determinierte Entwicklung bei Fadenwürmern, bei der das „Zellschicksal“ bereits sehr früh festgelegt ist. Bei anderen Organismen (u. a. Wirbeltiere) bewahren die Zellen gewisse Freiheitsgrade, sodass sie je nach Entwicklungsstadium – zum Teil zeitlebens – die Fähigkeit behalten, andere Zellen zu ersetzen. Diese Fähigkeit trägt z. B. zum hohen Regenerationsvermögen bei Amphibien bei. Die Fähigkeit zur Differenzierung nimmt in der Reihenfolge totipotent (=omnipotent), pluripotent, multipotent, oligopotent und unipotent ab, doch ist diese Abgrenzung nicht immer scharf zu ziehen und hängt von vielen Außenfaktoren (Kulturbedingungen, Vorbehandlung u. a.) ab.

Totipotenz (Omnipotenz). (a) Fähigkeit einer einzigen Zelle, einen kompletten, lebensfähigen Organismus aufzubauen. Beispiel: befruchtete Eizelle.

(b) Fähigkeit einer Stammzelle, sich in alle Zelltypen eines Organismus zu differenzieren. Embryonale Stammzellen in Kultur könnten ein Beispiel dafür sein. Allerdings ist es experimentell schwer nachzuweisen, dass sich eine Zelle tatsächlich in alle unterschiedlichen Zelltypen eines Organismus differenzieren kann. Bis dieser Nachweis erbracht ist, spricht man von Pluripotenz.

Pluripotenz. Fähigkeit einer Zelle, sich in nahezu alle Zellen differenzieren zu können, so beispielsweise in Abkömmlinge aller 3 Keimblätter. Beispiel: embryonale Stammzellen.

Multipotenz. Fähigkeit einer Zelle, sich in eine Vielzahl von Abkömmlingen zu differenzieren. Beispiel: Stammzellen des hämatopoetischen Systems (■ Abb. 1).

Oligopotenz. Fähigkeit einer Zelle, sich in wenige Abkömmlinge zu differenzieren. Beispiel: lymphoide oder myeloide Stammzellen (■ Abb. 1).

Unipotenz. Fähigkeit einer Zelle, Zellen desselben Typs zu bilden. Beispiel: Fibroblasten.

Hämatopoetische Stammzellen

Die hämatopoetischen (Blut bildenden) Stammzellen (HSZ) des Knochenmarks sind die am besten charakterisierten adulten Stammzellen (■ Abb. 1). Man findet sie nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der fötalen Leber und Milz sowie im Blut der Plazenta und in der Nabelschnur. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen bilden HSZ Zelltypen, die nicht Teil des Blutes sind, beispielsweise Leberzellen [11, 12, 13]. Weitere Untersuchungen legten nahe, dass HSZ in eine Reihe von Zellen differenzieren, die sich sogar in das jeweilige Gewebe integrieren, nämlich in Zellen der Skelettmuskulatur, der Herzmuskeln, der Blutgefäße und des Gehirns [14, 15, 16]. Eine einzelne HSZ kann sich in Abkömmlinge aller 3 Keimblätter differenzieren. Entsprechendes trifft auch für einen zweiten Stammzelltyp des Knochenmarks, für die mesenchymalen Stammzellen zu (MSZ, s. hierzu Kapitel „Mesenchymale Stammzellen“).

Auch wenn viele Publikationen die Aussichten einer Therapie mit anderen

gewebespezifischen adulten Stammzellen als HSZ sehr positiv erscheinen lassen, muss es sich hier in den meisten Fällen erst noch zeigen, ob die Ergebnisse tatsächlich auf der Plastizität dieser Stammzellen beruhen. Hierzu einige Beispiele:

■ Adulte Stammzellen sind sehr selten, schwer zu identifizieren und noch schwerer von anderen Zellen der jeweiligen Organe zu isolieren. Daher kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass sich in einem bestimmten Gewebe mehrere Stammzelltypen befinden. Es besteht also die Möglichkeit, dass eine vermeintlich definierte Stammzellpräparation in Wirklichkeit ein Stammzellgemisch darstellt. Tatsächlich wurde vor kurzem belegt, dass Stammzellen aus Muskeln der Maus, von denen zuvor angenommen worden war, dass sie alle wichtigen Zelltypen des Blutes bilden können, in Wirklichkeit dem hämatopoetischen System entstammen [17]. Diese aus Muskeln isolierten HSZ waren nämlich nicht in der Lage, in der Kulturscha-

le Kolonien zu bilden, die Muskelzellen enthalten. Dies war nur den eigentlichen Stammzellen des Muskels möglich, die gemeinsam mit den HSZ isoliert worden waren. Diese Ergebnisse wurden so erklärt, dass im Körper eine substanzialle Zahl von HSZ zirkuliert und somit auch in Muskeln zu finden ist.

■ Andere Arbeiten, wie z. B. die Differenzierung fötaler neuronaler Stammzellen der Maus in HSZ, konnten trotz eingehender Studien nicht reproduziert werden [18]. Die ursprünglich beschriebene Umwandlung in Blutzellen wurde stattdessen als ein Kultivierungsartefakt interpretiert. Möglicherweise haben die Kulturbedingungen zu genetischen Veränderungen (z. B. Mutationen) im Genom der Zellen geführt. Allerdings ist es eher wahrscheinlich, dass nicht-genetische Modifikationen für die Veränderungen verantwortlich sind. Solche Modifikationen bezeichnet man als epigenetische Markierungen, auf die weiter unten noch eingegangen wird (s. Kapitel „Epigenetische Probleme“).

■ Ein weiterer Grund für die beobachtete Plastizität mancher Stammzellen mag auch in ihrer Fusion mit anderen Zellen liegen, die zu tetraploiden Zelllinien führt [19, 20]. Hierdurch erweitern sie ihre Potenz und bilden die beobachteten und beschriebenen Gewebe.

Die oben dargelegten Ergebnisse haben die von vielen Forschern bereits zuvor geäußerte Skepsis gegenüber der Pluripotenz adulter gewebespezifischer Stammzellen noch verstärkt [21, 22, 23]. Um einen soliden wissenschaftlichen Nachweis der Pluripotenz von Stammzellen führen zu können, müssen daher in Zukunft einzelne aufgereinigte und genau definierte Zellen für die Untersuchungen benutzt werden.

Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) [24, 25] können wie HSZ Abkömmlinge aller 3 Keimblätter bilden; sie liefern beispielsweise alle Formen von Binde- und Stützgeweben, quer gestreifte Muskulatur, fast alle glatten Muskelzellen, Herzmuskulatur und Gefäßendothelien. MSZ haben großes Aufsehen erregt, da einzelne Zell-

linien mehr als 2 Jahre in Kultur gehalten wurden und wichtige Merkmale pluripotenter Zellen besitzen. Einzelne MSZ der Maus und der Ratte ließen sich in der Kultur in eine Vielzahl von Zelltypen differenzieren. Ein wichtiger Beweis für ihre Pluripotenz war der Nachweis, dass sie nach Injektion in murine Blastozysten fast alle Zelltypen bilden und sich auch in allen Organen ansiedeln können.

Da diese Zellen ein großes Potenzial zu besitzen scheinen, ist es wichtig, dass sie von vielen Laboratorien untersucht werden. Noch gibt es im Hinblick auf die MSZ zahlreiche Fragen, die zu beantworten sind: So konnten MSZ bislang nicht erfolgreich aus Menschen isoliert werden, die älter als 50 Jahre sind. Ein Grund hierfür könnte sein, dass adulte Stammzellen auch einem Alterungsprozess unterliegen [26]. Hinzu kommt, dass nach einer gängigen Hypothese der menschliche Körper nur für eine Lebensdauer von etwa 45 Jahren angelegt ist (zur Übersicht [27]). Eine äußerst wichtige Frage ist zudem, ob menschliche MSZ überhaupt für therapeutische Zwecke geeignet sind. Sollte dies der Fall sein, so darf man sich von diesem Stammzelltyp des Knochenmarks in Zukunft viel erhoffen.

Möglichkeiten und Grenzen der therapeutischen Verwendung von adulten Stammzellen

Es gibt einige Hürden, die überwunden werden müssen, bevor man adulte Stammzellen für therapeutische Zwecke einsetzen kann. Das erste Problem liegt darin, dass Stammzellen – wie bereits erwähnt – in den Organen nur in geringer Zahl vorhanden sind. So ist z. B. nur eine unter 10.000 Zellen des Knochenmarks eine HSZ. Um adulte Stammzellen sinnvoll einsetzen zu können, müssen sie aber in größeren Mengen zugänglich sein bzw. angereichert/vermehrt werden. Dies führt direkt zum zweiten Problem, dem der mangelnden Kenntnis der effektiven und optimalen Kultur- und Differenzierungsbedingungen für adulte Stammzellen. Dies liegt zum großen Teil daran, dass man über die zelluläre Umgebung von Stammzellen im Organ (sog. Nischen; engl. Stem cell niche) und über die Wachstumsfaktoren, die in die-

sen Nischen gebildet werden, nahezu nichts weiß. Ferner sind unsere Kenntnisse über das Verhalten adulter Stammzellen in einem geschädigten Gewebe und die Faktoren, die zu ihrer Vermehrung und Differenzierung benötigt werden, sehr gering.

Ein weiteres Problem ist die mögliche Abstoßung der Zellen durch das Immunsystem. Wegen der geringen Zahl der adulten Stammzellen in Geweben sind diese, wie bereits ausgeführt, nur sehr schwer zu isolieren, weshalb z. B. die meisten Knochenmarkstransplantate zahlreiche verschiedene Zelltypen enthalten. Dies ist aber nicht wünschenswert, da bei nicht übereinstimmenden Antigenen der Zelloberfläche (sog. Histokompatibilitäts-Antigene) von Spender und Empfänger eine größere Zellzahl zu einer verstärkten Immunabwehr führen kann. Daher ist es wichtig, die Verfahren zur Aufreinigung hämatopoetischer Stammzellen zu verbessern. Außerdem besiedeln angereicherte Stammzellen das Blut schneller und effizienter, was unter anderem die Infektionsrisiken verringert [28].

HSZ des Nabelschnurblutes werden vermutlich in Zukunft sehr wichtig für die Therapie von Krankheiten sein [29]. Transplantate solcher Zellen rufen interessanterweise keine starke Abwehrreaktion hervor [30]. Man nimmt an, dass die Zellen im Nabelschnurblut weniger differenziert sind als die Zellen im Blut ausgewachsener Organismen und daher weniger stark immunologisch wirken [31]. Ein beachtenswerter Vorteil von HSZ aus dem Nabelschnurblut ist auch, dass die Histokompatibilitäts-Antigene im Voraus identifiziert und katalogisiert werden können. Allerdings ist auch die Zahl der HSZ, die man aus den etwa 50 bis 150 ml Blut einer Nabelschnur-Plazenta-Präparation erhält sehr gering. Gerade hier sollte man große Anstrengungen unternehmen, Kulturbedingungen zu etablieren, die eine Proliferation und Differenzierung von HSZ ermöglichen. Dazu wird es sehr wichtig sein, die Stammzellnische im Organismus besser zu verstehen [3, 32]. Das Verständnis der Stammzellnischen von Modellorganismen wie der Fruchtfliege *Drosophila* dürfte dazu einen wichtigen Beitrag liefern [33].

Zusammenfassung

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2004 · XXX:XXX-XXX
DOI 10.1007/s00103-004-0818-3
© Springer-Verlag 2004

H. R. Schöler

Das Potenzial von Stammzellen. Eine Bestandsaufnahme

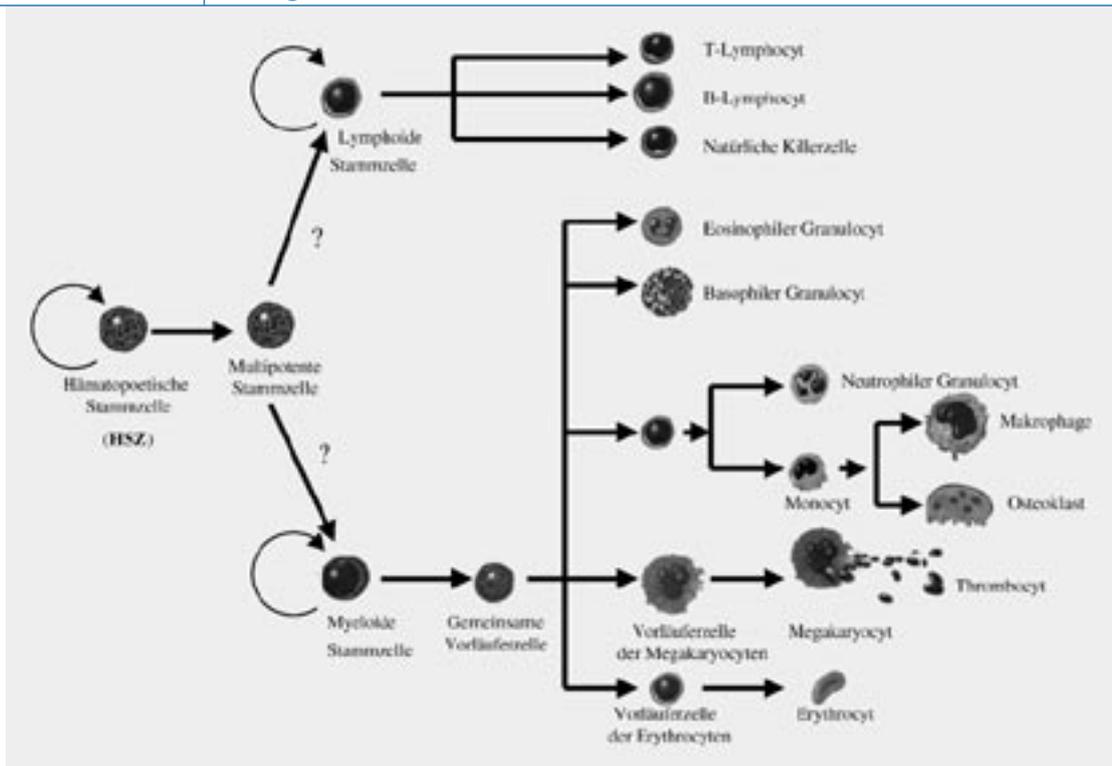
Zusammenfassung

Die Zahl der Menschen, die an unheilbar degenerativen Erkrankungen leiden, geht in die Millionen. Entsprechend setzen viele der direkt und indirekt Betroffenen derzeit große Hoffnungen auf die Erforschung und Nutzung von Stammzellen. Sind die Hoffnungen berechtigt, vermögen Stammzellen Krankheiten zu lindern oder gar zu heilen? Welche therapeutischen Einsatzmöglichkeiten bieten embryonale und adulte Stammzellen? Die Diskussion zur Erforschung und zum Einsatz humaner embryonaler Stammzellen ist wegen des therapeutischen Nutzens einerseits und der damit verbundenen „verbrauchenden Embryonenforschung“ andererseits sehr kontrovers, und die jeweiligen Standpunkte erscheinen fast unvereinbar. Reicht es, adulte Stammzellen zu erforschen und für eine Therapie einzusetzen? Gibt es eine Notwendigkeit zur Überschreitung des „Rubikon“, oder sind alternative Möglichkeiten in Sicht, um embryonalähnliche Stammzellen zu gewinnen?

Schlüsselwörter

Adulte Stammzellen · Embryonale Stammzellen · Klonen · Genetische Kontrolle · Epigenetische Kontrolle

Abb.1 ► Das hämatopoetische System. Links eine hämatopoetische Stammzelle (HSZ), die weitere HSZ hervorbringt. Deren Nachkommen können sich weiter teilen oder als multipotente Stammzellen eine lymphoide Stammzelle hervorbringen, die sämtliche Blutzellen bilden



Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESZ) bilden den Embryonalknoten (Embryoblast) der Blastozyste (■ Abb.2). Beim Menschen findet man ESZ etwa vom 4. bis zum 7. Tag nach der Befruchtung, bei der Maus etwa vom 3. bis zum 5. Tag. Danach differenzieren sich die ESZ und bilden die 3 Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm als Grundlage des fötalen Körpers.

Potenzial von embryonalen Stammzellen

Im Gegensatz zu dieser recht kurzen Entwicklungsperiode im Embryo können sich ESZ unter geeigneten Bedingungen in der Kultur unbegrenzt vermehren. Wie im Organismus können sich ESZ auch in Kultur in eine Vielzahl von Zelltypen differenzieren. Vor mehr als 20 Jahren wurden Zelllinien von ESZ (ESZ-Linien) der Maus etabliert (■ Abb.2). Seitdem hat man eine Fülle von Informationen gesammelt, um die ESZ-Linien zu kultivieren und zu differenzieren (Übersicht in [7, 34]). So konnten aus ihnen verschiedene Zellen des Nervensystems, Insulin produzierende Zellen, Knochenzellen, Zellen des hämatopoetischen Sys-

tems, Endothelzellen, Fettzellen und unterschiedliche Muskelzelltypen, wie beispielsweise Herzmuskelzellen, gebildet werden.

Menschliche ESZ-Linien wurden erstmals 1998 erfolgreich kultiviert [35]. In seiner Originalpublikation hatte James Thomson gezeigt, dass humane ESZ gutartige Tumore (Teratome) bilden, wenn man sie in Mäuse injiziert. Diese Teratome enthalten recht komplexe Gewebe ekto-, meso- und entodermalen Ursprungs. So waren in ihnen unter anderem Knochen, Zähne, Haarfollikel und Lungengewebe zu finden. Diese Ergebnisse belegen zum einen die Pluripotenz der humanen ESZ, weisen aber auch auf eine mögliche Gefahr hin. Sollten sich ESZ oder transformierte Abkömmlinge nach einer Transplantation weiterhin in einem undifferenzierten Zustand halten können, bestände die Möglichkeit der Ausprägung lebensbedrohlicher Tumore (Teratokarzinome). Um ESZ-Linien zur Therapie nutzen und gleichzeitig das Risiko einer Tumorbildung ausschließen zu können, wird man ihr biologisches Entwicklungsprogramm einengen müssen, etwa indem man es durch partielle Differenzierung in eine gewünschte Richtung lenkt. Ideal wäre es, ESZ-Linien in der Kultur in adulte Stammzellen spezifischer Potenz

zu differenzieren. Bei der Maus ist dies bereits gelungen. So wurde vor kurzem gezeigt, dass sich aus murinen ESZ-Linien neuronale Stammzellen herstellen lassen, aus denen sich wiederum funktionsfähige dopaminerge Neuronen entwickeln können [36]. Diese Zellen waren in der Lage, die Parkinson-typischen Symptome in Ratten, die als Modell für die Erkrankung dienen, deutlich zu mildern. Solche Erfolge wurden zwar schon zuvor mit neuronalen Stammzellen aus fötalen, neugeborenen und adulten Stammzellen der Maus erzielt, jedoch war es in diesen Experimenten nicht einfach, Stammzellen in ausreichender Menge zu erhalten. Durch die Transplantation von ESZ der Maus gelang es ebenfalls, Rückenmarksverletzungen teilweise zu beheben [37]. Murine ESZ wurden auch in Insulin produzierende Zellen differenziert, die nach ihrer Transplantation die Insulinregulation im diabetischen Körper zumindest zum Teil wiederherstellen konnten [38].

Humane ESZ-Linien könnten in Zukunft ebenfalls eine unerschöpfliche Quelle für Transplantationstherapien des Nervensystems, der Leber oder des Pankreas sein. Zuerst muss jedoch gezeigt werden, dass die differenzierten Zellen in einem Modellsystem Symptome einer Krankheit mildern können.

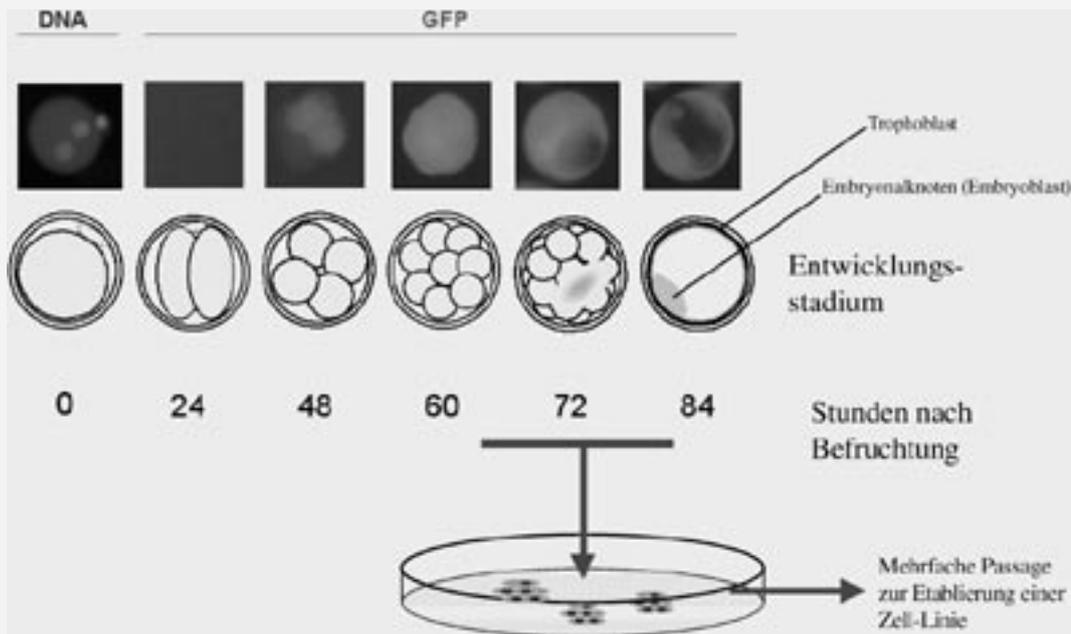


Abb.2 ▲ Gewinnung von embryonalen Stammzellen der Maus (ESZ). In der Mitte schematische Darstellung der Entwicklungsstadien. 0 Std. Befruchtete Oozyte; 24–72 Std.: verschiedene Teilungsstadien, in denen die Zellen schließlich dicht nebeneinander liegen (Maulbeerkeim, Morula); 84 Std.: Blastozyste (Hohlkeim) mit Embryonalknoten (=Embryoblast) und Trophoblast (äußere Hohlkugel). Die Aufnahmen darüber zeigen die Färbung durch das Transgen Oct-4 etwa 48 Stunden nach der Befruchtung. Die Färbung der befruchteten Oozyte zeigt den weiblichen und den männlichen Vorkern (deren Verschmelzung, Karyogamie, steht noch bevor) und ein Polkörperchen

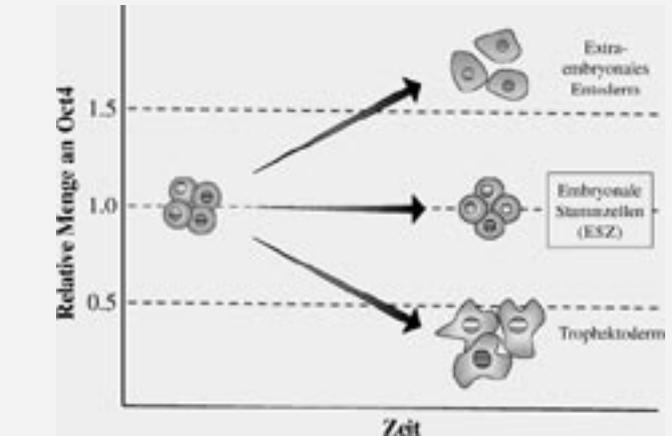
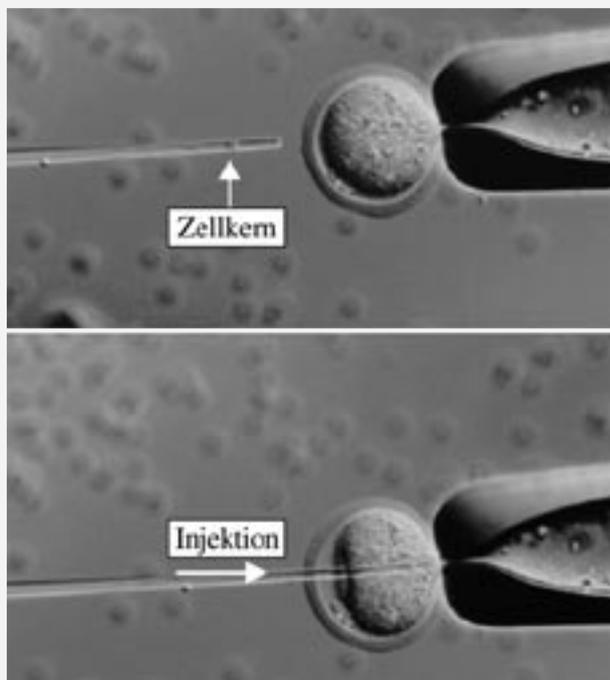


Abb.4 ▲ Oct4 und Pluripotenz. So lange das Protein Oct4 in einer bestimmten relativen Menge vorliegt, bleibt der Status einer Zelle als embryonale Stammzelle erhalten. Kommt es zu Abweichungen, so geht ihre Pluripotenz verloren

Abb.3 ◀ Transfer eines Zellkerns einer Körperzelle der Maus in eine entkernte Mausoozyte

Denkbar wären Xenotransplantationen, wie sie für das Ratten-Modell der Parkinson-Erkrankung beschrieben wurden, in diesem Fall zwischen Mensch und Affe. Ich vermute, dass in nicht allzu ferner Zu-

kunft entsprechende Berichte über Rhesusaffen veröffentlicht werden, in denen Diabetes oder Parkinson mit menschlichen, von ESZ-Linien abgeleiteten Zellen therapiert werden konnte. Neben sol-

chen funktionellen Analysen muss aber auch gezeigt werden, dass sich die transplantierten Zellen richtig in den Zellverband integrieren. Dies wird besonders wichtig für Nerven- und Herzmuskelzel-

len sein, weniger hingegen für Zellen des Blutsystems.

Probleme der Kultivierung

Um ihre Pluripotenz zu bewahren, mussten murine und humane ESZ-Linien bislang in serumhaltigem Medium und auf Nährzellen gehalten werden. Bei der Verwendung humaner ESZ ist dies möglicherweise ein Problem, da die Nährzellen aus der Maus stammen und das Serum aus Kälbern. Somit könnten Zoonosen, also Infektionen, die von Tieren auf den Menschen übertragen werden, nicht ausgeschlossen werden. Vor kurzem wurde jedoch die Kultivierung von humanen ESZ auf menschlichen Nährzellen beschrieben [39]. Es bleibt abzuwarten, ob die als Nährzelllieferanten verwendeten Gewebe (fötale Muskelzellen, fötale Hautzellen) tatsächlich notwendig sind, um die Pluripotenz der humanen ESZ-Linien zu erhalten. Um Zoonosen und natürlich auch die Verwendung menschlicher Nährzellen zu vermeiden, sollten künstliche Kultursysteme für humane ESZ-Linien etabliert werden. Dies ist kein utopisches Ziel; zumindest für ESZ der Maus ist es gelungen, der Kultur einen Faktor zuzusetzen, der von den Nährzellen produziert wird [40]. Dieser Faktor (Leukemia inhibitory factor, LIF) hat aber keinen Einfluss auf humane ESZ und ist folglich für deren Kultur nicht geeignet. Von diesen Hürden einmal abgesehen, ist die Kultivierung und Vermehrung von humanen ESZ-Linien gegenwärtig noch recht aufwändig.

Bevor man humane ESZ in Kultur nehmen konnte, wurden humane embryonale Karzinom-Zelllinien verwendet, um Untersuchungen an einem frühen embryonalen Zelltyp durchführen zu können. Im Gegensatz zu solchen Zellen weisen ESZ-Linien auch nach mehr als 2 Jahren in der Kultur noch immer einen normalen Satz an Chromosomen auf [41]. Das bedeutet jedoch nicht, dass die kultivierten ESZ-Linien frei von Mutationen sind. Wie man von anderen eukaryotischen Zellen weiß, wird mindestens eine Mutation pro Zellteilung in das Genom eingebracht [42, 43]. Somit würde man unweigerlich ein erhöhtes Risiko eingehen, wenn man Zellen aus älteren Kul-

turen für die Therapie einsetzt, d. h., es ist zu vermuten, dass diese Zellen genetische Veränderungen tragen.

Immunologische Probleme bei der Verwendung von Stammzellen

Bei der Verwendung embryonaler, fötaler oder adulter Stammzellen ist die immunologische Unverträglichkeit zwischen dem Zellspender und dem Empfänger eine große Hürde. Von wenigen Ausnahmen abgesehen (wie etwa bei eineiigen Zwillingen), wird es bei ihrer Verwendung aufgrund unterschiedlicher Histokompatibilitäts-Antigene zwischen Spender und Empfänger zu einer Abstoßungsreaktion kommen. Eine Möglichkeit, diese zu vermeiden, ist es, auf die üblichen Verfahren zurückzugreifen. Hierzu zählt z. B. die Verwendung von Immunsuppressiva oder aber die kombinierte Transplantation von eigenen (autologen) und fremden (allogenen) Stammzellen. Möglicherweise ließe sich das Problem auch lösen, wenn es gelänge, folgendes, kürzlich für die Ratte entwickelte Verfahren umzusetzen [44]: Hier wurden sowohl ganze Blastozysten als auch Zellen, die ausschließlich vom Embryoblasten der Blastozyste stammen, zur Toleranzinduktion eingesetzt. Diese Zellen sind nämlich immunologisch relativ unwirksam, was damit zusammenhängen mag, dass der Embryo während der frühen Entwicklung nicht als fremd erkannt werden soll. Dieser Vorteil könnte sich aber auch als problematisch herausstellen, wenn tatsächlich die Gefahr der Teratokarzinom-Bildung besteht, ein Aspekt, der in der Veröffentlichung nicht berücksichtigt wurde. Sollte dieses aber nicht der Fall sein und gelänge es, von etablierten humanen ESZ-Linien abgeleitete HSZ in das Blutsystem einzubringen, so könnten nachfolgend weitere Transplantationen von differenzierten Zellen oder Geweben, die von denselben ESZ abstammen, durchgeführt werden.

Es bestehen aber noch weitere Optionen um mögliche immunologische Probleme zu umgehen: Man könnte eine große Zahl von unterschiedlichen ESZ-Linien verschiedener Blastozysten in Kultur nehmen, um die Chance zu erhöhen, dass eine Übereinstimmung mit dem Histo-

kompatibilitäts-Antigen eines Empfängers vorliegt. Eine derartige Vorgehensweise wurde in England gewählt, wo man hofft, mit etwa 300 verschiedenen ESZ-Linien, den Großteil der Histokompatibilitäts-Antigene in der Bevölkerung abzudecken. Ferner besteht die Möglichkeit, die Histokompatibilitäts-Antigene durch homologe Rekombination in einer ESZ-Linie zu entfernen in der Hoffnung, dass diese Zellen nach Transplantation nicht als fremd erkannt werden. Diesen Weg hat man bereits bei der Xenotransplantation eingeschlagen. Eine Lösung der immunologischen Fragen wäre aber wohl erst möglich, wenn man durch das Verfahren des therapeutischen Klonens ESZ-Linien herstellt, die den Zellkern einer körpereigenen Zelle enthalten. Die Theorie dieses Verfahrens wird im nächsten Abschnitt erläutert.

Therapeutisches Klonen: Gewinnung von körpereigenen ESZ-Linien

Eine Stammzelltherapie ist sowohl mit fremden (allogenen) als auch mit eigenen (autologen) Zellen denkbar. Beide Optionen haben Vor- und Nachteile.

Allogene Stammzellen. Bei der Verwendung von allogenen Stammzellen besteht der Vorteil darin, dass man sie einem gesunden Organismus entnehmen kann. Eine Transplantation allogener adulter oder embryonaler differenzierter Stammzellen wäre beispielsweise zur Therapie genetischer Erkrankungen sinnvoll. Sollte das Problem der immunologischen Unverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger gelöst werden können und sollten außerdem genügend Stammzellen zur Verfügung stehen, wäre die Verwendung allogener Zellen eine viel versprechende Option für die Therapie einer Reihe von Krankheiten.

Autologe Stammzellen. Autologe adulte Stammzellen würden es erlauben, das Problem der immunologischen Unverträglichkeit zu umgehen. Allerdings ist fraglich, ob und wie viele adulte Stammzellen man einem kranken Körper entnehmen kann. Es ist auch ungewiss, wie viele adulte Stammzellen eines bestimmten Typs ein alternder Mensch besitzt,

von einem alternden kranken Menschen ganz abgesehen. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass man bei Vorliegen einer genetischen Erkrankung eben auch die Zellen des Patienten verwenden müsste, die eine schädliche Mutation tragen. Bei Erkrankungen, die auf dem Mangel eines bestimmten Genprodukts beruhen, ließe sich diese unter Umständen durch Einführen des entsprechenden Gens beheben. Das Einschleusen des Gens kann beispielsweise durch modifizierte harmlose Lentiviren erfolgen, die instande sind, Stammzellen zu infizieren. Eine solche Infektion würde man in der Kulturschale durchführen, bevor man die Stammzellen in den kranken Körper überträgt (Übersicht in [45]). Allerdings gibt es auch eine Vielzahl von genetischen Problemen, bei denen ein solcher Gentransfer nicht helfen würde. So kann ein Krankheitsbild beispielsweise dadurch verursacht werden, dass eine Mutation in einem Gen zu einem defekten Protein führt, das dann die Funktion der Zelle beeinträchtigt. Auch ist es momentan nicht möglich, nach dem Gentransfer die Menge des in der Zelle gebildeten Proteins genau einzustellen oder gar zu regulieren. Aber gerade dieses ist im physiologischen Kontext oft essenziell. Es würde den Körper auf Dauer schädigen, wenn beispielsweise die genetisch modifizierten Zellen ständig Insulin ausschütteten.

Der einzige Ausweg läge in solchen Fällen darin, den genetischen Defekt in den Stammzellen vor der Transplantation durch eine sog. homologe Rekombination zu korrigieren, d. h. die mutierten Gensequenzen gezielt gegen normale DNA-Sequenzen auszutauschen. Damit bliebe die korrekte Regulation des Gens gewahrt. Dieses Verfahren ist aber in adulten Stammzellen momentan nicht umsetzbar. Dagegen ist für ESZ-Linien – zumindest für ESZ der Maus – die Methodik der homologen Rekombination etabliert und in ihnen recht effizient. Beim Menschen liegen ESZ nur bis zum 7. Tag seiner Entwicklung vor. Entsprechend könnten bei ihm körpereigene, individuelle ESZ-Linien (autologe ESZ), in denen dann evtl. auch noch eine homologe Rekombination durchgeführt werden kann, nicht gewonnen werden. Autologe menschliche ESZ ließen sich nur durch

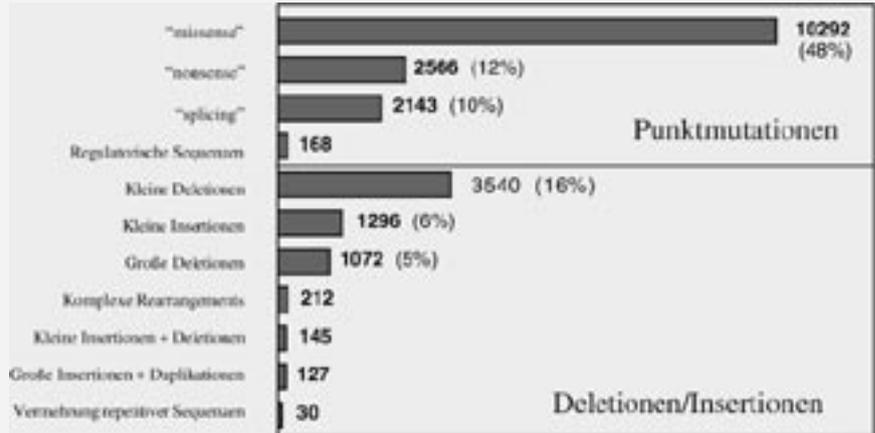


Abb.5 ▲ Krankheits erzeugende Mutationen im Genom des Menschen. Spektrum der verschiedenen Mutationen, aufgeteilt nach Art und Häufigkeit. Zum Zeitpunkt der Analyse waren insgesamt 21.591 Mutationen in 1.039 Genen bekannt. (Nach [56])

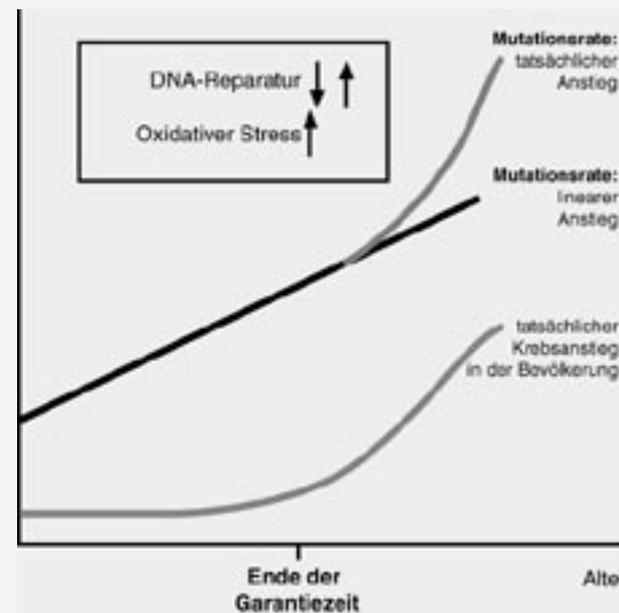


Abb.6 ◀ Abhängigkeit von Mutationsrate und Krebs mit zunehmendem Alter. Wenn mehrere Mutationen stattgefunden haben, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Krebserkrankungen. (Nach [27])

das Verfahren des sog. therapeutischen Klonens erzeugen, das im Folgenden erläutert wird.

Methodik

Folgende Vorgehensweisen wären prinzipiell denkbar, um körpereigene, individuelle ESZ-äquivalente Zellen/Zelllinien abzuleiten. Bei jeder Vorgehensweise würde man als Ausgangsmaterial den diploiden Zellkern differenzierter Körperzellen (somatische Zellen) des Patienten oder die vollständigen Zellen verwenden und versuchen, ESZ-Linien oder ESZ-ähnliche Zellen/Zelllinien herzustellen. Un-

terschiedlich wären in erster Linie die gewählten Wege, um das Potenzial des Zellkerns wieder zu seiner vollen Entfaltung zu bringen. Das Vorgehen, das in einer Reihe von Tierversuchen bereits erfolgreich durchgeführt wurde, ist der Transfer des Kerns somatischer Zellen (KTSZ) in entkernte Oozyten (Eizellen, [Abb. 3]) und ihre anschließende Weiterentwicklung in der Kultur zu Blastozysten.

So ist es bei der Maus bereits gelungen, nach einem solchen KTSZ aus den resultierenden Blastozysten ESZ-Linien abzuleiten [46, 47]. Uns gelang es dann zu zeigen, weshalb solche Experimente erfolgreich sind, obwohl die Blastozys-

Tabelle 1

Übersicht endogener DNA-Läsionen in menschlichen Zellen und der möglichen Entstehungsarten von Punktmutationen. Näheres in [58]

Läsionen/Prämutationen	Art der Läsions- bzw. Mutationsbildung	Zahl der Modifikationen bzw. Prämutationen pro Zellen und Tag	Zahl der Modifikationen bzw. Prämutationen, die in normalen Zellen bleiben
Uracil	Desaminierung von Cytosin	400	1
Thymin	Desaminierung von 5-Methylcytosin	30	10–20
Hypoxanthin	Desaminierung von Adenin	10	1
8-Oxoguanin	Oxidation von Guanin	1.000	1
Formamido-Pyrimidin	Oxidation von Guanin	200	5
Thyminglykol und ähnliche oxid. Pyrimidine	Oxidation von Pyrimidinen	500	5
Ethyl-Cytosin	Lipid-Peroxidation von Cytosin	200	5
Ethyl-Adenin	Lipid-Peroxidation von Adenin	200	5
3-Methyl-Adenin	SAM-Methylierung von Adenin	600	5
7-Methyl-Guanin	SAM-Methylierung von Guanin	4.000	3.000
O ⁶ -Methyl-Guanin	Durch endogene Nitrosamine	200	1
Ohne Base	Hydrolyse	9.000	5

ten in den meisten Fällen nicht lebensfähig sind [48]. Von Bedeutung ist hier das Proteinprodukt des sog. *Oct4*-Gens, das für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ESZ essenziell ist [49, 50]. Offensichtlich wird in pluripotenten ESZ nur eine bestimmte Menge an Oct4 gebildet (■ Abb. 4). Eine Abweichung um $\pm 50\%$ hat dramatische Folgen, da sich dann die ESZ differenzieren und ihre Pluripotenz verlieren [51, 52, 53].

Aus Gründen, die mit der Genomqualität somatischer Zellen (aus denen der Zellkern entnommen wird) zu tun haben, wäre es wichtig, mehrere ESZ-Linien durch Kerntransfer zu erzeugen, um zu entscheiden, welche sich am besten für die spätere Nutzung eignen. Aufgrund der mangelnden DNA-Qualität somatischer Zellen und der unterschiedlichen Verpackung der DNA durch Proteine des Chromatins ist es nämlich nicht möglich, die Qualität der erzeugten Zelllinie vorherzusagen. Ein großer Vorteil von Zelllinien, die durch Kerntransfer erzeugt werden, läge darin, dass sie in Kultur eingehend untersucht und nach ihrer Eignung (z. B. einen bestimmten Zelltyp bilden zu können) selektiert werden könnten, bevor man sie zur Stammzelltherapie einsetzt. Ein weiterer Vorteil wäre, dass man diese Untersuchungen nur mit einem Teil der Zellen einer sol-

chen Linie durchführen müsste. Der andere Teil ließe sich in flüssigem Stickstoff konservieren. Erwies sich eine Linie später als geeignet, könnte man auf das eingefrorene Material zurückgreifen. Durch diese Vorgehensweise ließe sich beispielsweise verhindern, dass sich in einer etablierten Zelllinie durch eine lange Kultivierung Mutationen anhäufen.

Das herkömmliche, in Tierversuchen eingesetzte Kerntransferverfahren erfordert die Verwendung von natürlichen Oozyten. Ihre Gewinnung ist äußerst aufwändig, und beim Menschen wäre es mit einer unangenehmen Prozedur verbunden. Es scheint nun aber möglich, in der Kultur Oozyten aus ESZ zu erzeugen. Bei der Maus ist es uns kürzlich bereits gelungen [54]. Mithilfe solcher Oozyten wird man vielleicht in der Lage sein, nach Kerntransfer ESZ-Linien zu generieren.

Umprogrammierung

Um auf dem eben skizzierten Weg ESZ-Linien erzeugen zu können, wäre es nötig, den in die Oozyte übertragenen Kern einer ausgereiften Körperzelle umzuprogrammieren, d. h. sein genetisches Programm auf einen frühen Startpunkt in der Embryonalentwicklung zurückstellen. Da man aber die resultierenden ESZ-Linien nur für die Therapie benötigen

würde, müsste man hier nicht gänzlich an den Anfang zurückkehren. Statt einer Oozyte könnte man evtl. auch embryonale Stammzellen ohne Kern (Zytoplasten) verwenden, um einen somatischen Kern zu einem embryonalen Stammzellkern umzuprogrammieren. Experimente, in denen eine somatische und embryonale Stammzelle der Maus fusioniert wurden, haben bereits gezeigt, dass ESZ in der Lage sind, den zusätzlichen Kern so zu verändern, dass er Merkmale von natürlichen ESZ-Kernen besitzt. Eine wichtige Aufgabe wird es sein, die zellulären Faktoren zu bestimmen, die für die Umprogrammierung des somatischen Kerns verantwortlich sind. Vielleicht lässt sich dann ein Verfahren zur Herstellung körpereigener, individueller ESZ-Linien ohne Einsatz von Oozyten und embryonalen Zellen entwickeln.

Reproduktives Klonen

Der Kerntransfer zur Erzeugung von lebensfähigen Organismen wird als reproduktives Klonen bezeichnet. Gegen ein reproduktives Klonen stehen nicht nur ethische Bedenken, sondern auch zahlreiche biologische Gründe. Momentan liegt die Klonierungseffizienz, also der Prozentsatz der Organismen, die nach einem Kerntransfer in Oozyten lebend geboren

werden, bei einigen Tierarten bei etwa 3–5%, bei den meisten deutlich darunter. Es ist sicherlich mit Verbesserungen zu rechnen, doch auch dann dürfte es unmöglich sein, den Tod von Embryonen und Föten zu vermeiden oder einzuschätzen, ob der transferierte Kern genetische Defekte trägt oder nicht. Ob das berühmte „Klonschaf“ Dolly aufgrund eines genetischen Defekts unter Arthritis litt, ist nicht geklärt, genauso wenig, in welchem Stadium und woran die 276 „Fehlversuche“, die Dollys Geburt vorangingen, gestorben sind [55]. Da sich die meisten Protagonisten des reproduktiven Klonens dieser Probleme nicht bewusst sind oder diese nicht als tatsächliche Probleme ansehen, wird es wohl notwendig sein, durch weitere Tierversuche deutlich zu machen, dass man durch Klonen lebensfähige Organismen nur auf rein statistischer Basis und ohne Vorhersagbarkeit generieren kann. Es gibt eine Vielzahl von Gründen, weshalb Kerne von Körperzellen ungeeignet sind, um Organismen zu klonen, die frei von bedrohlichen Mutationen sind. Einige der Gründe sollen im Folgenden dargestellt werden.

Probleme des Klonens

Das entwicklungsbiologische Programm wird sowohl durch genetische, als auch durch epigenetische Faktoren kontrolliert. Unter genetischer Kontrolle versteht man die Gesamtheit der unmittelbar durch Gene (bzw. durch die von ihnen kodierten Proteine) bestimmten Abläufe. Sie kann nur funktionieren, wenn die DNA-Sequenz des Genoms intakt ist. Die epigenetische Kontrolle umfasst alle Wechselwirkungen zwischen Zellbestandteilen oder zwischen Zellen, die die Entwicklung mitbestimmen, die aber nur mittelbar genetisch vorgegeben sind. Epigenetisch wirksam sind insbesondere Modifikationen und Verpackungen des Genoms (äußerlich erkennbar am Chromatin, den färbbaren Bestandteilen im Kern, bestehend aus der DNA, Histonen und Nicht-Histonproteinen). Die epigenetische Kontrolle greift nur, wenn das Chromatin keine zu großen Mängel aufweist. Sind Modifikation oder Verpackung des Genoms gestört, können sich Tumore bilden.

Genetische Probleme

Wie jeder langlebige, vielzellige Organismus unterliegt auch der menschliche Körper mutagenen äußeren Faktoren, deren Wirkungen sich im Laufe des Lebens addieren: Hierzu zählen z. B. UV- und ionisierende Hintergrundstrahlung, chemische Mutagene wie Aflatoxin, Benzen und N-Nitrosamine sowie auch die Infektion mit Krebs erzeugenden Viren. Neben diesen äußeren Gefahren gibt es eine Vielzahl von Gefahren, die dem Organismus selbst innewohnen: Mit jeder Zellteilung wird die DNA geschädigt, was Ausgangspunkt für einen Tumor sein kann, falls die Mutationen nicht repariert werden. Im Mai 2000 waren 21.591 Mutationen in mehr als 1.000 Genen des Menschen bekannt, die für die unterschiedlichsten Probleme verantwortlich sind (■ Abb. 5) [56]. Man nimmt an, dass sich in menschlichen Zellen täglich eine Vielzahl von DNA-Prämutationen bildet. Von Prämutationen spricht man, wenn eine Chance besteht, dass die Veränderungen korrigiert werden. Da aber die DNA-Reparatur nicht perfekt arbeitet, dürften einige Prämutationen die Quelle für spontan auftretende Mutationen sein. Sowohl das gelegentliche Auftreten nicht reparierter geschädigter Nucleotide als auch das fehlerhafte Ablesen während der Replikation können zu Tumoren und anderen Krankheiten führen. Veränderungen des Genoms finden sich schon früh, d. h. bereits während der Embryonalentwicklung. So konnte man z. B. durch hochempfindliche Methoden bereits im Blut von gesunden Neugeborenen einen Austausch von Chromosomenstücken nachweisen, die Tumore induzieren können [57]. Prämutationen werden durch präzise und hocheffiziente Reparatursysteme weitgehend rückgängig gemacht. Es besteht daher eine recht hohe Wahrscheinlichkeit, dass man bis zum 45. Lebensjahr keine Tumore entwickelt [27]. Danach ist gleichsam das Ende der Garantiezeit erreicht („End of Warranty“), und sowohl die Mutationshäufigkeit als auch die Wahrscheinlichkeit, Tumore auszuprägen, steigen rasant an (■ Abb. 6).

Die schädlichen Folgen von Mutationen finden in den Diskussionen mit

Stammzell- und Klonierungsexperten nahezu keine Berücksichtigung. Dies ist völlig unverständlich, denn man muss über die unterschiedlichen Mutationsarten Bescheid wissen um zu erkennen, welchen Gefahren klonierte Organismen ausgesetzt wären. Folgende Mutationen bzw. Vorgänge spielen in diesem Zusammenhang eine Rolle:

Veränderungen durch Punktmutationen.

DNA-Punktmutationen lassen sich im Wesentlichen auf 3 Hauptursachen zurückführen: auf labile N-Glykosyl-Bindungen, auf eine Desaminierung methylierter DNA und auf oxidativen Stress (Übersicht in [58]). Ferner können Mutationen durch Rekombination sich wiederholender genomischer Segmente entstehen. Transitionen von Cytosin (C) nach Thymin (T) verursachen etwa ein Drittel aller Punktmutationen, die bei genetisch vererbten menschlichen Erkrankungen zu finden sind [59]. Diese recht komplexen Probleme werden in Übersicht 2 und ■ Tabelle 1 beschrieben.

Transkriptionsgekoppelte DNA-Reparatur.

Das Enzym RNA-Polymerase II schreibt DNA in mRNAs um (Transkription), die letztlich in Proteine übersetzt werden (Translation). Bereits vor mehr als 15 Jahren wurde festgestellt, dass transkribierte, also aktive Gene weitaus schneller repariert werden als inaktive Gene [60]. Daraus ergibt sich, dass Mutationen in inaktiven Genen häufiger auftreten als in aktiven Genen, was kein Problem ist, wenn Erstere für den Rest des Lebens inaktiv bleiben. So stört es nicht, wenn beispielsweise Gene, die nur in Gehirnzellen exprimiert werden, in Muskelzellen mutiert sind. Dort werden sie nicht benötigt und bleiben ausgeschaltet, weshalb sie auch keinen Schaden verursachen können.

Mutationen durch Rekombination repetitiver genomischer Segmente.

Monogene Erkrankungen beruhen zumeist auf spezifischen Mutationen innerhalb eines definierten Gens. Solche Mutationen lassen sich oft auf Fehler während der DNA-Replikation zurückführen. Darüber hinaus gibt es Erkrankungen, die durch Rekombinationen genomischer Regionen verursacht werden. Ausgangspunkt sind zu-

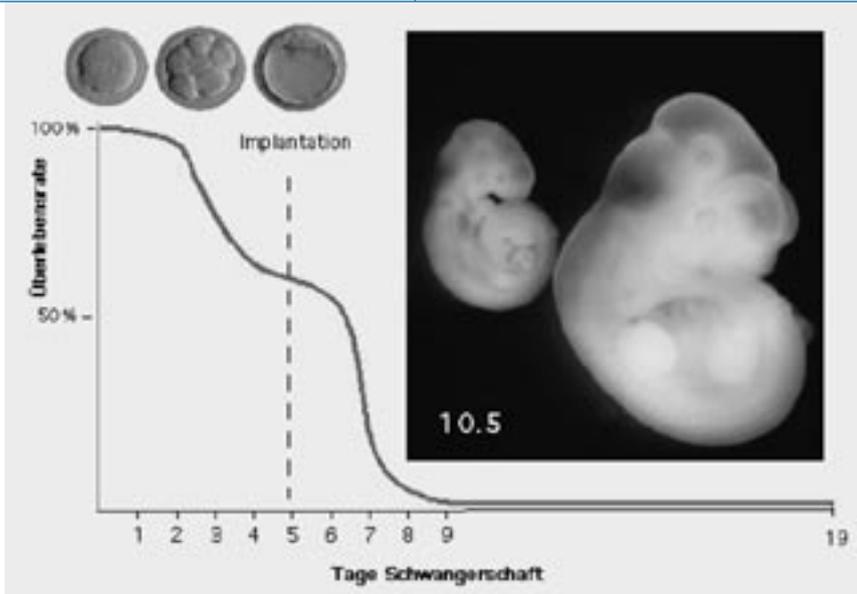


Abb. 7 ▲ Reproduktive Klonierung bei Mäusen. Überlebensrate von Embryonen und Föten während der Schwangerschaft. Kurz nach der Implantation haben nur noch wenige Embryonen die Fähigkeit, sich weiterzuentwickeln. Selbst 10 Tage nach der Befruchtung, wenn die meisten Föten schon abgestorben sind, zeigen sich an den wenigen Überlebenden schwerwiegende Probleme. Das große Bild zeigt zwei 10,5 Tage alte Föten, der linke ist durch Klonen, der rechte durch eine normale Befruchtung entstanden

nächst Genduplikationen – hierdurch entstehen repetitive genomische Sequenzen (RGS). Die Wiederholungen des ursprünglichen genomischen Bereichs werden als paraloge genomische Bereiche bezeichnet – sie bilden die RGS. Zwischen den RGS eines oder mehrerer Chromosomen kann es nun zu einem Austausch von Bruchstücken kommen. RGS sind üblicherweise 10.000–400.000 Basenpaare lang, wobei mindestens 97% der Sequenzen identisch sind und somit ein geeignetes Substrat für eine homologe Rekombination darstellen.

Mutationen infolge von Alterung. Es gibt verschiedene Theorien über den Alterungsprozess, die sich aber gegenseitig nicht ausschließen [61]. Eine seit langem diskutierte Theorie besagt, dass mit zunehmendem Alter die DNA-Reparaturaktivität abnimmt und damit die DNA-Schädigung zunimmt [62]. Substanzen, die DNA schädigen – wie z. B. Strahlen und Chemotherapien – können Prozesse induzieren, die dem natürlichen Altern ähneln. Beispiele dafür sind reduzierte Wundheilung, frühe Wechseljahre, Haarausfall und vorzeitige Vergreisung. Oft sind Gene betroffen, deren Proteinprodukte DNA-Schädigungen erkennen und/oder an DNA-Reparaturen beteiligt sind. Ferner wird ein Zusammenhang zwischen der Verkürzung der Chromoso-

men-Enden (Telomere) und dem Altern der Zellen gesehen. Da die Telomere bei jeder Zellteilung kürzer werden, spricht man in diesem Zusammenhang geradezu von einer Lebensuhr. Eine dritte Theorie stellt einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Metabolismus und Altern her. Hierzu liegen zahlreiche an Tiermodellen gewonnene Daten vor: Mutationen, die z. B. den Glukose-Metabolismus reduzieren, verlängern die Lebensdauer vieler Tierarten. Man vermutet, dass ein verringerter Stoffwechsel zu einem geringeren Anteil toxisch wirkender Formen des Sauerstoffs führt. Bei allen 3 Prozessen dürfte das Protein p53 eine Schlüsselrolle spielen. Es scheint einerseits entstehende Tumore zu unterdrücken, andererseits die Reparatur und Regeneration normaler Zellen zu beschränken [62]. Mäusen, denen eine überaktive p53-Variante in die Keimbahn eingeführt wurde, waren immun gegen Krebs, alterten aber schneller. Sie verhielten sich in dieser Hinsicht wie Tiere, die Defekte in der DNA-Reparatur aufwiesen oder nur noch kurze Telomere hatten. Insgesamt scheint p53 die Entwicklung neuer Tumore zu verringern, was auf Kosten der Reparatur und Regeneration des normalen Gewebes geht.

Die oben dargelegten Vorgänge könnten für einen geklonten Organismus, d. h. für einen Organismus, der durch Übertra-

gung eines Zellkernes aus einer Körperzelle in eine Oozyte erzeugt würde, ausgeprägte Folgen haben. Das Klonen hebt z. B. den inaktiven Zustand der zellspezifischen Gene auf. Wenn also beispielsweise aus dem Kern einer Muskelzelle ein Organismus generiert werden sollte, müssten in diesem Kern zahlreiche inaktivierte Gene (z. B. Gene, die für die Entwicklung spezifischer Zellen des Gehirns erforderlich sind) wieder aktiviert werden. Weisen diese Gene Mutationen auf, so könnte das zu Komplikationen in den sich bildenden Geweben und Organen (z. B. Gehirnzellen) führen. Solche Gene können fehlerhafte Proteine bilden, in den falschen Zellen exprimiert oder in unphysiologischen Mengen abgelesen werden. Da der menschliche Körper mehr als 200 verschiedene Zelltypen besitzt, kann man sich leicht ausmalen, was passieren würde, wenn alle stummen Gene einer Muskelzelle in der Gesamtheit eines Körpers wieder aktiv werden. Vorliegende Mutationen müssten nicht unbedingt sofort Probleme bereiten. In menschlichen Zellen werden z. B. 4–6 Mutationen benötigt, um eine frühe Tumorzelle (neoplastische Zelle) zu erzeugen [63]. Da nach dem reproduktiven Klonen jede Zelle des Körpers dieselben Mutationen tragen würde, fangen alle Zellen gleichsam bei einem diesbezüglich höheren Grundzustand an. Es ist nicht vorhersehbar, ob noch 4, 3, 2 Mutationen oder nur noch eine weitere Mutation benötigt würde, um das „Fass zum Überlaufen“ zu bringen und eine neoplastische Zelle zu bilden. Ein Klon, der durch den Transfer des Kerns aus einer adulten somatischen Zelle entstünde, würde zudem in seinen eigenen Körperzellen von Beginn an verkürzte Telomere tragen. Das könnte die Lebenszeit seiner Zellen bzw. die Lebenszeit des gesamten Organismus verkürzen. Allerdings ist nicht geklärt, ob diese Annahme tatsächlich zutrifft.

Trotz der beschriebenen Risiken für das Genom von Körperzellen sind Mutationen kein Problem für Zellen der Keimbahn. Offensichtlich verfügen diese über besondere Mechanismen, die sie in die Lage versetzen, über viele Jahre Spermien oder Oozyten hoher Genomqualität zu generieren. Mögliche Gründe hierfür sollen an dieser Stelle nicht erörtert wer-

den, denn selbst Zellen hoher Genomqualität sind zum Klonen gänzlich ungeeignet, weil es gravierende epigenetische Probleme gibt, die im Folgenden dargestellt werden.

Epigenetische Probleme

Keimzellen und Imprinting. Die Keimbahn verbindet die Individuen einer Spezies und ist daher potenziell unsterblich. In jeder Generation werden Oozyten und Spermien gebildet, deren Vereinigung der Ausgangspunkt für einen neuen Organismus ist. In einigen Vertebraten ist die Oozyte auch ohne Spermium in der Lage, einen Organismus zu bilden. So wurden parthenogenetische (durch „Jungferzeugung“) entstandene Reptilien, Vögel, Fische und Amphibien beschrieben. Diese bilden sich aus unbefruchteten Oozyten, sodass nur das weibliche Genom zu ihrer Entwicklung beiträgt. Auch bei Säugern (u. a. Maus, Kaninchen, Schwein) können sich Embryonen gelegentlich auf parthenogenetischem Weg bilden, die aber während der Embryonalentwicklung sterben. Experimentell ließen sich bei Säugern Embryonen erzeugen, die rein männlichen (androgenotischen) oder rein weiblichen (gynogenotischen) Ursprungs sind. Hierzu brachte man durch Transplantation entweder 2 weibliche (maternale) oder 2 männliche (paternale) Vorkerne in einer zuvor entkernten Oozyte zusammen. Die Embryonalentwicklung wird dann nur von der Erbinformation eines Geschlechtes gesteuert. In allen 3 Fällen sterben die Embryonen, weil das weibliche und das männliche Genom zwar dieselben Gene besitzen, die Funktion einiger Gene aber je nach ihrer Herkunft (männlich oder weiblich) unterschiedlich ist.

Wenn die Funktion eines Gens allein vom Geschlecht abhängt, so muss dies eine epigenetische Ursache haben, die man als genomische Markierung oder Imprinting bezeichnet [57]. Vermutlich bewirkt das Imprinting, dass bestimmte Gene nur vom mütterlichen, andere nur vom väterlichen Genom abgelesen, d. h. exprimiert werden. Das Imprinting beruht auf einer unterschiedlichen Methylierung der maternalen und paternalen Gene. Bei der Verschmelzung von Eizelle

Übersicht 2

Von der Prämutation zur Punktmutation

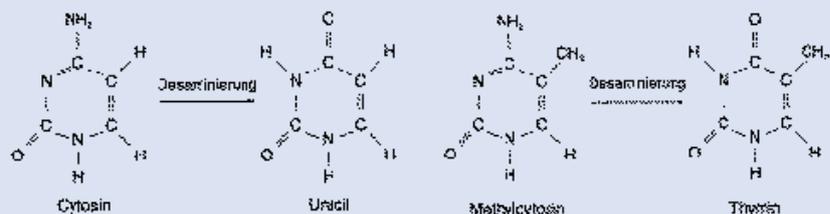
Prämutationen. Von Prämutationen spricht man, wenn eine Chance besteht, dass die Veränderungen repariert werden, bevor sie sich als Mutationen manifestieren (vgl. Tab. 1). Spontan auftretende Mutationen dürften zu einem großen Teil auf einer fehlerhaften DNA-Reparatur zurückzuführen sein. Zusammen mit fehlerhaftem Ablesen während der Replikation können sie entscheidend zu Ausbildung von Tumoren führen.

Schädigungsquellen und Reparaturmöglichkeiten

Labile N-Glykosyl-Bindung. Alle biologischen Makromoleküle sind instabil und zerfallen mit der Zeit. Nucleinsäuren (DNA und RNA) zerfallen in Lösung, wobei RNA besonders instabil ist. Durch die Gegenwart einer Hydroxylgruppe in der 2'-Position von Ribose ist deren Phosphodiesterbindung besonders empfindlich gegenüber Hydrolyse. Die Phosphodiesterbindungen von DNA sind zwar weitaus stabiler, allerdings geht dies auf Kosten der Stabilität der N-Glykosylbindungen, durch die Zucker (Desoxyribose) und Basen verbunden sind. In metabolisch aktiven Zellen liegt die DNA in vollständig hydratisierter Form vor, und man nimmt an, dass sie ähnlich schnell Basen verliert wie in Lösung. In der Zelle werden die basenfreien Stellen der DNA durch eine Reihe von Enzymen repariert, was sehr effizient geschieht.

Desaminierung methylierter DNA. Die hydrolytische Umwandlung von Cytosin in Uracil bei neutralem pH wird durch direkte Desaminierung durch Hydrolyse verursacht. 5-Methylcytosin verliert die Aminogruppe etwa 3- bis 4-mal schneller als Cytosin (C), sodass die Desaminierung von 5-Methylcytosin eine wichtige Mutationsquelle darstellt. Cytosin ist, wenn es im DNA-Strang in Nachbarschaft von Guanin steht (sog. CG-Dinucleotid), bei Säugetieren häufig methyliert. Diese Methylierung hat insbesondere einen Einfluss auf die Aktivität von Genen (in transkriptionsaktiven Genen ist die Methylierung geringer als in inaktiven). Das Problem liegt weniger im Verlust der Aminogruppe als in der Reparatur. Wird Cytosin in Zellen desaminiert, entsteht Uracil (U), das durch die Uracil-DNA-Glykosylase entfernt wird, woraufhin die basenfreie Stelle effizient korrigiert wird. Diese Glykosylase ist hingegen nicht in der Lage, desaminiertes 5-Methylcytosin (also Thymin, T) als Substrat zu verwenden. Es kommt hinzu, dass fehlerhafte Guanin-Thymin (G-T)-Basenpaarungen bei Säugern durch sehr langsame Korrekturenzyme repariert werden. Sowohl die erhöhte Rate von Desaminierungen von 5-Methylcytosin als auch die relativ langsame Reparatur fehlerhafter G-T-Basenpaarungen haben zur Folge, dass CG-Sequenzen eine etwa 40fach höhere Mutationsrate aufweisen als Sequenzen aus anderen Dinucleotiden. Hierauf dürfte zurückzuführen sein, dass Transitionen von C nach T für etwa ein Drittel aller Punktmutationen verantwortlich sind, die zu genetisch vererbten menschlichen Erkrankungen führen. Die Mutationshäufigkeit des CG-Dinucleotids nach TG hängt von dem jeweiligen Gen ab. Vergleicht man Gene des Menschen miteinander, sind beispielsweise in β -Globin- und HPRT-Genen weniger als 10% der CG-Dinucleotide mutiert, im ADA-Gen sind es hingegen 50% [62].

Oxidativer Stress. Aerob wachsende Zellen sind während des normalen Metabolismus aktivem Sauerstoff ausgesetzt, der eine wichtige Ursache endogener Schädigungen sein kann. Eine Basenschädigung, die zu einer Mutation führen kann, ist 8-Hydroxylguanin. Hydroxylguanin wird hauptsächlich durch Hydroxylradikale erzeugt und bewirkt, dass es an dieser Stelle zur Paarung mit Adenin statt mit Cytosin kommt. Diese Reaktion führt während der Replikation zu Mutationen, falls diese Schädigung nicht rechtzeitig durch eine DNA-Glykosylase abgespalten wird. Es gibt noch eine Reihe von möglichen Ursachen für Mutationen, deren Ablauf man aber im Detail noch gar nicht untersucht hat. Ein Beispiel für eine solche endogene Schädigungsmöglichkeit ist die Bildung von H_2O_2 durch stimulierte polymorphonucleäre Leukozyten und Monozyten. Auch Tumore können erhebliche Mengen an H_2O_2 bilden. Dieses sehr wirksame Oxidationsmittel kann trotz endogener Katalase die DNA schädigen.



und Spermium werden die geschlechtsspezifischen Methylierungsmuster vereint und später von Zellteilung zu Zellteilung weitergegeben.

Für das reproduktive Klonen hätte das Imprinting erhebliche Relevanz: Würde man nämlich zum Klonen Zellkerne von Keimzellen oder deren Vorläufern einsetzen, so würde der resultierende Embryo nur das Markierungsmuster des mütterlichen oder väterlichen Genoms tragen. Die ganz frühen Keimzellen, die Urkeimzellen, die während der Entwicklung eines Organismus entstehen, haben zwar zunächst wie alle anderen Zellen auch eine maternale und eine paternale Markierung. Während sie sich entwickeln, setzen sie diese aber neu, d. h., die alte wird entfernt und je nach Geschlecht gegen die mütterliche oder väterliche ersetzt. Das hat zur Folge, dass Embryonen, die man aus Keimzellen zu klonen versucht, aus ähnlichen Gründen sterben, wie die oben erwähnten androgenetischen, gynogenetischen oder parthenogenetischen Embryonen von Säugetieren [7].

Ein weiteres Problem ergäbe sich daraus, dass die Weitergabe der Markierung in den Keimzellen und im Körper oft nicht sehr präzise erfolgt. Das ist – wie bei den bereits diskutierten „schlafenden Mutationen“ – meist unerheblich, weil im Organismus die epigenetische Markierung in den meisten Zellen keine Rolle spielt. Würde jedoch ein Zellkern zum reproduktiven Klonen eingesetzt, kann ein fehlerhaftes Ablesen während der früheren Entwicklung sehr problematisch werden.

Reprogrammierung. Neben der Methylierung muss auch noch die Verpackung des Genoms verändert werden, wenn das Klonen mittels somatischer Zellkerne erfolgreich sein soll. Viele Gene, die in den jeweiligen Körperzellen aktiv waren, müssen abgeschaltet werden, andere, die inaktiv waren, wieder angeschaltet werden, damit sich ein Embryo entwickeln kann. Die epigenetische Reprogrammierung während der normalen Entwicklung und während des Klonprozesses zählen zurzeit zu den interessantesten Themen der molekularen Biologie [64]. Allerdings ist noch unbekannt, wie die alten Proteine und Modifikationen durch neue ersetzt werden.

Auf jeden Fall ist zu vermuten, dass auch aufgrund dieses epigenetischen Phänomens das bereits oben gesagte für einen klonierten Organismus gelten würde: Eine fehlerhafte Verpackung des Genoms und eine daraus resultierende fehlerhafte Aktivierung bzw. Inaktivierung von Genen hätte tief greifende, aber unvorhersehbare Folgen. Zusammengefasst ist es sehr wahrscheinlich, dass durch Kerntransfer erzeugte Organismen aufgrund der dargelegten genetischen und epigenetischen Probleme Schäden aufweisen dürften, die evtl. bereits während der Embryonalentwicklung oder aber erst später, d. h. zum Teil sicherlich erst beim adulten Organismus, sichtbar werden dürften.

Adulte Stammzellkerne und Klonen

Wären evtl. Kerne von adulten Stammzellen geeigneter als Kerne differenzierter, ausgereifter Körperzellen, um Organismen zu klonieren? Auch wenn für Ersteres noch nicht dieselbe Fülle an Informationen vorliegt wie für differenzierte somatische Zellen, gibt es keinen Grund anzunehmen, dass hier nicht die gleichen genetischen und epigenetischen Probleme auftreten könnten. Tatsächlich mehrten sich z. B. die Hinweise, dass auch adulte Stammzellen einem Alterungsprozess unterliegen [26].

Selbst die Kerne embryonaler Stammzellen würden sich nicht zum Klonen von Organismen eignen. Obwohl sie ein sehr frühes Entwicklungsstadium repräsentieren und ihr epigenetisches Programm daher dem Programm der befruchteten Eizelle sehr ähnlich sein sollte, zeigen Experimente mit geklonten Mäusen, dass viele Gene in den Organen der Tiere falsch abgelesen werden. Gleichgültig, ob der Kern einer Körperzelle oder einer ESZ zum Klonen verwendet wird, es wird in beiden Fällen etwa jedes 25. Gen falsch exprimiert [65]. Diese Zahl ist sehr aussagekräftig, weil in der zitierten Studie mehr als 10.000 Gene gleichzeitig untersucht wurden. Das bedeutet, dass in jedem Organ eines Klons Hunderte von Genen falsch exprimiert werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass am Anfang der Embryonalentwicklung wichtige regulatorische Schlüsselgene, wie z. B. das

Oct4-Gen, nicht korrekt abgelesen werden konnten [48].

In Abhängigkeit von den betroffenen Genen sterben die Klone entweder als Embryonen oder Föten. In seltenen Fällen (eben bei den 3–5% Überlebenden) werden die Probleme während der Entwicklung von Zelle zu Zelle weitergegeben (Abb. 7). Dass solche, anfangs nicht offensichtlichen Änderungen dramatische Spätfolgen haben können, zeigen die fettleibigen Mäuse, die oft durch den Prozess des Klonens entstehen [66]. Bis etwa zur 10. Woche nach der Geburt haben solche Mausklone ein normales Körpergewicht, danach erhöht es sich jedoch drastisch. Die Verpaarung zweier fettleibiger Mäuse führte zu einem interessanten Ergebnis: Obwohl die Eltern sehr schwer waren, waren die Nachkommen nicht etwa noch fettleibiger, sondern so schlank wie normale Mäuse. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Neuverpackung des Genoms während des Klonens fehlerhaft gewesen ist. Erst wenn diese wieder modifiziert wird, kann das normale Entwicklungsprogramm ablaufen. Dazu mussten die Gene, deren fehlerhaftes Ablesen zur Fettleibigkeit führte, wieder richtig verpackt werden. Dies geschah während der Gametogenese, also während der Bildung von Spermien und Eizellen. Im genannten Beispiel war es also erst in der folgenden Generation möglich, alle Gene wieder richtig abzulesen und ein normales Körpergewicht zu entwickeln. Allerdings bleibt noch abzuwarten, ob die fettleibigen Mäuse oder die Tiere der nächsten Generation nicht später im Leben Tumore oder andere Probleme entwickeln.

Die Ergebnisse der oben dargelegten Tierversuche machen deutlich, dass die beim reproduktiven Klonen zu erwartenden Probleme weder vorhersagbar, noch unbedingt sofort sichtbar wären. Ob jedes zehnte, fünfundzwanzigste oder hundertste Gen falsch abgelesen würde, ist dabei noch nicht einmal wichtig. Bei 66.000 Genen, die man im menschlichen Genom vermutet, wären das in jedem Fall sehr viele betroffene Gene. Wie groß die daraus resultierenden Probleme sein werden, werden zukünftige tierexperimentelle Untersuchungen deutlich machen.

Nach einem Vortrag auf der 122. Versammlung der Gesellschaft Deutscher

Naturforscher und Ärzte (GDNÄ) in Halle. Er wurde im Versammlungsband „An den Fronten der Forschung – Kosmos-Erde-Leben“ (S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig 2003) und in der Naturwissenschaftlichen Rundschau 56:525 (2003) publiziert.

Danksagung

Meinem Mitarbeiter Dr. Michele Bolani möchte ich für die Fotografien danken.

Korrespondierender Autor

Prof. Dr. H. R. Schöler

Max Planck Institut für molekulare Biomedizin, Zell- und Entwicklungsbiologie
Mendelstraße 7, 48149 Münster

Literatur

- Kirschstein R, Skirboll LR (2001) Stem cells: scientific progress and future directions. National Institute of Health, NIH, Bethesda
- Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213–222
- Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427–1430
- Aboody KS et al. (2000) Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12846–12851
- Noble M (2000) Can neural stem cells be used to track down and destroy migratory brain tumor cells while also providing a means of repairing tumor-associated damage? *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12393–12395
- Noble M (2000) Can neural stem cells be used as therapeutic vehicles in the treatment of brain tumors? *Nat Med* 6:369–370
- Boiani M, Schöler HR (2002) Determinants of pluripotency in mammals. In: Lanza R, Cibelli J, West M (eds) *Principles of cloning*. Academic Press, San Diego
- Mezey E et al. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neural antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779–1782
- Bjornson CR et al. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534–537
- Clarke DL et al. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660–1663
- Lagasse E et al. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6:1229–1234
- Taniguchi H et al. (1996) Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat Med* 2:198–203
- Theise ND et al. (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32:11–16
- Gussoni E et al. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390–394
- Jackson KA et al. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395–1402
- Krause DS et al. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369–377
- McKinney-Freeman SL et al. (2002) Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1341–1346
- Morshead CM et al. (2002) Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 8:268–273
- Ying QL et al. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545–548
- Terada N et al. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542–545
- Tsai RY, Kittappa R, McKay RD (2002) Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2:707–712
- Holden C, Vogel G (2002) Plasticity: Time for a reappraisal? *Science* 296:2126–2129
- D'Amour KA, Gage FH (2002) Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted? *Nat Med* 8:213–214
- Jiang Y et al. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41–49
- Jiang Y et al. (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896–904
- Geiger H, Van Zant G (2002) The aging of lymphohematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 3:329–333
- Turker MS (2000) Somatic cell mutations: can they provide a link between aging and cancer? *Mech Ageing Dev* 117:1–19
- Negrin RS et al. (2000) Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant* 6:262–271
- Sanchez-Ramos JR (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69:880–893
- Laughlin MJ et al. (2001) Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 344:1815–1822
- Barker JN et al. (2002) Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:257–260
- Whetton AD, Graham GJ (1999) Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 9:233–238
- Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414:98–104
- Wobus AM et al. (2002) Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 185:127–156
- Thomson JA et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147
- Kim JH et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50–56
- McDonald JW et al. (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5:1410–1413
- Lumelsky N et al. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292:1389–1394
- Richards M et al. (2002) Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 20:933–936
- Nichols J, Evans EP, Smith AG (1990) Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110:1341–1348
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19:193–204
- Kunkel TA (1999) The high cost of living. *Trends Genet* 15:93–94
- Kunkel TA, Bebenek K (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69:497–529
- Fandrich F et al. (2002) Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8:171–178
- Woods NB, Ooka A, Karlsson S (2002) Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Leukemia* 16, 563–569
- Wakayama T et al. (2001) Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292:740–743
- Munsie MJ et al. (2000) Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* 10:989–992
- Boiani M et al. (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* 16:1209–1219
- Pesce M, Schöler HR (2000) Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev* 55:452–457
- Pesce M, Schöler HR (2001) Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19:271–276
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372–376
- Yoshimizu T et al. (1999) Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ* 41:675–684
- Yeom YL et al. (1996) Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonic cells. *Development* 122:881–894
- Hübner R et al. (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251–1256
- Wilmot I et al. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810–813
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN (2000) Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 159 [Suppl 3]:173–178
- Mori H et al. (2002) Chromosome translocation and co-vert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8242–8247
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715
- Cooper DN, Youssoufian H (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 78:151–155
- Svejstrup JQ (2002) Transcription repair coupling factor: a very pushy enzyme. *Mol Cell* 9:1151–1152
- Guarente L, Kenyon C (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408:255–262
- Sharpless NE, DePinho RA (2002) P53: good cop/bad cop. *Cell* 110:9–12
- Hahn WC, Weinberg RA (2002) Modeling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2:331–341
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3:662–673
- Humpherys D et al. (2002) Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12889–12894
- Tamashiro KL et al. (2002) Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med* 8:262–267