

Kaum ein Forschungsgebiet ist in einem so raschen Wandel begriffen wie die Biomedizin, von der nahezu allmonatlich Neues vermeldet wird. In ganz besonderer Weise gilt dies für die Forschung an Stammzellen, die im Mittelpunkt aktueller ethischer und politischer Kontroversen steht. Dieses Feld wird also so brisant eingestuft, dass „Stammzellforscher“ unversehens im Rampenlicht stehen. Ein aufgrund originärer Beiträge bekannter Forscher ist Hans Robert Schöler, Professor der Pennsylvania State University, der in diesem Heft berichtet.

Was ist das Besondere der Stammzellen, was lässt Forschungen an ihnen so vielversprechend, aber auch so bedenklich erscheinen?

Stammzellen sind teilungs- und differenzierungsfähige Zellen, die einen vielzelligen tierischen Organismus mit seinen verschiedenen Organen und Zelltypen entstehen lassen und bei einem ausdifferenzierten Lebewesen dem ständigen Verlust von Zellen entgegenwirken. Da zahlreiche Krankheiten wie Diabetes, Parkinson und Alzheimer auf defekte Zellen zurückgehen, richtet sich die Hoffnung darauf, in Zukunft kranke Zellen durch gesunde ersetzen zu können.

Die ethischen Bedenken betreffen nur die Nutzung der während der Individualentwicklung aktiven embryonalen und fötalen Stammzellen. Die Verwendung adulter Stammzellen hingegen wird allgemein akzeptiert. Ein Beispiel hierfür sind die Blut bildenden Zellen des Knochenmarks, die seit langem zur Therapie von Leukämie genutzt werden. So werden dem Patienten in bestimmten Fällen Zellen eines gesunden Spenders intravenös verabreicht, um funktionstüchtige Blutzellen hervorzu bringen. Die immunologische Abwehr kann man durch Wahl geeigneter Spender vermindern, so dass diese Therapie erfolgreich, aber immer noch sehr aufwendig ist. Eine weitere Option besteht darin, im Patienten schlummernde adulte Stammzellen „zum Leben zu erwecken“ und zu veranlassen, neue, intakte Zellen zu bilden. Das Potential adulter Stammzellen ist größer als anfangs vermutet: Blutbildungs-

zellen vermögen offensichtlich auch Leber- und Nervenzellen zu bilden und scheinen von breitem therapeutischen Nutzen zu sein.

Ein noch größeres Differenzierungspotential versprechen indes die Zellen, die während der Individualentwicklung wirken: Hier richtet sich das Augenmerk insbesondere auf die embryonalen Stammzellen (ESZ). Sie liegen im frühen Säugetierkeim (Blastocyste) vor und lassen sich vergleichsweise einfach und in ausreichender Menge kultivieren. Die Vision einiger Stammzellforscher ist es, speziell auf den Patienten zugeschnittene embryonale Stammzellen für therapeutische Zwecke herzustellen. Hierzu werden Eizellen entkernt und mit dem somatischen Kern des Patienten versehen. Aus einer so behandelten Eizelle können Blastocysten hervorgehen, denen dann Stammzellen entnommen werden, um sie *in vitro* zu dem gewünschten Gewebe zu differenzieren. Da Gewebe und Empfänger genetisch übereinstimmen, ergäben sich bei der Transplantation keine immunologischen Probleme.

Dieses so genannte therapeutische Klonen wirft ethische Probleme auf: Mit dem Transfer eines somatischen Kerns in eine entkernte Eizelle wird eine genetische Kopie (Klon) eines Individuums geschaffen, zudem erfordert die Nutzung embryonaler Stammzellen einen zerstörerischen Eingriff. Die Frage: Wann beginnt Leben? – stellt sich hier sehr konkret. Nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz ist jedes Experimentieren mit der befruchteten Eizelle untersagt. Dies führte dazu, dass in Deutschland nur unter strengen Voraussetzungen das Arbeiten mit importierten Stammzellen zulässig ist. Möglicherweise sind wir aber gar nicht gezwungen, den Rubikon einer verbrauchenden Embryonenforschung zu überschreiten: Wie in unserem Beitrag ausgeführt, gibt es alternative Wege, um Zellen von der Qualität körpereigener embryonaler Stammzellen zu erzeugen. Ein Schlüssel hierfür ist die „Reprogrammierung“ von Körperzellen. Dahinter steckt eine grundlegende Frage der Entwicklungsbiologie: Warum ist das Entwicklungspotential einer Stammzelle größer als das einer



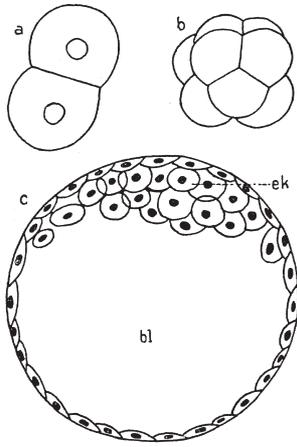
Dr. Klaus Rehfeld

Statt Kräfte auf das Klonen von Lebewesen zu vergeuden, gilt es, die Anstrengungen auf das Verantwortbare zu konzentrieren.

aus ihr hervorgegangenen Gewebezelle, wo doch beide genetisch identisch sind? Offensichtlich spielen Interaktionen zwischen DNA und Proteinen eine Rolle. Diese komplexe „epigenetische Programmierung“ ist es auch, die Schöler jede Form des Klonens ganzer Lebewesen vehement ablehnen lässt. Hinzu kommen erhebliche genetische Bedenken. Statt unnötige Kräfte für das spektakuläre reproduktive Klonen zu vergeuden, plädiert er nachdrücklich dafür, *alle* Optionen der Stammzelltherapie auszuschöpfen. Mit der Erzeugung von Oocyten-ähnlichen Zellen aus embryonalen Stammzellen der Maus ist ihm und seinen Mitarbeitern im Mai dieses Jahres ein bislang nicht für möglich gehaltener Schritt gelungen. Wird damit das eherne, Generationen verbindende Band der Keimbahn aufgelöst? – Es ist zu früh, diese Versuche zu bewerten (ebenso die jüngste Meldung japanischer Forscher über die Erzeugung von Spermien aus ESZ). Es gehört zum Wesen der Forschung, dass sie ethische Fragen aufwirft. Wissen, wie es unser Übersichtsbeitrag vermittelt, liefert keine moralischen Maßstäbe, aber es gibt Orientierung für verantwortbare Entscheidungen.

Klaus Rehfeld

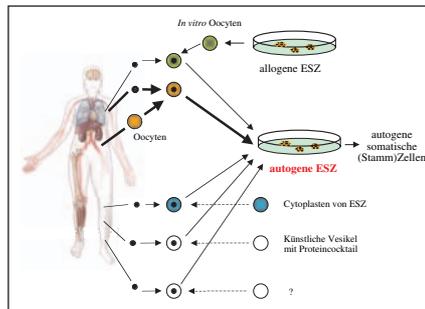
Inhalt



Frühe Entwicklung eines Säugetieres.
a) zweizellige, b) mehrzelliges Furchungsstadium, c) Blastocyste mit Embryonalknoten (ek) und Flüssigkeit erfülltem Raum (bl).
[Oskar Hertwig: Handbuch der Entwicklungslehre der Wirbeltiere, 1906]

ÜBERSICHT

Hans Robert Schöler
Das Potential von Stammzellen – Ist der Mensch regenerierbar? 525
Das Feld der Stammzellforschung hat vor etwa vier Jahren einen gewaltigen Aufschwung erhalten, als Studien belegten, dass sich adulte Stammzellen in viele unterschiedliche Zelltypen differenzieren können. Diese Eigenschaft macht sie für den Einsatz in der Krankheitstherapie des Menschen interessant, denn Mediziner hoffen, Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer, Krebs oder Diabetes eines Tages mit Hilfe von Stammzellen behandeln zu können. Ein noch höheres Potential steckt in den embryonalen Stammzellen, die nahezu alle Zelltypen hervorbringen können. Sie lassen sich aber bislang nur über eine verbrauchende Embryonenforschung gewinnen, die aus ethischen Gründen in Deutschland und anderen Ländern verboten ist. Der Autor zeigt in seinem Beitrag die therapeutischen Einsatzmöglichkeiten humaner Stammzellen auf und stellt Möglichkeiten vor, wie man auf künstlichem Wege embryonale-ähnliche humane Stammzellen erzeugen kann.



Herstellung autogener („körpereigener“) embryonaler Stammzellen (ESZ).

FORSCHUNG

Thomas M. Kaiser, Gerd Alberti, Volker Bullwinkel, Peter Michalik, Charles Msuya, Ellen Schulz
Mahenge – Ein Fenster zum Mitteleozän Afrikas 540
Der Zeitabschnitt des Eozäns (54–35 Mio. Jahre vor heute) ist für das Verständnis der Evolution der Säugetiere, die sich damals rasch entfalteten, von großer Bedeutung. Zu den wenigen Fundstätten, die Einblick in diese erdgeschichtliche Epoche gewähren, gehört der vulkanische Kratersee Mahenge im nördlichen Zentraltansania. Im letzten Jahr wurden hier im Rahmen des Sub-Sahara-Paleogene-Project eine Fülle von Tier- und Pflanzenfossilien geborgen. Sie geben erstmals Auskunft über die Lebenswelt des Mitteleozäns südlich der Sahara und bieten einmalige Vergleichsmöglichkeiten mit entsprechenden Fundstätten der Nordhalbkugel (Grube Messel, Eckfelder Maar u. a.). Zu den überraschenden Ergebnissen gehört, dass sich der Lebensraum im Gebiet von Mahenge seit dem Eozän offensichtlich wenig geändert hat – was eine genauere paläoökologische Rekonstruktion erleichtern dürfte. Auch in benachbarten Paläoseen haben die Forscher fein geschichtete Seeablagerungen entdeckt, so dass mit weiteren Fossilfunden zu rechnen ist.



Arbeit im Forschungscamp bei Mahenge (Tansania).

NR 664

Naturwissenschaftliche Rundschau
Organ der Gesellschaft
Deutscher Naturforscher und Ärzte

56. Jahrgang, Oktober 2003

Redaktion: Dr. Klaus Rehfeld
Tel. (0711) 2582-295
Redaktionsassistentin: Monika Ballier
Tel. (0711) 2582-289

Anschrift: Birkenwaldstraße 44
D-70191 Stuttgart
Fax. (0711) 2582-283
E-Mail: NR@wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de
Herausgeber: Dr. Klaus Rehfeld

Zitierweise: Naturw. Rdsch.

Herausgeberbeirat: Hans Rotta, Stuttgart
Prof. Dr. Roswitha Schmid, München
Prof. Dr. Roland Bulirsch, München
Prof. Dr. Wolfgang Höll, München
Prof. Dr. Jobst-Heinrich Klemme, Bonn
Prof. Dr. Werner Martienssen, Frankfurt a. M.
Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler, Mainz
Prof. Dr. Wolfgang Walter, Hamburg

Naturwissenschaftliche Rundschau: Begründet 1948, herausgegeben von Hans Walter Frickhinger und Hans Rotta – 1955 Herausgeber Hans Rotta – 1968 bis 1999 Herausgeber Hans Rotta und Roswitha Schmid

Rundschau

PHYSIK

- Pentaquarks nachgewiesen 547
Neues von Polarlichtern 548
Wenig Raum für
Extra-Dimensionen 549
Plutoniumverseucht für immer . 550

GEOLOGIE UND PALÄONTOLOGIE

- Hot spot-Vulkanismus und
Plattentektonik 551
Frühwarnsystem bei Erdbeben .. 552
Kannibalischer Raubdinosaurier
aus Madagaskar 553
Ein vereinfachter Stammbaum
des Menschen 553

BIOWISSENSCHAFTEN

- Ubiquitin und
Selbstinkompatibilität 555
Warum Pflanzen in der Stadt besser
gedeihen 556
Regulation der Sporenbildung
bei Pilzen 556
Fitness-Kontrolle bei
transgenen Nutzpflanzen 557
DNA-Virus-Satelliten und
Blattkrankheiten 558

- Fächerflügler nutzt Wirtshaut
als Tarnkappe 559
Können Blässhühner zählen? ... 560

HUMANWISSENSCHAFTEN

- Mensch und Affe –
genetische Unterschiede 561
Landwirtschaft und
Sprachentwicklung 561
Therapiekosten und Alter 563
Wasser für Afrikas Städte 563

LEBENSMITTELTECHNOLOGIE

- Aktive Verpackungen 564

KURZMITTEILUNGEN

- Sauerstoffatome in Perowskiten ·
Attosekunden-Spektroskopie ·
Titan-Saphir-Laser · Uferröhrliche
des Bodensees · Polyphänismus
bei Insekten · Ultraschallwellen zur
Zellzerstörung · Photobioreaktoren ·
Erkundung des Erdkerns · Alkohol-
freies Getränk Rhino Malta ·
EUMETSAT Kooperationsvertrag ·
DFG-Verbindungsbüro in
Moskau · Max-Planck-Institut für
Kognitions- und Neurowissen-
schaften · Wissenschafts-
abkommen · Verstärkung 506

BÜCHER UND MEDIEN

- Besprechungen 569

Ludwig Kühn:
Das Milchstraßensystem.

Rainer H. Kluwe, Gerd Lüer,
Frank Rösler (Hrsg.):
Principles of Learning and Memory.

Deutsche Stratigraphische
Kommission (Hrsg.):
Stratigraphische Tabelle
von Deutschland 2002.

Sarah Jansen:
Schädlinge.

- Neuerscheinungen 572

PERSONALIA

- Todestage 573
Geburtstage 573
Akademische Nachrichten 574
Ehrungen 574

SERVICE

- Tipps und Hinweise 575
Nachrichten aus dem Internet ... 576
Veranstaltungen 576

NR Stichwort:

- Rasse 577

NR Retrospektive 579

- Vorschau 580

- Impressum 580



Titelbild 10/2003:

Blatt eines eozänen Baumes aus Mahenge (Tansania). Paläontologen arbeiten zunehmend interdisziplinär, um Einblicke in die Lebensbedingungen und Lebensräume früherer Erdzeitalter zu gewinnen. Bei der Rekonstruktion vergangener Organismenwelten beziehen sie alle verfügbaren Daten ein, wie sie insbesondere von Geologen, Mineralogen, Isotopenphysikern und Klimaforschern geliefert werden. Zudem suchen sie den Anschluss an die Rezent-Biologen, die ihnen Auskunft über all jene Eigenschaften geben, die fossil nicht erhalten

werden können, wie physiologische Mechanismen oder Verhaltensweisen. Mittlerweile ist unser Wissen über das Eozän (54–35 Mio. Jahre vor heute) erstaunlich detailliert: Es war eine „Treibhaus-Welt“, die Wärme liebenden Organismen eine Fülle geeigneter terrestrischer Habitate bot, die Kontinente waren zum Teil über Landbrücken verbunden (z. B. Nordamerika und Nordeuropa über die Thule-Brücke und die DeGeer-Route) und befanden sich auf anderer geographischer Breite. So lag das heutige Zentraltansania mit der Fundstätte Mahenge mindestens 15° südlich des Äquators (Beitrag S. 525). Damals war die zentrale Hochfläche Tansanias von einem Urwald bedeckt, in dem mehrere Maarseen lagen, darunter der See von Mahenge. Dank günstiger Umstände (feinkörnige Sedimente, lebensfeindliche Bedingungen in tiefen Wasserzonen) sind hier Fossilien mitsamt ihrer Feinstrukturen gut erhalten. Von ihrer Untersuchung darf man ähnlich detaillierte Aufschlüsse erwarten, wie man sie von den berühmten Fossilien der eozänen Grube Messel gewonnen hat. Das hier gezeigte ganzrandige Fiederblatt einer Leguminose zeigt Anpassungen an ein relativ trockenes Klima. Auch andere Befunde deuten darauf hin, dass der See von einem lichten Trockenwald umgeben war, der dem heutigen Miombwald der Region in seiner Struktur ähnlich war.

[Photo: Thomas M. Kaiser]

Rd

BIOMAX 14 –
Arbeitspapier der
Max-Planck-Gesellschaft
(Herbst 2003)

Christina Beck:
**Vom Vorteil, etwas anders
zu sein – warum Leben
auf Biodiversität setzt**

550

Hans Robert Schöler, Pennsylvania/USA

Das Potential von Stammzellen

– Ist der Mensch regenerierbar?

Die Zahl der Menschen, die an unheilbar degenerativen Erkrankungen leiden, geht in die Millionen. Wer den langsamen, aber unaufhaltsamen körperlichen Zerfall eines Menschen miterlebt hat, kann die Intensität der Hoffnung erahnen, die viele der direkt und indirekt Betroffenen derzeit auf die Erforschung und Nutzung von Stammzellen setzen. 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?

Bis vor einigen Jahren in der Öffentlichkeit nahezu unbekannt, ist der Begriff „Stammzellen“ zu einer Zauberformel geworden, die in Zukunft nahezu all unsere medizinischen Probleme lösen soll. Glaubt man den öffentlichen Verlautbarungen vieler Protagonisten, so wird man mittels dieser Wunderzellen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson vielleicht nicht heilen, aber den Betroffenen zumindest ein menschenwürdiges Leben ermöglichen. Aktuelle Schätzungen für die USA besagen, dass mehr als 128 Millionen Menschen durch Stammzellen geholfen werden kann – das ist fast die Hälfte der Bevölkerung (Tab. 1). 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 sind [1]. Dies sollte auch eine 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 können, 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 blutbildende 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 vier Jahren erhalten, als Veröffentlichungen nahe legten, dass sich 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 im Körper ein Leben lang, wobei sie einerseits identische Kopien ihrer selbst machen, andererseits sich in spezialisierte Zellen des jeweiligen Gewebes differenzieren können [3]. Man hat adulte Stammzellen in einer Vielzahl von Organen und Geweben entdeckt: Knochenmark, Gehirn, Epidermis, Blut, Leber, Haut, Auge, Darm, Bauchspeicheldrüse (Pankreas) und Skelettmuskeln sind Beispiele dafür (Abb. 1).

Kardiovaskuläre Krankheiten	58 Millionen
Autoimmunkrankheiten	30 Millionen
Diabetes	16 Millionen
Osteoporose	10 Millionen
Krebs	8,2 Millionen
Alzheimer Krankheit	5,5 Millionen
Parkinson Krankheit	5,5 Millionen
Schwere Brandwunden	0,3 Millionen
Verletzungen des Rückenmarkes	0,25 Millionen
Geburtsdefekte	0,15 Millionen/Jahr

Tab. 1. Mögliche Patientengruppen für Therapien, die auf Stammzellen beruhen. Nach einer Studie für die USA [D. Perry, Science **287**, 1423 (2000)].

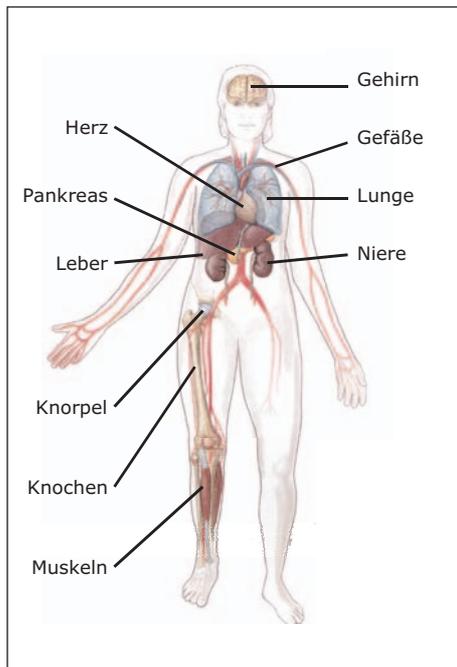


Abb. 1. Beispiele von Organen und Geweben, in denen *adulte Stammzellen* identifiziert wurden.

KASTEN 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, so dass sie je nach Entwicklungsstadium – zum Teil zeit lebens – 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 die Abgrenzung der Begriffe 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 differenzieren zu können. 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 drei Keimblätter. Beispiel: Embryonale Stammzellen.

Multipotenz: Fähigkeit einer Zelle, sich in eine Vielzahl von Abkömmlingen zu differenzieren. Beispiel: Stammzellen des hämatopoetischen Systems (siehe Abb. 2).

Oligopotenz: Fähigkeit einer Zelle, sich in wenige Abkömmlinge zu differenzieren. Beispiel: Lymphoide oder Myeloide Stammzellen (siehe Abb. 2).

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

Eine 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 zum beeinträchtigten Gewebe wandern, wie etwa neuronale Stammzellen in Nagern zum Bereich eines Hirntumors [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 manipulieren, dass sie dadurch zur Regenerierung des Gewebes wichtige Substanzen bilden. Dies wäre besonders dann interessant, wenn der Patient eine genetisch bedingte Krankheit hätte.

Völlig überraschend war die Entdeckung, dass selbst adulte Stammzellen in einem ausgewachsenen Organismus noch eine hohe *Plastizität* haben. Unter Plastizität versteht man, dass sie nicht nur Zellen des Gewebetyps, in dem sie sich befinden, bilden, sondern auch Zellen eines anderen Gewebes. Je nach Grad der Plastizität werden solche Zellen als *unipotent*, *oligopotent*, *multipotent* oder *pluripotent* bezeichnet (Kasten 1, [7]). Insbesondere eine Pluripotenz adulter Stammzellen war nahezu unvorstellbar gewesen, hatte man doch angenommen, dass sich Stammzellen, die von einem der drei Keimblätter des Embryos (Ektoderm, Mesoderm oder Entoderm) abstammen, nicht Abkömmlinge eines der anderen beiden Keimblätter generieren können.

Es wurde aber von verschiedenen Forschern gezeigt, dass Stammzellen, die von einem Keimblatt abstammen, sich auch in Abkömmlinge eines anderen Keimblattes differenzieren. 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 drei Keimblätter bilden können, wenn man sie in Blastocysten (vgl. Abb. 3, S. 529) injiziert [10].

Hämatopoetische Stammzellen

Die Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) des Knochenmarks sind die am besten charakterisierten adulten Stammzellen (Abb. 2). Zuerst wurden sie dadurch identifiziert, dass sie Zell-Linien des Blutes wieder herstellten und dadurch Mäuse retteten, die ansonsten aufgrund einer letalen Strahlen-

dosis gestorben wären. Man findet sie nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der fötalen Leber und Milz sowie im Blut der Plazenta und der Nabelschnur.

Verschiedene HSZ-Populationen wurden untersucht, wobei bestimmte Oberflächenmarker der Zelle verwendet wurden. Als ein wichtiges Hilfsmittel zur Isolierung von Stammzellen hat sich ihre Fähigkeit herausgestellt, einen zuvor hinzugefügten vitalen Farbstoff (Hoechst 33342) wieder aus der Zelle heraus transportieren zu können [11]. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen bilden HSZ Zelltypen, die nicht Teil des Blutes sind, beispielsweise Leberzellen [12–14]. Weitere Untersuchungen legten nahe, dass sich HSZ in eine Reihe von Zellen differenzieren, die sich sogar in das jeweilige Gewebe integrieren, nämlich Zellen der Skelettmuskulatur, der Herzmuskeln, der Blutgefäße und des Gehirns [15–17].

Auch wenn viele Publikationen die Aussichten einer Therapie mit adulten Stammzellen sehr positiv erscheinen lassen, muss es sich in den meisten Fällen erst noch zeigen, ob die Ergebnisse tatsächlich auf der Plastizität von Stammzellen beruhen.

- Adulte Stammzellen sind nämlich 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 Gewebe mehrere Stammzelltypen befinden

und diese während der Präparation lediglich nicht voneinander getrennt wurden. Tatsächlich wurde vor kurzem belegt, dass Stammzellen aus Muskeln, von denen zuvor gezeigt worden war, dass sie in der Maus alle wichtigen Zelltypen des Blutes bilden können, in Wirklichkeit dem hämatopoetischen System entstammen [18]. Diese aus Muskeln isolierten HSZ waren nicht in der Lage, in der Kulturschale 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 substantielle Zahl von HSZ zirkuliert und somit auch in Muskeln zu finden sind.

- Andere Arbeiten, wie die zur Differenzierung fötaler neuronaler Stammzellen der Maus in HSZ, konnten trotz eingehender Studien nicht reproduziert werden [19]. Die ursprünglich beschriebene Umwandlung in Blutzellen wurde als ein Kultivierungsartefakt interpretiert. Möglicherweise hatten die Kulturbedingungen das Genom verändert, etwa durch Mutation der DNA-Sequenz in den Zellen. Allerdings ist es eher wahrscheinlich, dass Modifikationen des Genoms für die Veränderungen verantwortlich sind. Solche Modifikationen des Genoms bezeichnet man als *epigenetische Markierungen*, auf die weiter unten noch eingegangen wird.

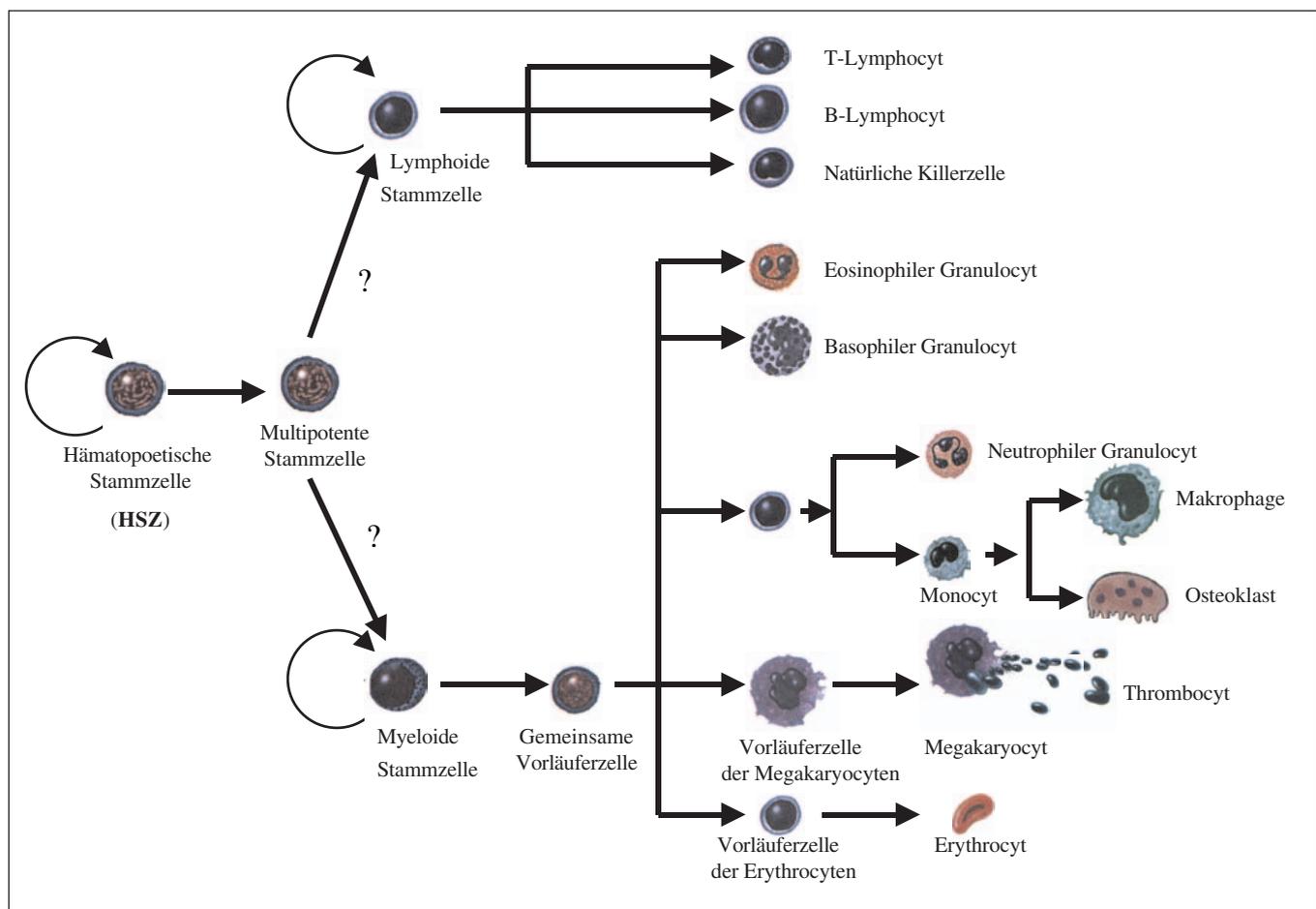


Abb. 2. Das Hämatopoetische System. Links eine *Hämatopoetische Stammzelle* (HSZ), die weitere HSZ hervorbringt. Deren Nachkommen können sich weiter teilen oder als Multipotente Stammzelle eine Lymphoide- oder Myeloide Stammzelle hervorbringen, die sämtliche Blutzelltypen bilden.

- Ein weiterer Grund für die beobachtete Plastizität mancher Stammzellen mag die Fusion mit anderen Zellen sein, die zu tetraploiden Zelllinien führt [20, 21]. Plötzlich konnten die Zellen mehr, weil andere Zellen in ihnen schlummernde Eigenschaften geweckt hatten. Solche Ergebnisse haben die von vielen bereits zuvor geäußerte Skepsis gegenüber der Pluripotenz adulter Stammzellen noch mehr verstärkt [22–24].

Um einen soliden wissenschaftlichen Nachweis der Pluripotenz von Stammzellen führen zu können, müssen einzelne Zellen für die Untersuchungen benutzt werden. Ein solcher Nachweis ist nicht nur für die HSZ, sondern für einen zweiten Stammzelltyp des Knochenmarks, die mesenchymalen Stammzellen (MSZ), gelungen. Die erste Studie führte nämlich den Nachweis, dass eine einzelne hämatopoetische Stammzelle sich in Abkömmlinge aller drei Keimblätter differenzieren kann und daher pluripotent ist [17]. Neben HSZ wurden auch MSZ aus dem Knochenmark ausgewachsener Mäuse isoliert und für eine Reihe von Untersuchungen eingesetzt [25, 26].

Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) können Abkömmlinge aller drei Keimblätter bilden; sie liefern beispielsweise alle Formen von Binde- und Stützgeweben, quergestreifte Muskulatur, fast alle glatten Muskelzellen, Herzmuskulatur und Gefäßendothelien. MSZ haben großes Aufsehen erregt, da einzelne Zell-Linien inzwischen mehr als zwei Jahre in Kultur gehalten wurden und wichtige Merkmale pluripotenter Zellen besitzen. Einzelne MSZ der Maus und der Ratte ließen sich in Kultur in eine Vielzahl von Zelltypen differenzieren. Ein wichtiger Beweis der Pluripotenz von einzelnen MSZ war insbesondere, dass sie nach Injektion in Blastocysten der Maus fast alle Zelltypen des Körpers bilden und diese sich auch in allen Organen ansiedeln können. Da diese Zellen ein so großes Potential zu besitzen scheinen, ist es wichtig, dass diese von vielen Laboratorien untersucht werden. Es gibt zahlreiche wichtige Fragestellungen, die man gerne beantworten möchte. So konnte man bislang diese Zellen nicht erfolgreich aus Menschen isolieren, die älter als 50 Jahre sind. Ein Grund hierfür könnte sein, dass auch adulte Stammzellen einem Alterungsprozess unterliegen [27]. Ein weiterer Aspekt ist, dass nach einer gängigen Hypothese der menschliche Körper nur für eine Lebensdauer von etwa 45 Jahren angelegt ist (zur Übersicht [28]). Selbst für die Maus steht noch der Nachweis aus, dass die Zellen einen Schaden funktionell ausgleichen können. Eine äußerst wichtige Frage ist, ob HSZ und MSZ des Menschen überhaupt für therapeutische Zwecke geeignet sind. Sollte dies der Fall sein, so darf man gerade von diesen beiden Stammzelltypen des Knochenmarks in Zukunft viel erhoffen.

Möglichkeiten und Grenzen von Knochenmark-Stammzellen

Davon abgesehen, dass sich diese Befunde eventuell nicht verallgemeinern und auf den Menschen übertragen lassen, gibt es einige Hürden, die überwunden werden müssen, be-

vor man adulte Stammzellen für die Therapie einsetzen kann. Das erste Problem ist, dass Stammzellen nur in geringer Zahl vorhanden sind. So ist nur eine Zelle unter 10 000 Zellen des Knochenmarks eine HSZ. Um adulte Stammzellen sinnvoll einsetzen zu können, müssen Stammzellen aber in größeren Mengen erzeugt werden. Dies führt direkt zum zweiten Problem, dem der mangelnden Kenntnis der Kulturbedingungen von adulten Stammzellen. So ist man beispielsweise nicht in der Lage, HSZ in Kultur zu vermehren. Dies liegt zum großen Teil daran, dass man über die zelluläre Umgebung von Stammzellen im Organ (sog. Nischen; engl. *stem cell niche*) und die Wachstumsfaktoren, die in diesen Nischen gebildet werden, nahezu nichts weiß. Ferner sind unsere Kenntnisse über adulte Stammzellen in einem geschädigten Gewebe sehr gering. So könnte es sein, dass in einer betroffenen Nische die notwendigen Zellen und Faktoren fehlen, die von Stammzellen zur Vermehrung und Differenzierung in die entsprechenden Zellen des Gewebes benötigt werden.

Ein weiteres Problem ist die mögliche Abstoßung durch das Immunsystem. Wegen der geringen Zahl der adulten Stammzellen in Geweben sind diese nur sehr schwer zu isolieren, weshalb die meisten Transplantationen des Knochenmarks recht unrein sind. Dies ist nicht wünschenswert, da im Falle von nicht übereinstimmenden Antigenen der Zelloberfläche (sog. Histokompatibilitäts-Antigene) eine größere Zellzahl zu einer verstärkten Immunabwehr führen kann. Dagegen besiedeln konzentrierte hämatopoetische Stammzellen das Blut schneller und effizienter, was unter anderem die Infektionsrisiken verringert, weil der Körper nur für kurze Zeit ohne Immunabwehr ist [29].

HSZ des Nabelschnurblutes werden vermutlich in Zukunft sehr wichtig für die Therapie von Krankheiten sein [30]. Transplantate von Nabelschnurblut rufen interessanterweise keine starke Abwehrreaktion hervor [31]. Man nimmt an, dass die Zellen im Nabelschnurblut weniger differenziert sind als im Blut ausgewachsener Organismen und daher weniger stark immunologisch wirken [32]. Ein beachtenswerter Vorteil von Nabelschnurblut ist auch, dass die Histokompatibilitäts-Antigene im Voraus identifiziert und katalogisiert werden können. Allerdings ist auch die Zahl der HSZ sehr gering, die man aus den etwa 50 bis 150 ml Blut einer Nabelschnur-Plazenta-Präparation erhält. 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, 33]. Das Verständnis der Stammzellnischen von Modellorganismen wie *Drosophila* dürfte dazu einen wichtigen Beitrag liefern [34].

Fötale Stammzellen

Fötale Stammzellen sind primitive Zellen des Fötus (d. h. der Leibesfrucht nach Abschluss der Organogenese bis zum Zeitpunkt der Geburt), die Zellen in den verschiedenen Organen des entstehenden Körpers bilden und erneuern.

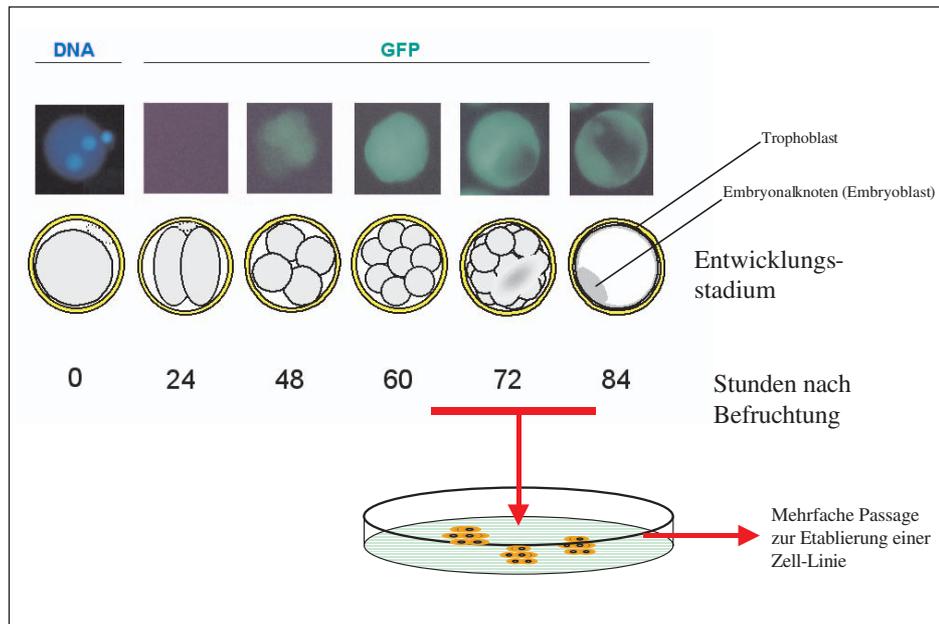


Abb. 3. Gewinnung von *Embryonalen Stammzellen* (ESZ). In der Mitte schematische Darstellung der Entwicklungsstadien. 0 Std.: Befruchtete Oocyte; 24 bis 72 Std.: verschiedene Teilungsstadien, in denen die Zellen schließlich dicht nebeneinander liegen (Maulbeerkeim, Morula); 84 Std.: Blastocyste (Hohlkeim) mit Embryonalknoten (= Embryoblast) und Trophoblast (äußere Hohlkugel). Die Farbaufnahmen darüber zeigen die Grünfärbung durch das Transgen *Oct4* GFP etwa ab 48 Std. nach der Befruchtung (vgl. S. 531). Die DNA-Färbung der befruchteten Oocyte zeigt den weiblichen und den männlichen Vorkern (deren Verschmelzung, Karyogamie, steht noch bevor) und ein Polkörperchen.

Bislang waren folgende fötale Stammzellen Gegenstand der Forschung: HSZ, neuronale Stammzellen und Vorläufer der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. *Neuronale Stammzellen* kommen in großen Mengen im fötalen Gehirn vor, sie können leicht isoliert werden und lassen sich im undifferenzierten Zustand in Kultur halten. Außerdem können sich neuronale Stammzellen des Fötus in die drei Hauptzelltypen des Gehirns differenzieren [35, 36]. Neuronale fötale Stammzellen wurden in Tieren verwendet, die als Modelle für das Parkinson-Syndrom des Menschen dienen [37, 38]. *Fötale Pankreaszellen* können Insulin bilden, nachdem sie in diabetische Mäuse transplantiert wurden. Es wurde jedoch bislang nicht gezeigt, ob es sich wirklich um Stammzellen, um Vorläuferzellen oder um bereits differenzierte Langerhans'sche Inseln handelte [39].

Schließlich wurden *Urkeimzellen* aus der sich bildenden Gonade isoliert und in Kultur zu Zellen transformiert, die große Ähnlichkeit mit embryonalen Stammzellen haben [40]. Diese Zellen sind pluripotent, da sie sich in viele Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren können, aber nicht in Gameten.

Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESZ) bilden den Embryonalknoten (Embryoblast) der Blastocyste (vgl. Abb. 3). 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 drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm als Grundlage des embryonalen Körpers.

Potential und erste Erfolge

Im Gegensatz zu dieser recht kurzen Entwicklungsperiode im Embryo können sich ESZ unter geeigneten Bedingungen in Kultur unbegrenzt vermehren. Wie im Organismus kön-

nen sich ESZ auch in Kultur in eine Vielzahl von Zelltypen differenzieren. Vor mehr als 20 Jahren wurden Zell-Linien von ESZ der Maus etabliert (Abb. 3). Seitdem hat man eine Fülle von Informationen gesammelt, um die ESZ-Linien zu kultivieren und zu differenzieren (Übersicht in [7, 41]). So konnten aus ihnen verschiedene Zellen des Nervensystems, Insulin produzierende Zellen, Knochenzellen, Zellen des hämatopoetischen Systems, Endothelzellen, Fettzellen und unterschiedliche Muskelzelltypen, wie beispielsweise Herzmuskelzellen, gebildet werden.

Menschliche ESZ wurden erstmals 1998 erfolgreich kultiviert [42]. 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 unter anderem Knochen, Zähne, Haarfollikel und Lungengewebe in ihnen 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 an bestimmten Stellen des Körpers weiterhin in einem undifferenzierten Zustand halten können, könnten sich lebensbedrohliche Tumore (Teratokarzinome) bilden. Um ESZ zur Therapie nutzen und gleichzeitig Gefahren wie Tumore ausschließen zu können, wird man das biologische Programm von ESZ einengen müssen, etwa indem man es durch partielle Differenzierung in eine gewünschte Richtung lenkt. Ideal wäre es, ESZ in Kultur in adulte Stammzellen spezifischer Potenz zu differenzieren. Bei der Maus ist dies bereits gelungen. So wurde vor kurzem gezeigt, dass sich aus ESZ der Maus neuronale Stammzellen für funktionsfähige dopaminerge Neuronen erzeugen lassen [43]. Diese konnten die Parkinson-typischen Symptome in Ratten, die als Modell für das Syndrom dienen, deutlich mildern. Solche Erfolge wurden zwar schon zuvor mit neuronalen Stammzellen aus fötalen, neu-

geborenen und adulten Stammzellen der Maus erzielt, jedoch war es für jene Experimente nicht einfach, Stammzellen in ausreichenden Mengen zu erhalten. Neuronale Stammzellen aus menschlichen Gehirnen zu gewinnen, gleichgültig welcher Entwicklungsstufe, würde naturgemäß ein zusätzliches Problem darstellen. Außerdem wurden mittels transplantierter ESZ der Maus Rückenmarksverletzungen teilweise kuriert [44]. ESZ der Maus wurden auch in Insulin produzierende Zellen differenziert, die nach ihrer Transplantation die Insulinregulation im diabetischen Körper zumindest zum Teil wiederherstellen konnten [45].

Humane ESZ 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. Denkbar wären Xenotransplantationen, wie sie für das Ratten-Modell des Parkinson-Symptoms beschrieben wurden, in diesem Fall zwischen Mensch und Affe. Ich vermute, dass in nicht allzu ferner Zukunft entsprechende Berichte über Rhesusaffen veröffentlicht werden, in denen Diabetes oder Parkinson mit menschlichen, von ESZ stammenden Zellen kuriert werden konnte. Neben solchen funktionellen Analysen muss aber auch gezeigt werden, dass die transplantierten Zellen sich richtig in den Zellverband integrieren. Dies wird wichtig für Nerven- und Herzmuskelzellen sein, wohl weniger wichtig für Zellen des Blutsystems.

Probleme der Kultivierung

Um ihre Pluripotenz zu bewahren, mussten ESZ von Mensch und Maus bislang in *serumhaltigem Medium* und auf Nährzellen gehalten werden. Dies stellte im Falle der humanen ESZ ein mögliches Problem dar, da die Nährzellen aus der Maus stammten und das Serum aus Kühen und somit Zoonosen, also Infektionen, die von Tieren auf den Menschen übertragen werden, nicht ausgeschlossen werden konnten. Vor kurzem wurde jedoch die Kultivierung von humanen ESZ auf menschlichen Nährzellen beschrieben [46]. Es bleibt abzuwarten, ob die als Nährzelllieferanten verwendeten Gewebe, wie fötale Muskeln und fötale Haut, tatsächlich notwendig sind, um die Pluripotenz der humanen ESZ zu erhalten. Um Zoonosen und die Verwendung menschlicher Nährzellen aus ethischen Bedenken und dem derzeit noch damit verbundenen Aufwand zu vermeiden, sollten *künstliche Kultursysteme* für humane ESZ etabliert werden. Dies ist kein utopisches Ziel; zumindest für ESZ der Maus ist es dadurch gelungen, dass der Kultur ein Faktor zugesetzt wird, der von den Nährzellen produziert wird [47]. Dieser Faktor (Leukemia inhibitory factor) hat aber keinen Einfluss auf humane ESZ und ist folglich für deren Kultur nicht geeignet. Von diesen Hürden einmal abgesehen, ist die Vermehrung von humanen ESZ ohnehin noch so mühselig, dass ein effizientes Arbeiten mit ihnen noch recht aufwendig ist.

Bevor man humane ESZ in Kultur nehmen konnte, wurden humane embryonale Karzinom-Zell-Linien verwendet,

um Untersuchungen an einem frühen embryonalen Zelltyp durchführen zu können. Im Gegensatz zu solchen embryonalen Karzinom-Zell-Linien haben ESZ auch nach mehr als zwei Jahren in Kultur noch immer einen normalen Satz an Chromosomen [48]. Das bedeutet jedoch nicht, dass diese Zellen frei von Mutationen sind. Wie man von anderen eukaryotischen Zellen weiß, wird mindestens eine Mutation pro Zellteilung in das Genom eingebracht [49, 50]. Somit geht man unweigerlich ein erhöhtes Risiko von genetischen Schädigungen ein, wenn man Zellen aus älteren Kulturen für die Therapie einsetzt.

Immunologische Probleme

Bei der Verwendung embryonaler, fötaler oder adulter Stammzellen ist die immunologische Unverträglichkeit von Spender und Empfänger eine wichtige Hürde. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wie etwa eineiigen Zwillingen, wird es aufgrund unterschiedlicher Histokompatibilitäts-Antigene zu einer Abstoßungsreaktion kommen. Eine Möglichkeit ist, auf die üblichen Verfahren zurückzugreifen, wie etwa auf die Verwendung von Immunsuppressiva oder auf eine gemeinsame Transplantation von eigenen (autogenen) und fremden (allogenen) Stammzellen nach Chemotherapie. Möglicherweise ließe sich das Verfahren vereinfachen, wenn es gelänge, folgendes, kürzlich für die Ratte entwickelte Verfahren auf den Menschen anzuwenden [51]: Sowohl ganze Blastocysten, als auch nur solche Zellen, die von dem Embryoblasten der Blastocyste stammen, wurden 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 diese Gefahr aber nicht bestehen und gelänge es, von ESZ abgeleitete HSZ in das Blutsystem einzubringen, so könnten weitere Transplantationen von differenzierten Zellen oder Geweben, die von denselben ESZ abstammen, durchgeführt werden. Es bestehen aber noch weitere Optionen: Man könnte eine große Zahl von unterschiedlichen ESZ-Linien von Blastocysten in Kultur nehmen, um die Chance zu erhöhen, eine Übereinstimmung mit dem Histokompatibilitäts-Antigen eines Empfängers zu haben. Eine derartige Vorgehensweise wurde in England gewählt, wo man mit etwa 300 verschiedenen ESZ-Linien hofft, den Großteil der Histokompatibilitäts-Antigene in der Bevölkerung abzudecken. Ferner besteht die Möglichkeit, die Histokompatibilitäts-Antigene durch homologe Rekombination in einer ESZ zu entfernen, in der Hoffnung, dass die Zellen nach Transplantation nicht als fremd erkannt werden. Diese Strategie hat man bereits bei der Xenotransplantation eingeschlagen. Eine perfekte Übereinstimmung ist aber erst möglich, wenn man ESZ nach Zellkerntransfer einer eigenen Körperzelle herstellt. Diese Möglichkeit wird im nächsten Abschnitt detailliert behandelt.

Klonen als Weg zur Gewinnung körpereigener embryonaler Stammzellen

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

Allogene Zellen haben den Vorteil, dass man die Stammzellen eines gesunden Organismus verwenden kann. Eine solche Therapie wäre beispielsweise bei genetischen Erkrankungen des Patienten sinnvoll. Sollte das Problem der immunologischen Unverträglichkeit von Spender und Empfänger gelöst werden können und sollten außerdem genügend Stammzellen zur Verfügung stehen, hat diese Option für eine Reihe von Erkrankungen gute therapeutische Chancen.

Autogene Stammzellen erlauben, das Problem der immunologischen Unverträglichkeit zu umgehen. Allerdings ist es fraglich, ob und wie viele Stammzellen man einem kranken Körper entnehmen kann. Es ist auch ungewiss, wie viele Stammzellen eines bestimmten Typs ein alternder Mensch besitzt, von einem alternden kranken Menschen ganz abgesehen. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass man bei genetischen Erkrankungen eben die Zellen verwenden würde, die eine schädliche Mutation tragen. Solche Erkrankungen, die auf einem Mangel eines bestimmten Genprodukts beruhen, kann man unter Umständen durch Einführen der Erbinformation beheben. Das Einschleusen des entsprechenden Gens kann beispielsweise durch modifizierte harmlose Lentiviren erfolgen, die imstande sind, Stammzellen zu infizieren. Eine solche Infektion würde man in der Kulturschale durchführen, bevor man die Stammzellen in den kranken Körper überträgt (Übersicht in [52]). Allerdings gibt es eine Vielzahl von genetischen Problemen, bei denen eine solche Expression nicht helfen würde. So kann ein Krankheitsbild beispielsweise dadurch verursacht werden, dass eine Mutation in einem Gen zu einem defekten Protein führt und dieses Protein die Funktion der Zelle beeinträchtigt. Auch ist es momentan nicht möglich, die Menge eines Proteins in der Zelle mit Hilfe eines Virus genau einzustellen oder gar zu regulieren. Aber gerade im physiologischen Kontext des Körpers ist oft essentiell, dass die Menge eines Proteins regulierbar ist. Es würde den Körper auf Dauer schädigen, wenn beispielsweise die „verbesserten“ Zellen ständig Insulin ausschütteten.

Der einzige Ausweg in solchen Fällen ist, den genetischen Defekt in den Stammzellen zu korrigieren, bevor man sie wieder in den Körper einbringt. Der Idealfall wäre, die Mutation im Genom durch die normale DNA-Sequenz auszutauschen, da dann die Regulation des Gens gewahrt bleibt. Dieses Vorgehen stellt aber für adulte Stammzellen momentan eine unüberwindliche Hürde dar. Dagegen ist für ESZ – zumindest für die Maus – die Methodik der homologen Rekombination etabliert und recht effizient. Hierbei wird das defekte Allel entfernt und durch ein normales Allel ausgetauscht. Da aber der Mensch ab dem 7. Tag seiner Entwicklung keine ESZ besitzt, können entsprechende Zellen nur auf *künstlichem Wege* hergestellt werden, wenn eine Therapie durch eigene Zellen erfolgen soll.

Methoden

Folgende Vorgehensweisen erscheinen mir prinzipiell denkbar, um körpereigene, ESZ-äquivalente Zellen abzuleiten. Bei jeder Vorgehensweise verwendet man als Ausgangsmaterial den Zellkern oder die Zelle des Patienten und versucht, ESZ oder ESZ-ähnliche Zellen herzustellen. Unterschiedlich sind in erster Linie die gewählten Wege, um das Potential des Zellkerns wieder zu seiner vollen Entfaltung zu bringen. Das Vorgehen, das in einer Reihe von Tierversuchen erfolgreich durchgeführt wurde, ist der *Kerntransfer somatischer Zellen* (KTSZ) in Oocyten (Abb. 4).

So ist es bei der Maus bereits gelungen, nach einem solchen KTSZ aus Blastocysten ESZ-Linien abzuleiten [53, 54]. Uns gelang es dann zu zeigen, weshalb solche Experimente erfolgreich sind, obwohl die Blastocysten in den meisten Fällen nicht lebensfähig sind [55]. Möglich waren diese Analysen durch die Verwendung des Gens *Oct4*, das ein für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von ESZ essentielles Protein codiert (Übersicht [56, 57]). Offensichtlich darf nur eine bestimmte Proteinmenge von Oct4 in ESZ gebildet werden (Abb. 5). Eine Abweichung um $\pm 50\%$ im Vergleich zu der Menge, die normalerweise in ESZ exprimiert wird, hat dramatische Folgen, da sich dann die ESZ differenzieren und ihre Pluripotenz verlieren [58].

Um die Pluripotenz nach Kerntransfer festzustellen, war es wichtig, die Entwicklung der mit einem diploiden somatischen Kern versehenen und damit gleichsam befruchteten Eizelle bis zur Blastocyste unter dem Mikroskop verfolgen zu können. Dazu wurde das *Oct4*-Gen mit der DNA-Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) gekoppelt [59, 60]. Die Analyse der transgenen Mäuse, von denen später Kerne für den Transfer verwendet wurden, hatte gezeigt, dass das

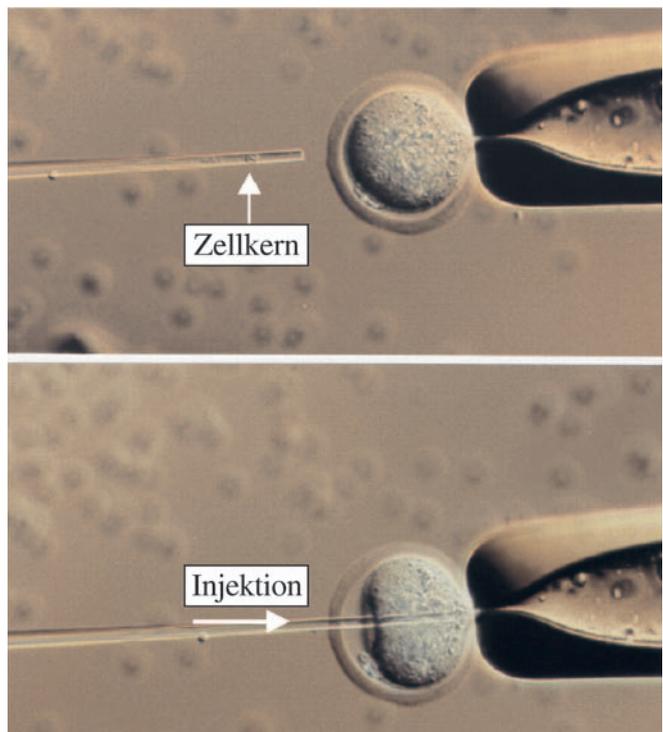


Abb. 4. Transfer eines Kerns einer Körperzelle in eine entkernte Oocyte.

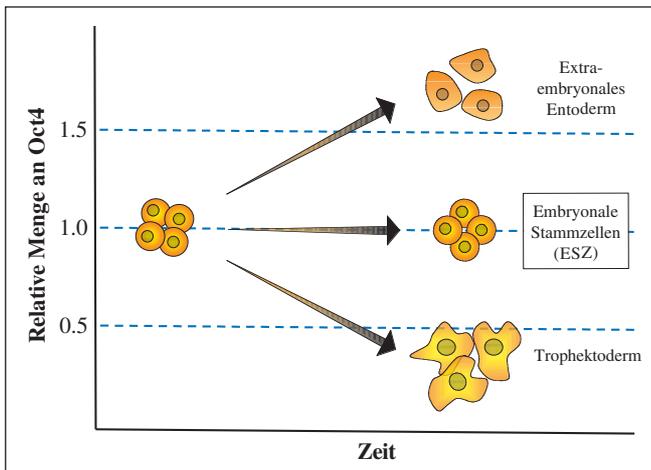


Abb. 5. Oct4 und Pluripotenz. Der Status als embryonale Stammzelle wird nur so lange aufrechterhalten, so lange das Protein Oct4 in einer bestimmten relativen Menge vorliegt. Kommt es zu Abweichungen, so geht die Pluripotenz irreversibel verloren.

GFP nur ESZ und Keimzellen grün färbt. Körperzellen, und das schließt adulte Stammzellen ein, zeigten dagegen keine Färbung. Kerne, die aus Körperzellen solcher transgener Mäuse stammten, führten nach Transfer in Oocyten dazu, dass bei Erfolg des Versuches alle Blastomere des Embryos ab dem Vierzellstadium grün leuchteten. Ohne die Expression des *Oct4*-Gens, die durch die grüne Färbung angezeigt wird, sind Blastomere nicht pluripotent. Nimmt man die Blastocysten in Kultur, bilden sich Zellkolonien auf der Kulturschale. Je nach Ausmaß der grünen Farbe in der Blastocyste ließen sich aus den Zellen der Kolonie ESZ-Linien erzeugen, die wiederum grün fluoreszierten. So ergab keine der ungefärbten Kolonien eine ESZ-Linie. Obwohl kaum lebensfähig als Embryo, wurden selbst dann ESZ-Linien aus Blastocysten gewonnen, wenn einige wenige Zellen kräftig grün leuchteten (Abb. 6).

Aus Gründen, die mit der Genomqualität somatischer Zellen zu tun haben, ist es wichtig, mehrere Zell-Linien zu untersuchen, um zu entscheiden, welche sich am besten für den Kerntransfer und 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 Zell-Linie vorherzusagen. Ein großer Vorteil von Zell-Linien, die durch Kerntransfer erzeugt werden, ist, dass sie in Kultur eingehend untersucht und nach ihrer Eignung (z. B. einen bestimmten Zelltyp bilden zu können) selektiert werden können, bevor man sie zur Stammzelltherapie einsetzt. Ein weiterer Vorteil ist, dass man diese Untersuchungen nur mit einem Teil der Zellen einer solchen Linie durchführen muss. Sobald man nämlich eine ESZ-Linie etabliert hat, wird ein Teil in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Erweist sich eine Linie später als geeignet, kann man auf das konservierte Material zurückgreifen. Dies verringert einige Risiken, beispielsweise, dass sich während der Kultivierung Mutationen in den Zellen anhäufen.

Da es unmöglich ist, das gesamte Genom von 3 Milliarden Basenpaaren eines Zellkerns auf Mutationen hin zu unter-

suchen, wird auch in Zukunft erst das biologische Ergebnis des Kerntransfers zeigen, ob das Experiment erfolgreich verlaufen ist. Dies ist im Falle von Zell-Linien kein Problem, da man leicht überprüfen kann, wie gut diese beispielsweise funktionsfähige Langerhans'sche Inseln oder Herzmuskelzellen zu bilden vermögen.

Therapeutisches und reproduktives Klonen

Während ein therapeutisches Verfahren, das auf der Auswahl von geeigneten Zell-Linien beruht, akzeptabel ist (*therapeutisches Klonen*), ist dieses Prinzip zur Erzeugung lebensfähiger Organismen abzulehnen. Gegen ein *reproduktives Klonen* stehen nicht nur ethische Bedenken, sondern auch methodische Gründe. Momentan liegt die *Klonierungseffizienz*, also der Prozentsatz der Organismen, die nach einem Kerntransfer in Oocyten lebend geboren werden, bei einigen Tierarten bei etwa 3 bis 5%, bei den meisten deutlich darunter. Es ist sicherlich mit Verbesserungen zu rechnen, doch auch dann dürfte es unmöglich sein, tote Embryonen und Föten zu vermeiden oder gar vor der Klonierung zu wissen, ob der transferierte Kern einen genetischen Defekt hat oder nicht. Ob das berühmte „Klonschaf“ Dolly auf Grund 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 [61]. Da die meisten Protagonisten reproduktiven Klonens sich dieser Probleme nicht bewusst sind oder bewusst sein wollen, wird es wohl notwendig sein, durch weitere Tierversuche offensichtlich 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 somatische Kerne ungeeignet sind, um gezielt Organismen ohne bedrohliche Mutationen zu klonen. Einige der Gründe werden weiter unten dargestellt.

Der übliche Kerntransfer erfordert die Verwendung von natürlichen Oocyten. Da sie äußerst aufwendig zu gewinnen sind und beim Menschen eine unangenehme Prozedur erforderlich machen, würde man sie gerne ersetzen. Es scheint aber gangbar, Oocyten in Kultur aus ESZ zu erzeugen, was uns kürzlich bei der Maus gelungen ist [73]. Mit Hilfe solcher Oocyten wird man vielleicht in der Lage sein, nach Kerntransfer ESZ-Linien zu generieren. Ein reproduktives Klonen dürfte aber auf diesem Weg noch weniger möglich sein als aus regulären Eizellen.

Umprogrammierung

Um aber auf dem eben skizzierten Weg ESZ-Linien erzeugen zu können, wird es nötig sein, den transferierten Kern umzuprogrammieren. Hintergrund ist, dass im Normalfall nach Befruchtung der Oocyte das genetische Programm von „vorne beginnt“.

Entsprechend muss man nach dem Kerntransfer in Oocyten das genetische Programm auf einen frühen Startpunkt zurückstellen. Da man aber nur ESZ für die Therapie benötigt, muss man nicht ganz an den Anfang der Embryonalentwicklung zurück. So wird man sicherlich versuchen,

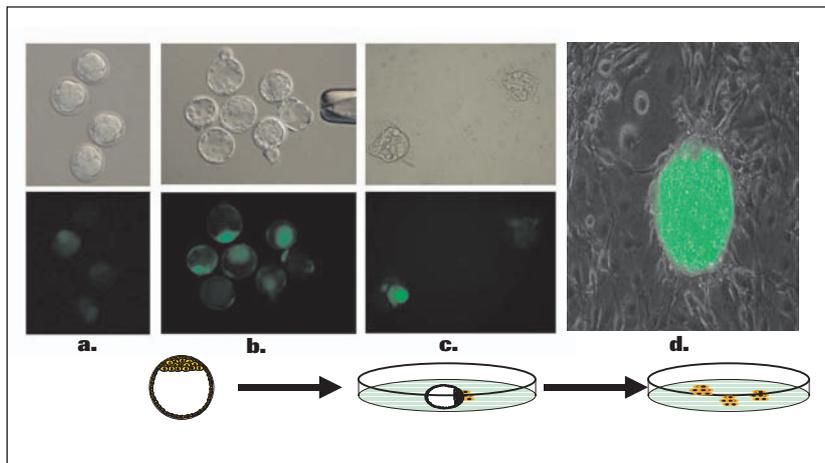


Abb. 6. Oct4, GFP und die Herstellung Embryonaler Stammzellen (ESZ). – **a.** Vier Morula-Stadien in Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahme, die nach Kerntransfer von Kernen einer transgenen Maus mit gekoppeltem *Oct4*- und GFP-Gen entstanden sind. Drei davon sind grün, ein Hinweis, dass in ihnen das lebenswichtige *Oct4*-Gen angeschaltet ist. – **b.** Sieben Blastocysten, deren Intensität der grünen Farbe stark variiert. – **c.** Zwei Blastocysten, nachdem sie sich in der Kulturschale angeheftet haben. Der linke Auswuchs ist intensiv grün, der rechte, der später verkümmerte, nur schwach grün. – **d.** ESZ, die aus der linken Blastocyste in c gewonnen wurde. Die nicht-grünen Zellen sind Helferzellen, auf denen ESZ wachsen. Nur solche Blastocysten, die eine Gruppe kräftig grüner Zellen haben, können ESZ bilden. [Photos M. Boiani, H. Schöler]

somatische Zellen direkt in ESZ-Linien umzuwandeln (Abb. 7). Statt einer Oocyte kann man auch embryonale Stammzellen ohne Kern (Cytoplasten) verwenden, um einen somatischen Kern zu einem embryonalen Stammzellkern umzuprogrammieren. Experimente, in denen zwei Zellen der Maus fusioniert worden waren, haben bereits gezeigt, dass ESZ in der Lage sind, den zusätzlichen Kern so zu verändern, dass er Merkmale von natürlichen ESZ besitzt. Sollte sich zeigen, dass Cytoplasten von ESZ dazu ausreichend sind, könnte sich daraus ein sehr einfaches Verfahren zur Herstellung körpereigener ESZ entwickeln. Da man ESZ im Gegensatz zu Oocyten leicht in großen Mengen erhalten kann, könnte man so die Faktoren, die den somatischen Kern umprogrammieren, bestimmen. Das Wissen wiederum könnte die Generierung von ESZ-Linien aus somatischen Zellen erleichtern. Dabei könnten sich auch die Gene und Transgene, wie sie für die genetische Analyse nach Kerntransfer in Oocyten verwendet wurden, als hilfreich herausstellen. Da sich Cytoplasten durch

physikalische Methoden leicht isolieren lassen, wäre selbst eine biochemische Analyse der für die Umprogrammierung notwendigen Faktoren denkbar.

Probleme des Klonens

Das entwicklungsbiologische Programm wird sowohl genetisch, als auch epigenetisch kontrolliert. Unter *genetischer Kontrolle* versteht man die Gesamtheit der unmittelbar durch Gene (bzw. die von ihnen codierten Proteine) bestimmten Abläufe. Sie kann nur funktionieren, wenn die DNA-Sequenz des Genoms intakt ist. Unter *epigenetische Kontrolle* fallen alle die Entwicklung mitbestimmenden Wechselwirkungen zwischen Zellbestandteilen oder zwischen Zellen, die nur mittelbar genetisch vorgegeben sind. Epigenetisch wirksam sind insbesondere Modifikationen und Verpackungen des Genoms (äußerlich erkennbar am Chromatin, den färbaren Bestandteilen im Kern, bestehend aus der DNA, Histonen und anderen, Nicht-Histon-Proteinen).

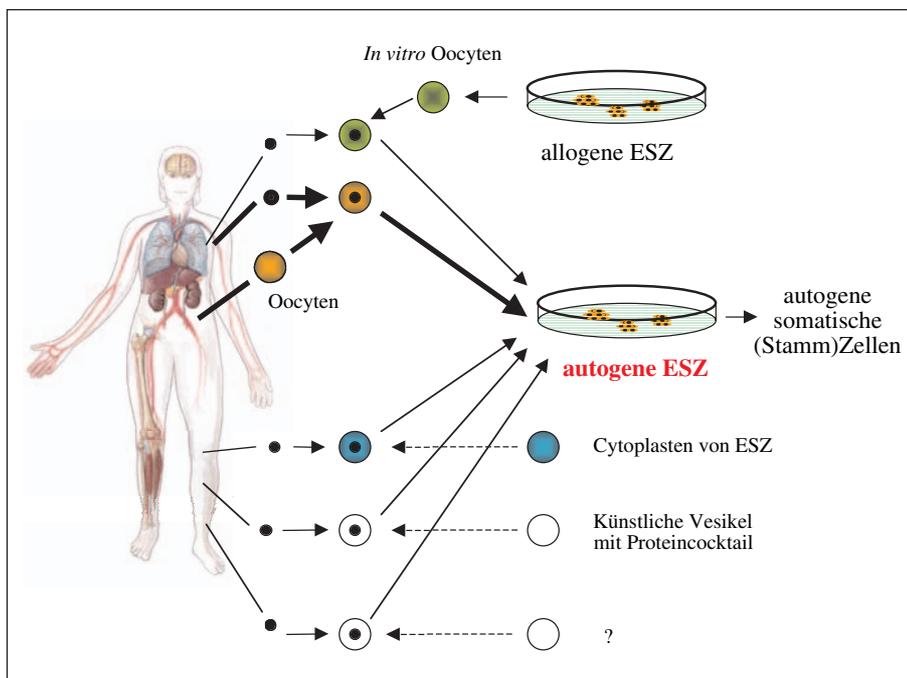


Abb. 7. Herstellung autogener Embryonaler Stammzellen (ESZ). **Links:** Patient, dessen Zellkerne nach Kultivierung wieder in den Körper zurückgeführt werden sollen. **Rechts:** Denkbare Vorgehensweisen. In den zwei oberen Beispielen werden Oocyten verwendet, die entkernt und dann mit dem eigenen Kern versehen werden. Grün: Ableitung von Oocyten aus allogenen ESZ; orange: Verwendung eigener Oocyten. Eine Vermeidung von Oocyten wäre dann denkbar, wenn man allogene ESZ entkernt und die Cytoplasten mit den körpereigenen Zellkernen kombiniert (blau). Eine Fortführung dieser Idee ist die Kombination verschiedener ausgestatteter künstlicher Vesikel (violett, grau) mit den Zellkernen. Alle Vorgehensweisen setzen voraus, dass man die Komponenten kennt, die eine Rückführung des Kerns in einen embryonalähnlichen Zustand ermöglichen.

Die epigenetische Kontrolle funktioniert nur, wenn das Chromatin keine zu großen Mängel aufweist. Sind Modifikation oder Verpackung des Genoms gestört, können sich Tumore bilden. Nur wenn man solche Abläufe und damit deren Risiken versteht, kann man therapeutisches Klonen und dessen klinische Anwendung, die Stammzelltherapie, verantwortungsvoll in Angriff nehmen.

• **Genetische Probleme**

Mutationen

Wie jeder langlebige, vielzellige Organismus unterliegt auch der menschliche Körper mutagenen äußeren Faktoren, deren Wirkungen sich im Laufe des Lebens addieren: Hierzu zählen UV- und ionisierende Hintergrundstrahlung, chemische Mutagene wie Aflatoxin, Benzen und N-Nitrosamine sowie die Infektion durch Krebs erzeugende Viren. Neben diesen Gefahren von außen gibt es eine Vielzahl von Gefahren von innen. 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. 8) [62]. Man nimmt an, dass sich täglich in menschlichen Zellen eine Vielzahl von DNA-Prämutationen bilden. Von *Prämutationen* spricht man, wenn eine Chance besteht, dass die Veränderungen repariert werden. Da 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. Lebensbedrohliche Veränderungen des Genoms finden schon in frühen Entwicklungsstadien statt. So konnte man durch hochempfindliche Methoden im Blut von Säuglingen einen Austausch von Chromosomenstücken nachweisen, die zu Tumoren führen können [63]. DNA-Mutationen finden in jedem Menschen von der Geburt an statt. Prämutationen werden durch präzise und hocheffiziente Reparatursysteme weitgehend rückgängig gemacht. Es besteht daher eine recht hohe Wahr-

rscheinlichkeit, ein Alter von etwa 45 Jahren ohne Tumore zu erreichen [28]). Danach ist gleichsam das Ende der Garantiezeit erreicht („End of Warranty“) und sowohl die Mutationshäufigkeit als auch die Wahrscheinlichkeit, Tumore zu entwickeln, steigen rapide an (Abb. 9).

Die schädlichen Folgen von Mutationen finden in 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 sind.

– *Veränderungen durch Punktmutationen*

DNA-Punktmutationen lassen sich im Wesentlichen auf drei Hauptursachen zurückführen: labile N-Glykosyl-Bindungen, Desaminierung methylierter DNA und oxidativer Stress (Übersicht: [64]). Ferner können Mutationen durch Rekombination sich wiederholender genomischer Segmente entstehen. Transitionen von Cytosin (C) nach Thymin (T) verursachen etwa ein Drittel aller Punktmutationen in genetisch vererbten menschlichen Erkrankungen [65]. Diese recht komplexen Probleme werden im Kasten 2 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 Gene weitaus schneller repariert werden als inaktive Gene [66]. Daraus ergibt sich, dass Mutationen in inaktiven Genen häufiger auftreten als in aktiven Genen, was kein Problem ist, wenn ein inaktives Gen für den Rest des Lebens inaktiv bleibt. 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 (Abb. 10).

Das Klonen hebt den inaktiven Zustand der Zell-spezifischen Gene auf. Wenn aus dem Kern einer Muskelzelle ein Organismus generiert werden soll, werden plötzlich die Gehirnspezifischen Gene wieder benötigt. Weisen diese Gene

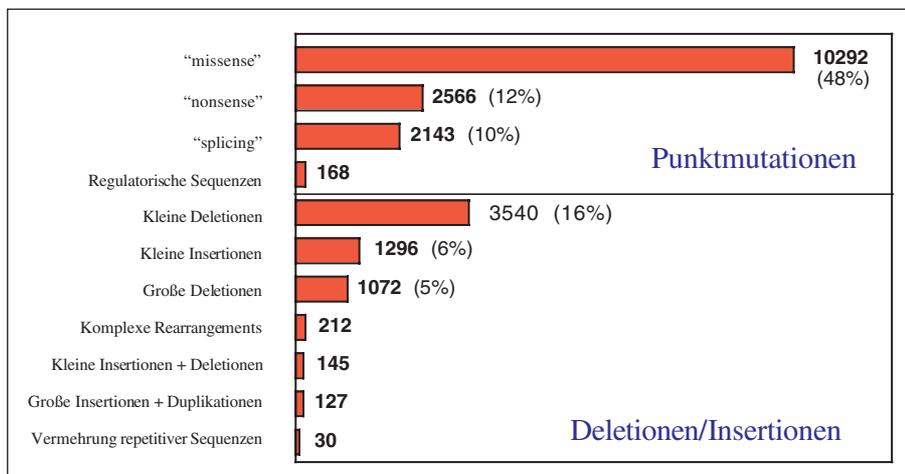


Abb. 8. Krankheitserzeugende Mutationen im Genom des Menschen. Spektrum der verschiedenen Mutationen, aufgeteilt nach Art und Häufigkeit. Zum Zeitpunkt der Analyse waren insgesamt 21 591 Mutationen in 1039 Genen bekannt. Nach [62]

KASTEN 2:**Von der Prämutation zur Punktmutation.**

Von *Prämutationen* spricht man, wenn eine Chance besteht, dass die Veränderungen repariert werden, bevor sie sich als Mutationen manifestieren (vgl. Tab. 2). Spontan auftretende Mutationen dürften zu einem großen Teil auf eine fehlerhafte DNA-Reparatur zurückzuführen sein. Zusammen mit fehlerhaftem Ablesen während der Replikation können sie entscheidend zur Ausbildung von Tumoren beitragen.

Schädigungsquellen und Reparaturmöglichkeiten

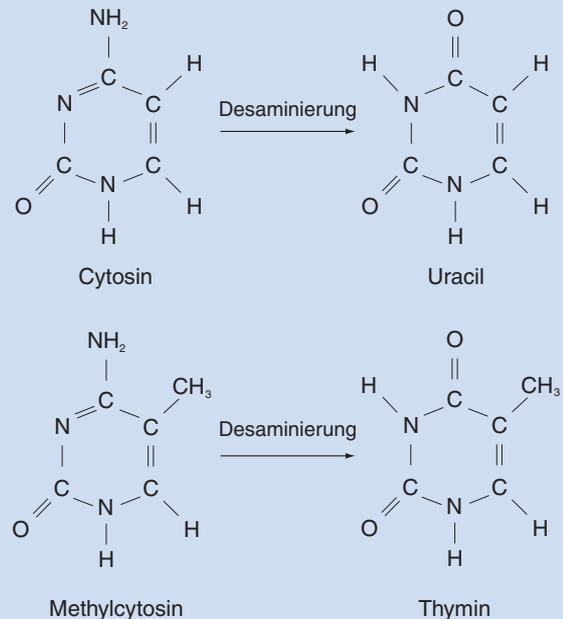
Labile N-Glykosyl-Bindung: Alle biologischen Makromoleküle sind instabil und zerfallen mit der Zeit. Nucleinsäuren (DNA und RNA) zerfallen in Lösung, wobei RNA besonders instabil ist. Durch die Gegenwart einer Hydroxylgruppe in der 2'-Position von Ribose ist deren Phosphodiesterbindung besonders empfindlich 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 hydrierter 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 Umwandlung von Cytosin in Uracil bei neutralem pH wird durch direkte Desaminierung durch Hydrolyse verursacht. 5-Methylcytosin verliert die Aminogruppe etwa 3 bis 4mal schneller als Cytosin (C, vgl. Abb.), so dass die Desaminierung von 5-Methylcytosin eine wichtige Mutationsquelle darstellt. Cytosin ist, wenn es im DNA-Strang in unmittelbarer 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 Leukocyten und Monocyten. Auch Tumore können erhebliche Mengen an H_2O_2 bilden. Dieses sehr wirksame Oxidationsmittel kann trotz endogener Katalase die DNA schädigen.



Läsion/Prämutation	Art wie Läsion bzw. Modifikation gebildet wird	Zahl der Modifikationen bzw. Prämutationen pro Zelle 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	1000	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	4000	3000
O ⁶ -Methyl-Guanin	Durch endogene Nitrosamine	200	1
Ohne Base	Hydrolyse	9000	5

Tab. 2. Übersicht endogener DNA-Läsionen in menschlichen Zellen und der möglichen Entstehungsarten von Punktmutationen. Näheres in [64]

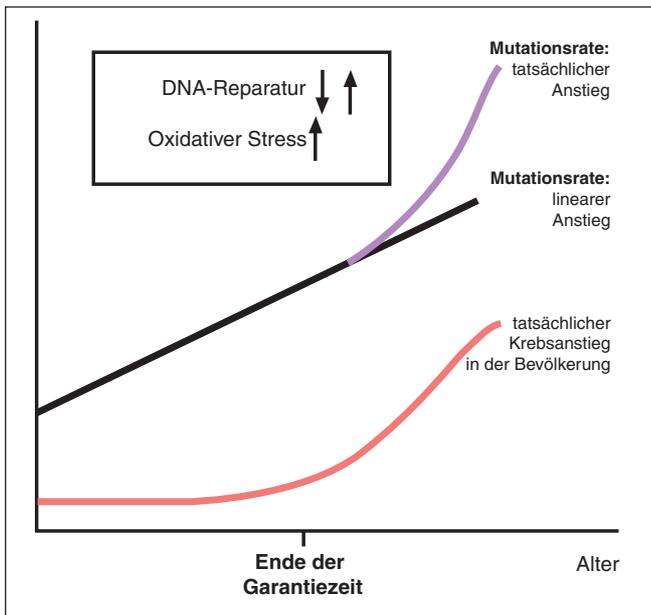


Abb. 9. Abhängigkeit von Mutationsrate und Krebs mit zunehmendem Alter. Wenn mehrere Mutationen stattgefunden haben, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Krebserkrankungen. Nach [28]

Mutationen auf, so kann das zu Komplikationen in den sich bildenden Gehirnzellen verursachen. 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 das Risiko leicht ausmalen, wenn alle stummen Gene einer Muskelzelle in der Gesamtheit eines Körpers aktiv werden.

Solche Mutationen müssen nicht unbedingt sofort Probleme bereiten. Allerdings entsteht Krebs zum Beispiel allein

schon durch eine schrittweise Ansammlung genetischer Mutationen [67]. In menschlichen Zellen werden vier bis sechs Mutationen benötigt, um eine frühe Tumorzelle (neoplastische Zelle) zu erzeugen. Da nach dem Klonen jede Zelle des Körpers dieselben Mutationen trägt, fangen alle Zellen gleichsam bei einem höheren Grundzustand an. Es ist nicht vorhersehbar, ob noch vier, drei, zwei Mutationen oder nur noch eine weitere Mutation benötigt wird, um das „Fass zum Überlaufen“ zu bringen und eine neoplastische Zelle zu bilden.

– *Mutationen durch Rekombination repetitiver genomischer Segmente*

Monogene Erkrankungen beruhen zumeist auf spezifischen Mutationen innerhalb eines Gens. Solche Mutationen lassen sich oft auf Fehler während der DNA-Replikation zurückführen. Darüber hinaus gibt es Erkrankungen, die durch Rekombination genomischer Regionen verursacht werden. Ausgangspunkt sind zunächst 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 bis 400 000 Basenpaare lang, wobei mindestens 97% der Sequenz identisch ist und somit ein geeignetes Substrat für eine homologe Rekombination darstellt.

– *Mutationen infolge von Alterung*

Es gibt verschiedene Theorien des menschlichen Alterns, die sich nicht gegenseitig ausschließen [68]. Eine seit langem diskutierte Theorie besagt, dass mit zunehmendem Alter die

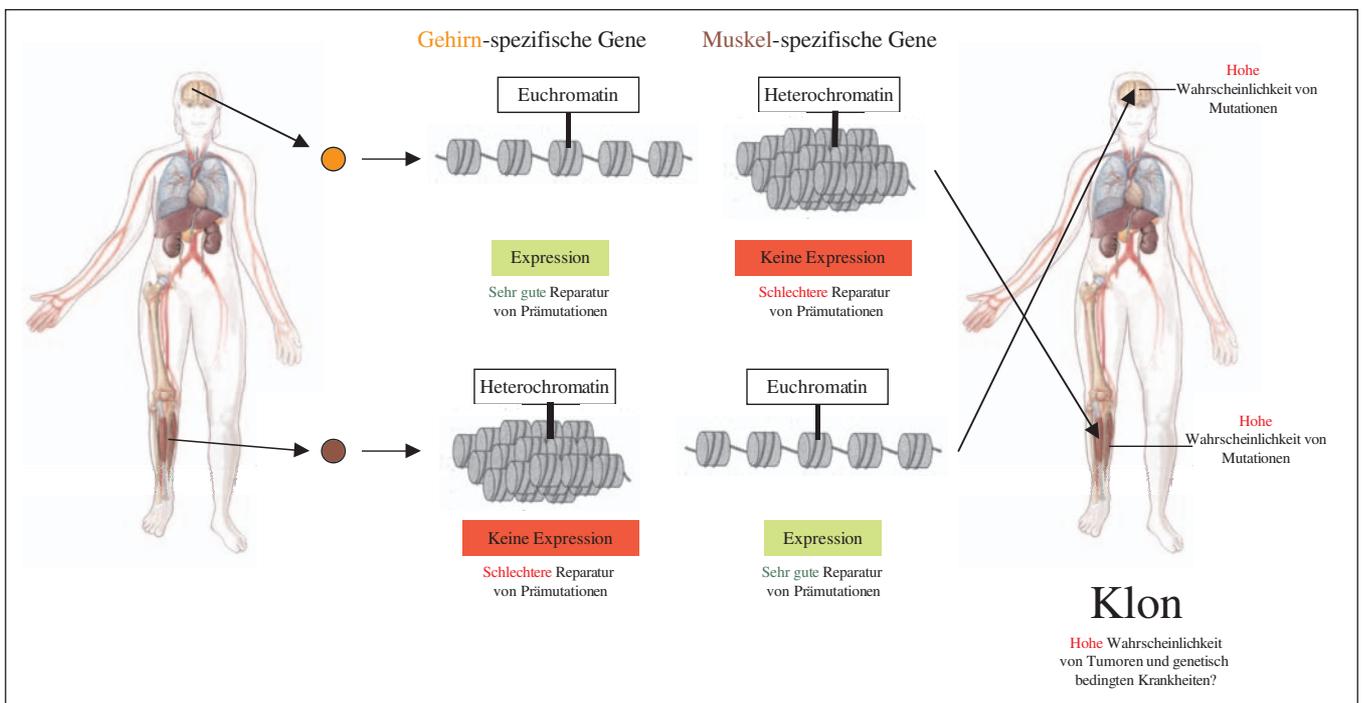


Abb. 10. Die Konsequenzen aus der Kopplung von Transkription und DNA-Reparatur.

DNA-Reparatur ab- und damit die DNA-Schädigung zunimmt [69]. Substanzen, die DNA schädigen – wie 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, die DNA-Schädigungen erkennen und/oder an DNA-Reparaturen beteiligt sind. Ferner wird ein Zusammenhang zwischen Verkürzung der Chromosomen-Enden (Telomere) und Altern gesehen. Da die Telomere bei jeder Zellteilung kürzer werden, spricht man geradezu von einer Lebensuhr. Eine dritte Theorie stellt einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Metabolismus und Altern her, wofür es zahlreiche, an Tiermodellen gewonnene Befunde gibt. Mutationen, die den Glucose-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 drei Prozessen dürfte das Protein p53 eine Schlüsselrolle spielen. Es scheint einerseits entstehende Tumore zu unterdrücken, andererseits die Reparatur und Regeneration normaler Zellen zu beschränken [69]. 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.

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 Oocyten hoher Genomqualität zu generieren. Mögliche Gründe hierfür sollen an dieser Stelle nicht erörtert werden, denn selbst Zellen hoher Genomqualität sind zum Klonen gänzlich ungeeignet, weil es gravierende epigenetische Probleme gibt.

• **Epigenetische Probleme**

Keimzellen und Imprinting

Die Keimbahn verbindet die Organismen einer Spezies und ist daher potentiell unsterblich. In jeder Generation werden Oocyten und Spermien gebildet, deren Vereinigung den Ausgangspunkt eines neuen Organismus darstellt. In einigen Vertebraten ist die Oocyte auch ohne Spermium in der Lage, einen Organismus zu bilden. So wurden ausgewachsene parthenogenetische (durch „Jungfernzeugung“ entstandene) Reptilien, Vögel, Fische und Amphibien beschrieben. Diese entstehen aus unbefruchteten Oocyten, so dass nur das weibliche Genom zur Entwicklung beiträgt (vgl. NR 7/2002, S. 349). Auch bei Säugern (u. a. Maus, Kaninchen, Schwein) können sich gelegentlich auf parthenogenetischem Weg Embryonen bilden, die sich allerdings höchsten bis zu einem Fötus entwickeln. Experimentell ließen sich bei Säugern Embryonen erzeugen, die rein männlichen (androgenoti-

schen) oder rein weiblichen (gynogenotischen) Ursprungs sind. Hierzu brachte man durch Transplantation entweder zwei weibliche (maternale) oder zwei männliche (paternale) Vorkerne in einer zuvor entkernten Oocyte zusammen. Die Embryonalentwicklung hängt dann nur von der Erbinformation eines Geschlechtes ab. In allen drei Fällen sterben die Embryonen, weil das weibliche und das männliche Genom zwar dieselben Gene besitzen, die Aufgabenverteilung mancher Gene beider Elternteile aber 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 [63]. Vermutlich verursacht die genomische Markierung die unterschiedliche Expression von Genen, so dass bestimmte Gene nur vom mütterlichen, andere nur vom väterlichen Genom abgelesen werden. Ein Charakteristikum der genomischen Markierung ist die unterschiedliche Methylierung der maternalen und paternalen Gene. Bei der Verschmelzung von Eizelle und Spermium bei der Befruchtung werden die geschlechtsspezifischen Methylierungsmuster vereint und später von Zellteilung zu Zellteilung weitergegeben.

Für das reproduktive Klonen hat dies erhebliche Relevanz: Würde man nämlich Kerne von Keimzellen oder deren Vorläufern einsetzen, so hätte man letztlich nur das Markierungsmuster des maternalen oder paternalen Genoms. Die ganz frühen Keimzellen, die Urkeimzellen, die während der Entwicklung eines Organismus entstehen, haben zunächst wie alle anderen Zellen auch eine maternale und ein paternale Markierung. Während sich die Keimzellen entwickeln, setzen sie entsprechend ihrem eigenen Geschlecht die Markierung neu, 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 erwähnten androgenetischen, gynogenetischen oder parthenogenetischen Embryonen von Säugtieren [7].

Ein weiteres Problem ergibt 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. Wird jedoch ein Kern zum Klonen eingesetzt, kann ein fehlerhaftes Ablesen während der früheren Entwicklung sehr problematisch werden.

Reprogrammierung und Chromatin

Neben der Methylierung muss auch noch die Verpackung des Genoms verändert werden, wenn das Klonen mittels somatischer Zellen 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 dem Prozess des Klonens zählen zurzeit zu den interessantesten Themen der molekularen Biologie [70]. Aller-

dings ist noch unbekannt, wie die alten Proteine und Modifikationen durch neue ersetzt werden.

Adulte Stammzellkerne und Klonen

Sollte man Kerne von adulten Stammzellen verwenden, um ESZ nach Kerntransfer in Oocyten zu generieren? Sind adulte Stammzellkerne sogar geeignet, Organismen zu klonieren? Auch wenn man noch nicht dieselbe Informationsfülle wie für differenzierte somatische Zellen hat, gibt es keinen Grund anzunehmen, dass sie nicht ebenso Mutationen und epigenetische Probleme haben wie somatische Zellen. Tatsächlich vermehren sich die Hinweise, dass adulte Stammzellen einem Alterungsprozess unterliegen [27].

Selbst die Kerne der ESZ eignen sich nicht zum Klonen von Organismen. Obwohl sie ein sehr frühes Entwicklungsstadium repräsentieren und daher das epigenetische Programm dem der befruchteten Eizelle sehr ähnlich sein sollte, werden viele Gene in Organen von geklonten Mäusen falsch abgelesen [71]. Gleichgültig, ob der Kern einer Körperzelle oder einer ESZ zum Klonen verwendet wird, wird etwa jedes 25. Gen falsch abgelesen. 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 abgelesen werden. Diese falsche Expression in den Organen geklonter Mäuse liegt wahrscheinlich daran, dass am Anfang der Embryonalentwicklung wichtige regulatorische Gene, wie das *Oct4*-Gen, nicht immer richtig umgepackt wurden und deshalb nicht korrekt abgelesen werden konnten [55]. Je nachdem, welche Gene falsch abgelesen wurden, sterben die Klone entweder als Embryonen oder Föten, oder sie reichen dieses Problem in seltenen Fällen (eben den 3–5% Überlebenden) während der Entwicklung von Zelle zu Zelle weiter (Abb. 11). Dass solche, anfangs nicht offensichtlichen Änderungen dramatische Spätfolgen haben können, zeigen die fettleibigen Mäuse, die oft durch den Prozess des Klonens entstehen [72]. Bis etwa zur 10. Woche nach der Geburt haben solche Mausklone ein normales Körpergewicht, danach jedoch erhöht sich ihr Gewicht drastisch. Die Paarung zweier fettleibiger Mäuse führte zu einem interessanten Ergebnis: Obwohl die Eltern sehr schwer waren, waren die Nachkommen nicht etwa noch fettleibiger, sondern schlank, und zwar so schlank wie normale Mäuse. Dies zeigt eindeutig, dass die Neuverpackung des Genoms während des Klonens fehlerhaft gewesen ist. Erst wenn das Genom „die Gelegenheit bekommt“, richtig verpackt und modifiziert zu werden, kann das normale Entwicklungsprogramm wieder ablaufen. Dazu müssen Gene, deren fehlerhaftes Ablesen zur Fettleibigkeit führte, wieder richtig verpackt werden. Das geschieht während der Gametogenese, also der Bildung von Spermien und Eizellen. Somit war es im genannten Beispiel erst in der folgenden Generation möglich, alle Gene wieder richtig abzulesen, so dass die Mäuse wieder ihr normales Körpergewicht hatten. Allerdings bleibt abzuwarten, ob die fettleibigen Mäuse oder die der nächsten Generation nicht später im Leben Tumore oder andere Probleme entwickeln.

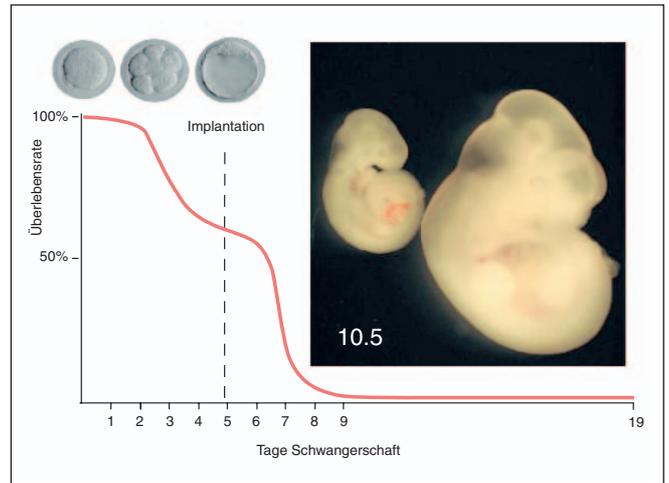


Abb. 11. Reproduktive Klonierung bei Mäusen: Überlebensrate von Embryonen und Föten während der Schwangerschaft. Kurz nach der Implantation haben nur noch wenige Embryonen die Fähigkeit, sich weiterzuentwickeln. Selbst 10 Tage nach der Befruchtung, als die meisten Föten schon abgestorben waren, zeigen sich an den wenigen Überlebenden schwer wiegende Probleme. Das große Bild zeigt zwei 10,5 Tage alte Föten, der linke ist durch Klonen, der rechte auf dem Wege einer normalen Befruchtung entstanden.

Die wichtigste Botschaft der Versuche an Tieren ist, dass Probleme des Klonens weder vorhergesehen werden können, noch unbedingt sofort sichtbar sind. Man darf sich daher nicht von niedlichen Säuglingsgesichtern der Klonbabys täuschen lassen, die vielleicht in Zukunft der Weltöffentlichkeit präsentiert werden. In diesen erbarmungswürdigen Kreaturen schlummern mit Sicherheit Probleme. Ob jedes zehnte, fünfundzwanzigste oder hundertste Gen falsch abgelesen wird, ist dabei noch nicht einmal wichtig. Bei 66 000 Genen, die man im menschlichen Genom vermutet, sind das in jedem Fall sehr viele Gene. Für die Zahl der Mutationen gibt es noch keine Statistiken. Aber anhand der vorliegenden Daten (z. B. Abb. 8) kann man vermuten, dass die Zahlen auch hoch sind. Wie groß die Probleme sein werden, die sich daraus ergeben, wird sich erst in ihrem weiteren Leben zeigen.

Schlussbetrachtung

Zwei Dinge erfüllen das Gemüt mit immer neuer und zunehmender Bewunderung und Ehrfurcht, je öfter und anhaltender sich das Nachdenken damit beschäftigt: Der bestirnte Himmel über mir und das moralische Gesetz in mir.

Immanuel Kant, Königsberg (22. April 1724 – 12. Februar 1804.)

Ein Ziel meiner Darlegung ist, Argumente für die Forschung an embryonalen und adulten Stammzellen zusammenzutragen, die ein großes Potential für die medizinische Forschung haben. Außerordentlich wichtig erscheint mir, auch die Möglichkeiten des Kerntransfers in Oocyten oder Oocyten-ähnlichen Zellen für das therapeutische Klonen zu entwickeln. Hierfür ist es nicht notwendig, den „Rubikon“ zu überschreiten, indem man Menschen kloniert, sondern man

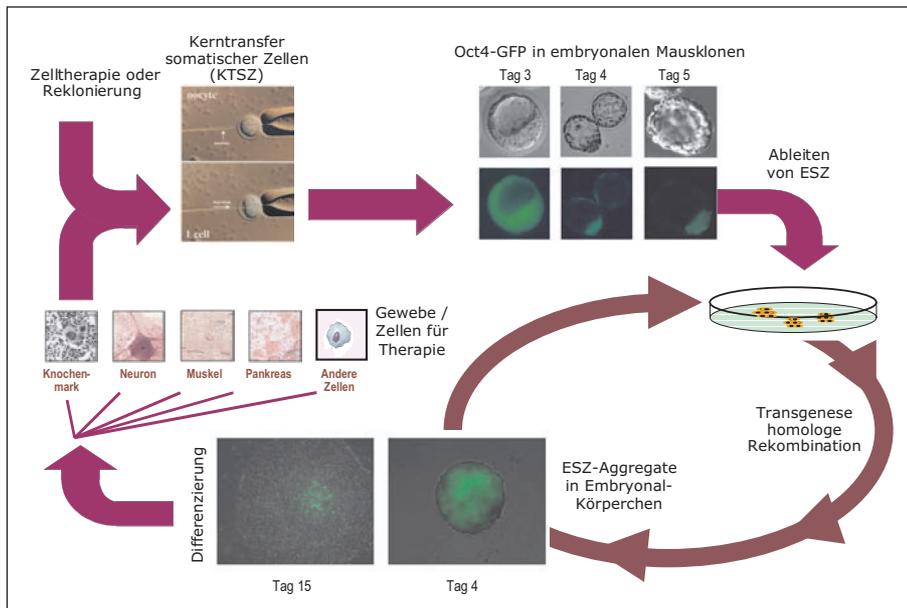


Abb. 12. Möglichkeiten der *in vitro*-Stammzell-Kultivierung. Die Hoffnung ist, dass man eines Tages den gesamten therapeutischen Ansatz in Kultur durchführen kann. Momentan dient die Maus als Modell zur Entwicklung eines solchen Systems. Embryonalkörperchen (*Embryoid Bodies*) sind Aggregate von ESZ, die Merkmale früher Embryonen aufweisen. Nach [41]

muss auf die Kraft der Wissenschaft bauen. So belegen eine ganze Reihe von Erkenntnissen, dass es auch aus wissenschaftlicher Sicht unvermeidbar ist, Menschen zu klonen. Dies wäre nur möglich, wenn man tote Föten und Totgeburten in Kauf nimmt. Vielleicht trägt dieses Wissen dazu bei, dass Protagonisten des Klonens von Menschen einsehen, dass sie doppelt Leben aufs Spiel setzen: Das Leben, das sie schaffen wollen und das Leben, das nicht kuriert wird, weil ihr Bestreben Menschen zu klonen, gleichzeitig das Bestreben hemmt, sinnvolle Therapien zu entwickeln. In diesem Sinne hoffe ich, dass man zukünftig in Deutschland, ohne ständig an „Slippery Slopes“ zu denken, das Potential von ESZ-Linien erforscht, die durch autologes Klonen (d. h. Kerntransfer körpereigener Zellen in Oocyten, um Zellen zu erhalten, die man in den eigenen Körper zurückführen möchte) hergestellt wurden. Vielleicht lassen sich ja gelegentlich Türen dadurch öffnen, dass man andere kraftvoll zuschlägt. Die Zukunft wird mit Sicherheit zeigen, welches medizinische Potential adulte und embryonale Stammzellen besitzen (Abb. 12), gleichgültig, ob man sich in Deutschland an deren Erforschung beteiligt oder nicht. Aber es wäre für das Ansehen Deutschlands im Ausland sicherlich nicht förderlich, wenn – bei einer auf Ablehnung beruhenden Nichtbeteiligung der deutschen Forschung – die entsprechenden Therapien, die in anderen Ländern entwickelt wurden, dann später in Deutschland zur Anwendung kämen.

Prof. Dr. **Hans Robert Schöler** (geb. 1953 in Toronto/Kanada). Studium der Biologie in Heidelberg, Dissertation am Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg bei Prof. Dr. Peter Gruss (1985), 1986-1988 Leiter

einer Forschungsgruppe bei Boehringer Mannheim in Tutzing, 1988–1991 Wissenschaftlicher Angestellter am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, 1991–1999 Leiter einer Forschungsgruppe am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL), 1994 Habilitation und *Venia legendi* für Molekulare Biologie. Seit 1999 Director of The Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research der „Ivy League“ University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine, seit 2000 The Marion Dilley and David George Jones Chair in Reproduction Medicine, seit 1999 Professor für Reproductive Physiology. Forschungsschwerpunkte: Biologie von Embryonalen Stammzellen und Keimzellen; transkriptionelle Regulation von Genen in der Keimbahn von Säugern, molekulare Mechanismen der Regulation von Genen. *University of Pennsylvania, Center for Animal Transgenesis and Germ Cell Research*
Germline Development Group, New Bolton Center, 382 W. Street Rd., Kennett Square, PA 19348, USA.
E-Mail: scholer@vet.upenn.edu

Nach einem Vortrag, der am 24. September 2002 auf der 122. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturwissenschaftler und Ärzte (GDNÄ) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gehalten wurde und im Versammlungsband *An den Grenzen der Forschung – Kosmos – Erde – Leben* im S. Hirzel-Verlag erschienen ist.

Das Literaturverzeichnis kann in der Redaktion angefordert werden und wird elektronisch oder per Post gerne zugesandt.