

Autoren der Empfehlung:

Henning M. Beier
Boris Fehse
Bärbel Friedrich
Magdalena Götz
Ingo Hansmann
Ferdinand Hucho
Kristian Köchy
Bernd Müller-Röber
Hans-Jörg Rheinberger
Jens Reich
Hans-Hilger Ropers
Hans R. Schöler
Bettina Schöne-Seifert
Karl Sperling
Klaus Tanner
Jochen Taupitz
Anna M. Wobus

**Berlin-Brandenburgische
Akademie der Wissenschaften**

**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina
Nationale Akademie der Wissenschaften**

NEUE WEGE DER STAMMZELLFORSCHUNG

Reprogrammierung von differenzierten Körperzellen



Oktober 2009



Leopoldina
Nationale Akademie
der Wissenschaften



berlin-brandenburgische
AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN

Berlin-Brandenburgische
Akademie der Wissenschaften

Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina
Nationale Akademie der Wissenschaften

NEUE WEGE DER STAMMZELLFORSCHUNG
REPROGRAMMIERUNG VON DIFFERENZIIERTEN KÖRPERZELLEN

NEUE WEGE DER
STAMMZELLFORSCHUNG:
REPROGRAMMIERUNG VON
DIFFERENZIIERTEN KÖRPERZELLEN



Leopoldina
Nationale Akademie
der Wissenschaften



berlin-brandenburgische
AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN

Herausgeber: Der Präsident der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften
Redaktion: Gisela Lerch
Grafik: angenehme-gestaltung.de / C. Janitschek, Th. Probst
Druck: Oktoberdruck

© Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, Berlin 2009,
Jägerstraße 22–23, 10117 Berlin, www.bbaw.de
Nachdruck, auch auszugsweise, nur mit ausdrücklicher Genehmigung
des Herausgebers gestattet.
ISBN: 3-939818-15-1
978-3-939818-15-1

Vorwort

Die Stammzellforschung hat durch den Nachweis, dass aus differenzierten Körperzellen durch Reprogrammierung pluripotente Stammzellen entstehen können, einen enormen Durchbruch erzielt. Dieser Durchbruch, der aus wissenschaftlicher Sicht und therapeutischer Perspektive von großem Interesse ist, hat zugleich auch deutlich differenzierend und entlastend auf die ethische Debatte um humane embryonale Stammzellen gewirkt. Die inzwischen weltweit und in Deutschland durchgeführten Arbeiten zur Reprogrammierung wären ohne Erkenntnisse der embryonalen Stammzellforschung nicht möglich gewesen. Sie machen einmal mehr deutlich, dass Forschungsfreiheit ein unschätzbarer Wert ist und zu außergewöhnlichen und unerwartet wertvollen Befunden führen kann.

Dies hat die an der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften etablierte interdisziplinäre Arbeitsgruppe „*Gentechnologiebericht*“ dazu veranlasst, sich dieses Themas anzunehmen, um gemeinsam mit der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, der Nationalen Akademie der Wissenschaften, die vorliegende Stellungnahme zu erarbeiten und zu veröffentlichen.

Beide Akademien handeln dabei sowohl aus ihrer Verantwortung für die Wissenschaft, als auch aus ihrer Verantwortung für die Gesellschafts- und Politikberatung heraus, der Öffentlichkeit gesicherte wissenschaftliche Erkenntnisse zur Verfügung zu stellen und damit auch die politischen Entscheidungsträger dabei zu unterstützen, wissenschaftsbasierte Entscheidungen zu treffen und gegebenenfalls daraus entsprechende Regelungen abzuleiten.

Die Reprogrammierung von differenzierten Körperzellen in pluripotente Stammzellen eröffnet viele Möglichkeiten, biologische Prozesse nicht nur besser zu verstehen, sondern daraus zukünftig auch diagnostischen und therapeutischen Nutzen ziehen zu können.

Die gemeinsame Arbeit von Wissenschaftlern der interdisziplinären Arbeitsgruppe „*Gentechnologiebericht*“ der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften und von Kollegen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina ist ein gelungenes Beispiel für die effiziente Zusammenarbeit zweier Akademien innerhalb der neugegründeten Nationalen Akademie auf dem Gebiet der Politikberatung.

Prof. Dr. Dr. h. c. Volker ter Meulen

Prof. Dr. Dr. h. c. Günter Stock

Neue Wege der Stammzellforschung: Reprogrammierung von differenzierten Körperzellen

Zusammenfassung

Im Rahmen der Diskussion um die Einfuhr von Stammzelllinien, die aus „überzähligen“ *in vitro* fertilisierten (IVF) Embryonen¹ abgeleitet wurden, haben sich zahlreiche wissenschaftliche und öffentliche Institutionen sowie Einzelpersonen zum Status des menschlichen Embryos geäußert, also zur Frage, wann menschliches Leben beginnt, dem personale Würde und uneingeschränkte Schutzwürdigkeit zukommen. Dabei zeigte sich, dass hinsichtlich der Schutzrechte ein Konsens kaum möglich ist, da eine Normensetzung nicht allein aus den biologischen Fakten folgt. Werte und Normen entwickeln sich im Kontext gesellschaftlicher Prozesse und soziokultureller Traditionen. Dabei hat die negative historische Erfahrung in Deutschland das Misstrauen gegenüber der humangenetischen und biologisch-medizinischen Forschung noch verstärkt. In dieser Stellungnahme sollen die wissenschaftlichen Grundlagen einer neuen experimentellen Vorgehensweise zur Gewinnung pluripotenter Stammzellen aus Körperzellen, die sich in die verschiedensten Gewebearten zu differenzieren vermögen, erläutert und die sich daraus ergebenden Konsequenzen diskutiert werden. Diese neue Methode basiert nicht auf Embryonen zur Gewinnung von so genannten embryonalen Stammzellen, sondern sie bedient sich adulter Körperzellen, zum Beispiel Fibroblasten, die von Hautbiopsien stammen und leicht von jedweder Person gewonnen werden können. Erstmals ist es durch besondere experimentelle Verfahren möglich geworden, die Entwicklungspotenz von bereits ausdifferenzierten spezialisierten Zellen wieder in ein Stadium zurückzuführen, das dem embryonalen vergleichbar ist. Es gilt also zwischen der natürlich erworbenen Pluripotenz embryonaler Stammzellen und der experimentell induzierten Pluripotenz adulter Körperzellen zu unterscheiden. Beide Zelltypen sind nicht Gegenstand des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) von 1990, allerdings fallen Forschungsarbeiten mit humanen embryonalen Stammzellen unter die Regelungen des Stammzellgesetzes (2002, 2008).

Die Fähigkeit zur Reprogrammierung spezialisierter Körperzellen in so genannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) hat zu einem Paradigmenwechsel in der Stammzellforschung geführt mit folgenden Auswirkungen auf die medizinische Forschung und Therapie: Neue Möglichkeiten für die Erforschung der Entstehungsmechanismen genetisch bedingter Krankheiten werden eröffnet.

1 Der Begriff „Embryo“ wird hier, wie es im internationalen Schrifttum üblich ist, für die ersten Entwicklungsstadien bis hin zum Abschluss der Organogenese nach dem 2. Schwangerschaftsmonat verwandt. Danach spricht man von dem Fötus.

Erstmals ergeben sich realistische Chancen zur Gewinnung patienteneigener Stammzellen für Zelltherapien. Für pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen werden iPS-Zellen zukünftig in ausreichendem Umfang zur Verfügung stehen. Schließlich können iPS-Zellen auch für eine somatische Gentherapie eingesetzt werden [siehe Übersicht in 1].

Die Herstellung von iPS-Zellen zur Gewinnung therapeutisch einsetzbarer somatischer Spenderzellen in der Zelltherapie und ihr Einsatz in der Grundlagen- und angewandten Forschung sind als solche aus ethischer Sicht nach derzeitigem Kenntnisstand unbedenklich. Für die Herstellung und Verwendung humaner iPS-Zellen werden wegen der Neuartigkeit der Verfahren folgende Empfehlungen ausgesprochen:

1. Der Einsatz von iPS-Zellen sollte neben der Grundlagenforschung auf *in vitro* Verfahren zur Gewinnung spezialisierter Zellen für die Geweberegeneration und Zelltherapie sowie auf die somatische Gentherapie begrenzt werden.
2. Die Eignung von iPS-Zellen zur Geweberegeneration ist in eingehenden präklinischen und klinischen Versuchsreihen zu testen, bevor die Therapie als akzeptierter Standard medizinischer Praxis anerkannt werden kann. In der Öffentlichkeit sollten daher zu diesem Zeitpunkt keine voreiligen Hoffnungen oder übertriebenen Erwartungen geweckt werden. Dagegen ist bereits heute der Einsatz von iPS-Zellen auf dem Gebiet der Erforschung von Krankheitsursachen, der Wirkstoffforschung, der Pharmakologie und der Toxikologie möglich.
3. Die medizinische Anwendung der aus humanen iPS-Zellen gewonnenen Spenderzellen darf nur unter Zugrundelegung strengster Qualitätskriterien durchgeführt werden. Zumindest in der Anfangsphase sollten *therapeutische* Maßnahmen am Menschen auf dafür akkreditierte/lizenzierte Kompetenzzentren beschränkt und die jeweiligen Studien durch eine zentrale Kommission genehmigt werden. Zugleich sollten die Arbeiten der Öffentlichkeit transparent zugänglich gemacht werden. Die notwendige Regulierung könnte zunächst seitens der Bundesärztekammer erfolgen, ähnlich wie die Bundesärztekammer vor Einführung des ESchG den Umgang mit Embryonen restriktiven standesrechtlichen Regelungen unterworfen hatte. Deren Einhaltung wurde in vorbildlicher Weise durch eine zentrale, interdisziplinäre Kommission überprüft, die der Öffentlichkeit gegenüber zur Rechenschaft verpflichtet war. Eine vergleichbare Kommission könnte für transparente Verhältnisse bei iPS-Zelltherapien sorgen bzw. in Kooperation mit der Zentralen Ethikkommission für Stammzellenforschung (ZES) am Robert Koch-Institut diese Arbeiten dokumentieren.
4. Es ist davon auszugehen, dass sich aus menschlichen iPS-Zellen auch funktionsfähige Keimzellen entwickeln lassen. Die Untersuchungen an Keimzellen können der Aufklärung von Störungen der Gametenentwicklung dienen und soll-

ten daher keinen Beschränkungen unterliegen, solange sie unter *in vitro*-Bedingungen (in der Kulturschale) stattfinden. Dagegen ist aus gegenwärtiger Sicht der Einsatz von aus iPS-Zellen abgeleiteten Gameten für reproduktive Zwecke nicht zu rechtfertigen.

5. Die bisherigen Arbeiten zur Reprogrammierung *adulter* Zellen basieren vorwiegend auf Untersuchungen an der Maus und an humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen). Dabei zeigte sich, dass die mit der Maus gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Daher sollte der Erforschung geeigneter iPS-Modellsysteme beim Tier hohe Priorität eingeräumt werden. Gleichzeitig bedeutet diese Beobachtung, dass eine vergleichende Forschung an hES Zellen auch zukünftig unerlässlich ist.
6. Insgesamt stellt die Stammzellforschung ein biomedizinisches Forschungsfeld mit weit reichenden Möglichkeiten für die Vorsorge, Erkennung, und Therapie von Krankheiten dar. Dieses Gebiet wird daher auch für Unternehmen, die Zell- und Gewebetransplantate entwickeln bzw. pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen im Zusammenhang mit Medikamentenentwicklung durchführen, von großer ökonomischer Relevanz sein. Daraus folgt, dass diese Forschungsrichtung in den Grundlagen- und angewandten Gesundheitswissenschaften einer verstärkten Förderung bedarf, aus der sehr wahrscheinlich ein nachhaltiger Mehrwert hervorgehen wird.

Embryonale Entwicklung als genetischer und epigenetischer Prozess

Die Entwicklung eines individuellen Menschen beginnt gemäß deutschem ESchG mit der abgeschlossenen Befruchtung der Eizelle, d. h. nach der Vereinigung der beiden elterlichen Genome in der Zygote [2, 3]. Ohne diese genetische Information kann sich kein menschlicher Organismus entwickeln. Da alle Körperzellen letztlich durch wiederholte Zellteilung (Mitose) aus der Zygote hervorgehen, erhalten sie auch sämtliche Erbanlagen in Form eines diploiden Chromosomensatzes im Zellkern. Dass sich die verschiedenen Gewebe in morphologischer und physiologischer Hinsicht unterscheiden, beruht letztlich darauf, dass vom gleichen Genom jeweils nur bestimmte Gene aktiv sind. Die entwicklungs- und gewebespezifische Regulation der Genaktivität ist daher Grundlage des Entwicklungs- und Differenzierungsgeschehens.

So selbstverständlich uns heute dieser Sachverhalt erscheint, so wurden erst Ende des 19. Jahrhunderts der Befruchtungsvorgang und die Mitose zutreffend beschrieben und erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts mit der Chromosomentheorie der Vererbung die Verknüpfung dieser zellulären Prozesse mit der Weitergabe der Erbanlagen hergestellt und damit die wissenschaftliche Grundlage zum Verständnis des Entwicklungsgeschehens geliefert. Deshalb werden ältere Quellen zur Erforschung der Entwicklungspotenz hier nicht erwähnt.

Die Zygote besitzt das Potential zur Bildung eines ganzen Organismus, man sagt, sie sei *totipotent*². Solche totipotenten Zellen finden sich bei Säugetieren bis zum Achtzellstadium der Embryogenese. Bisher gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass beim Menschen natürliche totipotente Zellen in noch späteren Entwicklungsstadien vorkommen [4]. Spätestens im Stadium der Morula („Maulbeerkeim“; etwa ab dem dritten Tag nach Befruchtung) beginnt eine räumliche Zuordnung in innen und außen liegende Zellen (Blastomeren). Diese Zellen sind *pluripotent*, d. h., die einzelnen Zellen können vielfältige Zellpopulationen, jedoch ohne Hilfe anderer Zellen keinen vollständigen Organismus bilden. Die ersten Zellen, welche sich differenzieren, sind die Trophoblastzellen (Trophektodermzellen). Sie bilden eine Epithelzellschicht, die den Embryoblasten umgibt. Die Blastozyste besteht aus dieser äußeren Zellschicht (Trophoblast), die später das extraembryonale Gewebe ausbildet, z. B. die Chorionzotten, und aus der Keimscheibe oder dem Embryoblasten, auch „Innere Zellmasse“ (ICM) genannt, aus der der eigentliche Embryo mit seinen drei Keimblättern hervorgeht. Als *multipotent* werden im Unterschied zu den Zellen der ICM z. B. die Stammzellen des hämatopoetischen Systems bezeichnet, aus denen eine Vielzahl von Zelltypen hervorgehen kann (Abb. 1). Als *oligopotent* bezeichnet man Stammzellen, die sich in nur wenige Zelltypen differenzieren können, z. B. die lymphoiden Stammzellen. *Unipotent* sind solche Zellen, die nur denselben Zelltyp zu bilden vermögen [4, 5]. Alle Stammzelltypen mit derart eingeschränktem Entwicklungspotential werden im Unterschied zu den pluripotenten Zellen der ICM als „adulte“, gewebespezifische oder „Körperrstammzellen“ bezeichnet.

Die Zellen der inneren Zellmasse lassen sich *in vitro* in pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) überführen [6, 7]. Diese können sich unter speziellen Kulturbedingungen viele Male teilen, wobei alle Tochterzellen ihre Pluripotenz beibehalten können. Ein Ausdruck davon ist, dass sie sich in spezialisierte Zellen, wie Nerven-, Leber- oder Blutzellen, überführen lassen. Die grundlegenden Arbeiten hierzu wurden 1981 am Modellorganismus Maus erzielt [6, 7, siehe 8]. Erst 17 Jahre später, 1998, konnten die ersten menschlichen ES-Zelllinien etabliert werden [9]. Diese und zahlreiche weitere Untersuchungen zeigten, dass es zwischen Mensch und Maus neben Übereinstimmungen in grundlegenden entwicklungsbiologischen Prozessen auch spezifische Unterschiede gibt [8]. Angesichts des großen medizinischen Anwendungspotentials von ES-Zellen sind daher experimentelle Studien an menschlichen ES-Zellen unerlässlich, um die Grundlagen der menschlichen Embryogenese verstehen zu können.

2 Definitionsgemäß handelt es sich um eine totipotente Zelle, wenn aus dieser einen Zelle ein komplettes Individuum hervorgehen kann.

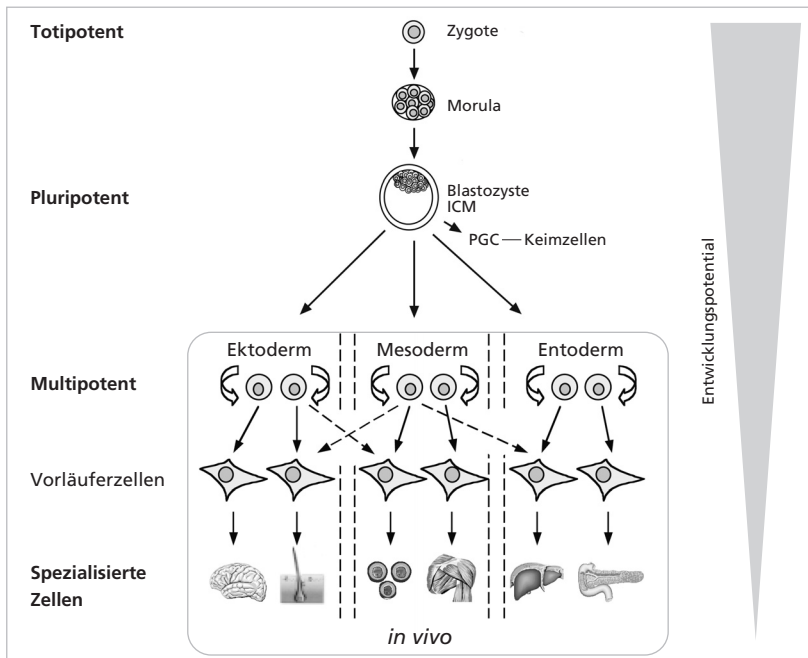


Abb. 1: Stammzellhierarchie – Entwicklung von spezialisierten Körperzellen aus totipotenten Embryonen, über pluripotente und multipotente Stamm- und Vorläuferzellen (ICM, Innere Zellmasse; PGC, primordiale Keimzellen [8]).

Jede differenzierte, spezialisierte Körperzelle geht durch Zellteilung aus einer Stammzelle hervor. Gehen etwa Körperzellen infolge einer Verletzung zugrunde, können sie oft aus den Stammzellen ersetzt werden. Ein unkontrolliertes Wachstum derartiger Zellen kann zu Tumoren führen. Adulte Stammzellen lassen sich trotz vielfältiger Bemühungen – im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen – *in vitro* bisher nur begrenzt vermehren.

Die entscheidende Voraussetzung für den Übergang totipotenter über pluripotente und multipotente zu spezialisierten Zellen liegt in der Aktivierung und Inaktivierung bestimmter Gene. Die jeweilige Genaktivität wird dabei durch eine Vielzahl epigenetischer Kontrollsysteme beeinflusst. Das Muster aktiver und inaktiver Gene wird im Allgemeinen über die Zellteilungen hinweg „vererbt“. Unter *Epigenetik* werden stabile und bei der Zellteilung vererbte Unterschiede in der Genexpression verstanden. Die DNA-Sequenz im Genom der Zelle bleibt dabei unverändert.

Epigenetische Mechanismen

Lichtmikroskopisch sichtbarer Ausdruck epigenetischer Prozesse sind unterschiedliche Konformationszustände des Chromatins, wie sie mit den Begriffen Eu- und Heterochromatin beschrieben werden. Es sind viele verschiedene molekulare Mechanismen bekannt, die zu Veränderungen der Chromatinkonformation führen. Dazu gehören die DNA-Methylierung und -Demethylierung, die (De-)Methylierung und (De-)Azetylierung von Histonen sowie vielfältige weitere Proteinmodifikationen. Eine andere Form epigenetischer Regulation besteht auf der Ebene der RNA. Diese führt über sog. RNA-Interferenz-Mechanismen (RNAi) zu einer Einschränkung der Transkription der jeweiligen Gene [10].

Der bestuntersuchte epigenetische Mechanismus beim Menschen ist die Methylierung und Demethylierung von DNA, die an spezifischen Stellen des Moleküls stattfindet. Generell handelt es sich dabei um CpG-Dinukleotide, z. B. in der Promotorregion von Genen, bei denen das Cytosin durch ein Enzym methyliert wird. Diese Modifikation wird über die mitotischen Zellteilungen hinweg stabil weitergegeben, kann aber z. B. bei der Keimzellbildung auch wieder entfernt werden. In der Regel verhindert Methylierung die Expression des betreffenden Gens. Dieser Mechanismus spielt auch eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung fremder Gene, die z. B. als Folge einer Infektion mit Retroviren in die Zellen gelangen oder gezielt bei einer Gentherapie eingeführt werden.

Im Verlauf der Säugerentwicklung finden wiederholt umfassende Veränderungen im genomweiten Methylierungsmuster statt. Betroffen sind reifende Keimzellen, embryonale Stammzellen, die Zygote und die ersten Zellteilungsstadien. So erfolgt eine globale Demethylierung des Genoms zwischen dem Einzell- und dem Blastozystenstadium, aber auch in den primordialen Keimzellen (den ursprünglichen Vorläufern der Keimzellen im Embryo). Die Totipotenz der frühen embryonalen Zellen wird durch epigenetische Reprogrammierung herbeigeführt. Während der Gametogenese kommt es ebenfalls zu Methylierungsprozessen an bestimmten Genen, die zu einer unterschiedlichen elternspezifischen Prägung (Imprinting) des mütterlichen und väterlichen Genoms in der Zygote führen [11–13]. Erste Belege hierfür lieferte der Nachweis gynogenetischer (parthenogenetischer) und androgenetischer Entwicklung aus menschlichen Keimzellen mit ausschließlich mütterlichem oder väterlichem Erbgut [14]. Zum einen entstehen gutartige Geschwülste, die sog. ovariellen Teratome, die differenzierte Strukturen aller drei Keimblätter ausbilden können. Diese gehen auf eine unbefruchtete Eizelle zurück, die sich ohne Befruchtung durch ein Spermium parthenogenetisch weiterentwickelte. Zum anderen handelt es sich um sog. Blasenmolen, die vorwiegend nur aus extraembryonalem Gewebe bestehen. Blasenmolen entwickeln sich nach Befruchtung einer chromosomenlosen Eizelle durch ein Spermium und weisen ei-

nen diploiden Chromosomensatz auf. Aus solchen Befunden ist abzuleiten, dass bestimmte väterliche Gene bevorzugt die Entwicklung des extraembryonalen Gewebes steuern, bestimmte mütterliche Gene hingegen die Entwicklung des eigentlichen Embryos³.

Demnach sind im Zellkern der totipotenten Zygote die beiden elterlichen Genome epigenetisch unterschiedlich „programmiert“. Dies ist zu beachten, wenn Zellkerne differenzierter Zellen durch experimentellen Eingriff in entkernte Oozyten übertragen und diese Zellen in den totipotenten Status zurückversetzt werden sollen. Auf diese Weise wird „experimentell erzeugte Totipotenz“ geschaffen. Von einem echten Verständnis der vielfältigen epigenetischen Kontrollmechanismen ist man derzeit allerdings noch weit entfernt⁴.

Reversibilität des Entwicklungsstatus menschlicher Zellen

Für lange Zeit wurde die 1828 von Karl-Ernst von Baer formulierte Regel, wonach jede embryonale Entwicklung mit einer zunehmenden, nicht-umkehrbaren Spezialisierung einhergeht, als ein Grundgesetz der Entwicklungsbiologie angesehen [24]. Als „Gesetz“ ist diese Regel heute nicht mehr gültig. Bereits in den 1950er Jahren konnte durch Übertragung des Zellkerns einer somatischen Zelle (Darmepithel einer Froschlarve) in eine bestrahlte Eizelle ein geklonter Frosch hergestellt werden [25]. In den 1960er Jahren gelang es, aus isolierten pflanzlichen Meristemzellen (Protoplasten) durch Reprogrammierung („somatische Embryogenese“, „Klonen“) komplette Pflanzen zu entwickeln [26]. Dieses Verfahren hat die

- 3 Das UBE3A Gen ist ein Beispiel für ein Gen, bei dem, vereinfacht gesprochen, nur das mütterliche Allel aktiv ist. Eine Mutation in diesem Gen führt daher nur dann zu einem genetischen Defekt, dem Angelman-Syndrom, wenn sie von der Mutter vererbt wurde. Die Aktivität dieses Gens wird durch ein „Imprinting Center“ gesteuert. Etwas vereinfachend deutet man die Befunde so, dass von ihm in unmethyliertem Zustand, der dem väterlichen Chromosom entspricht, eine antisense RNA gebildet wird, die die Expression des angrenzenden UBE3A Gens unterbindet. Ist das Imprinting-Center methyliert, wird keine RNA gebildet und das UBE3A Gen ist aktiv [15]. 1994 wurde erstmals ein Imprinting-Defekt als ein neuer Mechanismus genetisch bedingter Krankheiten beschrieben. Hier wies auch das Imprinting-Center des väterlichen Chromosoms ein mütterliches Methylierungsmuster auf, so dass das Kind das Angelman-Syndrom entwickelte [16]. Inzwischen ist gut belegt, dass derartige Imprinting-Mutationen nach künstlicher Befruchtung (IVF) etwas häufiger auftreten [17, 18].
- 4 Hier soll nur ergänzend darauf hingewiesen werden, dass inzwischen auch bei Säugetieren die Vererbung epigenetischer Veränderungen auf die nächste Generation nachgewiesen wurde. So kommt es nach der Vorkerntransplantation zwischen befruchteten Eizellen verwandter Mausstämmen u. a. zur weitgehenden Abschaltung bestimmter Proteine der Leber („major urinary proteins“), die mit gesteigerter DNA-Methylierung der betreffenden Gene

Pflanzenzüchtung und die pflanzliche Biotechnologie revolutioniert und ist heute eine Routinemethode.

„Experimentell erzeugte Totipotenz“ wurde für Säugetiere 1997 durch die erfolgreiche Klonierung des Schafs 'Dolly' belegt. Die Wissenschaftler um Keith Campbell und Ian Wilmut hatten den Zellkern einer Epithelzelle der Milchdrüse elektromechanisch in eine entkernte Schaf-Eizelle eingeführt. Diese entwickelte sich danach *in vitro* zu einer Blastozyste und nach Übertragung in den Uterus eines Ammentieres bis zur Geburt des Klonschafs Dolly [27]. Inzwischen gelangen mit dieser Technik Klonierungen bei zahlreichen weiteren Säugetierarten. Bei dieser zellbiologischen Manipulation wird durch Faktoren des Eizellplasmas eine Reprogrammierung des Genexpressionsprogramms einer somatischen Zelle durch epigenetische Modifikationen auf den embryonalen Status zurückgestellt. Allerdings treten bei den nach dieser Methode klonierten Tieren vermehrt Entwicklungsfehlbildungen und erhöhte Mortalität auf, was sich auf fehlgesteuerte Reprogrammierungsabläufe zurückführen lässt [28, 29]. Bezogen auf den Menschen waren von Beginn an ethische Erwägungen, insbesondere auch die Gefahr solcher Fehlentwicklungen, ausschlaggebend dafür, das sog. ‚reproduktive Klonen‘ zu verurteilen.

Die neuen Befunde lassen es berechtigt erscheinen, dass eine phänotypische Unterscheidung zwischen totipotenten Blastomeren und vermeintlich „totipotenten Zellen“, die nach Transfer von somatischen Zellkernen entstehen, nicht getroffen werden kann. Beide Formen der Totipotenz unterscheiden sich aber fundamental durch die Tatsache des experimentellen Eingriffs, sodass man einerseits

korreliert und noch in der dritten Generation nachweisbar ist [19]. Ein weiteres Beispiel ist die nahrungsbedingte Inaktivierung des Mausgens für gelbe Fellfarbe. Es betrifft das AVY Allel, das ein Retroposon aufweist. Verabreicht man trächtigen Weibchen zwischen Tag 8,5 bis 15,5 der Trächtigkeit eine Nahrung mit viel Methyl-Donatoren (z. B. Folsäure, Vitamin B12, Methionin), weist die Enkel-Generation gehäuft Tiere mit normaler, nicht gelber, Fellfarbe auf. Das Retroposon ist methyliert und daher inaktiv. Die gelb gefärbten Nachkommen zeigen ein unmethyliertes Retroposon. Bemerkenswerterweise funktioniert dieser Mechanismus nur für das väterliche AVY Allel [20, 21]. Ein derartiger epigenetischer, auf den großelterlichen Anteil des Genoms zurückgehender Effekt wird auch für den Menschen diskutiert. Danach erhöht eine reichhaltige Ernährung des Großvaters in der Zeit vor der Pubertät das Krankheitsrisiko seiner Enkel für Herz-Kreislauferkrankungen und Altersdiabetes, umgekehrt senkt eine geringe Nahrungsaufnahme in dieser Zeit das betreffende Krankheitsrisiko [22, 23]. Epigenetische Untersuchungen dieser Art sind sehr schwierig durchzuführen. Auch wenn eine molekulare Erklärung für diese Effekte noch aussteht, in Verbindung mit den oben genannten experimentellen Befunden an der Maus geben sie Anlass, die Auswirkungen erworbener epigenetischer Veränderungen der elterlichen Keimbahnzellen auf Kinder und Enkelkinder in Betracht zu ziehen.

von *natürlicher* und andererseits von *experimentell erzeugter Totipotenz* sprechen muss [3].

Die im Tierversuch belegte prinzipielle Möglichkeit, aus dem Zellkern somatischer Zellen durch einen experimentellen Eingriff eine entwicklungsfähige Blastozyste herzustellen, ist für die ethische Abwägung besonders relevant, weil hier im Gegensatz zur natürlichen Situation erstmals menschliche (experimentelle) Handlungen zu bewerten sind, die eine neue genetische Form für einen embryonalen Entwicklungsbeginn schaffen. In dieser Betrachtung des Entwicklungsbeginns zeichnen sich isolierte Blastomeren, z. B. eines 2-Zell- oder eines 4-Zellstadiums von Säugetieren und experimentell durch Kerntransfer (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT) hergestellte Zygoten gleichermaßen durch ihre manipulativ hergestellte, neue Entwicklungsbedingung aus, die nicht durch eine natürliche geschlechtliche Reproduktion entstanden ist, d. h. für die der Beginn nicht durch Meiose gereifte Gameten begründet wurde. Diese experimentelle Reproduktion ist in beiden Beispielen daher wissenschaftlich betrachtet als ungeschlechtlich zu bezeichnen. Es handelt sich dabei um einen Prozess der Klonierung.

Im Unterschied zum ‚reproduktiven Klonen‘ soll jedoch beim ‚therapeutischen Klonen‘ der entstandene Embryo nicht in den Uterus transferiert, sondern für die Gewinnung von ES-Zellen eingesetzt werden. Bei diesem Verfahren werden z. B. Zellkerne aus menschlichen Hautzellen durch Transfer in entkernte humane Eizellen transferiert, die vom Eizellplasma reprogrammiert werden (sog. somatischer Zellkern-Transfer, siehe oben), so dass sich daraus schließlich *in vitro* Blastozysten entwickeln. Der eventuell entstehende hohe Verbrauch von menschlichen Eizellen für eine solche im Labor vorzunehmende Herstellung von Blastozysten sowie die immer noch nicht wissenschaftlich erforschten und verstandenen Reprogrammierungsvorgänge machen es allzu verständlich, weshalb diese Vorgehensweise von Anfang an sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus ethischer Sicht heftig umstritten ist.

Seit 2006 ist bekannt, dass die Reprogrammierung adulter menschlicher Körperzellen in embryonale Zellen auch ohne den Einsatz von isolierten, entkernten Eizellen erreicht werden kann. Durch Übertragung von Pluripotenzen-assoziierten Genen mit Hilfe retroviraler Vektoren gelang die Herstellung sogenannter ‚induzierter pluripotenter Stamm (iPS)- Zellen‘ zunächst bei der Maus, dann auch beim Menschen [30-38]. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass aus den reprogrammierten Zellen der Maus (z. B. aus Fibroblasten, Leberzellen, Zellen der Bauchspeicheldrüse oder des Magenepithels) nach gelungener Übertragung von Genen ins Empfänger-genom mit Hilfe viraler „Genfähren“ und entsprechender Selektion stabile pluripotente iPS-Zellklone gewonnen werden können, die sich von natürlichen ES-Zellen in bestimmten wichtigen Eigenschaften praktisch nicht

unterscheiden (allerdings sind epigenetische Unterschiede und solche in der Expression von Genen beschrieben worden). Mit derartigen iPS-Zellen der Maus konnten mittels „*Tetraploid embryo complementation*“ [28] zunächst normale Mausembryonen generiert werden [32, 34, 38], schließlich vor Kurzem auch lebensfähige neugeborene Mäuse [39–41], ähnlich wie dies für ES-Zellen bereits 1993 mit der „*Tetraploid embryo aggregation*“, auch „*Sandwich-Technik*“ genannt, demonstriert worden war [42].

Wie Abb. 2 zeigt, werden bei diesem Verfahren nach Nagy et al. [42] die zu testenden Zellen, in diesem Fall diploide ES-Zellen, mit zwei tetraploiden Furchungsstadien der Maus (vorzugsweise 4-Zellstadien) in einem speziellen Kulturgefäß zusammengebracht und bis zum frühen Blastozystenstadium *in vitro* kultiviert. Anschließend werden sie in den Uterus einer synchronisierten Ersatzmutter (*surrogate mother*) übertragen.

Bei der alternativ angewandten Technik nach Eggan et al. [28] werden, wie in Abb. 3 gezeigt, die diploiden Testzellen, ES-Zellen oder iPS-Zellen, in eine tetraploide Blastozyste injiziert, in der sie in den Embryoblasten einwandern und die Steuerung der Entwicklung übernehmen. Anschließend werden diese Blastozysten in den Uterus einer synchronisierten Ersatzmutter transferiert. Bei beiden Verfahren entwickeln sich letztlich aus den tetraploiden Zellen extraembryonales Trophoblastgewebe (Plazenta-Anteile), aus den Testzellen diploide Embryonen bzw. neugeborene Mäuse.

Die bisherigen Arbeiten mit humanen Zellen zeigten, dass die Reprogrammierung *menschlicher adulter* Zellen mit Hilfe von Pluripotenz-assoziierten Genen möglich ist, allerdings nur mit geringerer Effizienz erfolgt und offensichtlich komplexer ist als die Reprogrammierung von *fetalen* Fibroblasten der Maus [37]. Problematisch ist, dass zur Übertragung der Pluripotenzgene und Herstellung von iPS-Zellen bis vor kurzem ausschließlich Retroviren eingesetzt wurden, die Tumore auslösen können (Abb. 4). Derzeit wird weltweit intensiv daran gearbeitet, die ‚ideale‘ Kombination von Reprogrammierungsfaktoren zu ermitteln, bzw. die retrovirale Übertragung der Pluripotenzgene durch die Behandlung mit chemischen Faktoren (z. B. epigenetischen Modifikatoren) ganz oder zumindest teilweise zu ersetzen [43, 44], und die Mechanismen der Reprogrammierung von Säugerzellen im Detail zu verstehen [45, 46]. So konnte gezeigt werden, dass zur Reprogrammierung von murinen neuronalen adulten Stammzellen in iPS-Zellen nur der retrovirale Transfer des Pluripotenzgens Oct4 erforderlich ist [47]. Ein entscheidender Durchbruch auf dem Gebiet der induzierten Pluripotenz gelang kürzlich mit der erfolgreichen Reprogrammierung muriner Fibroblasten in sogenannte „Protein-induzierte pluripotente Stammzellen“ (protein-induced pluripotent stem cells, piPSCs) allein durch Transduktion rekombinanter Proteine der vier Reprogram-

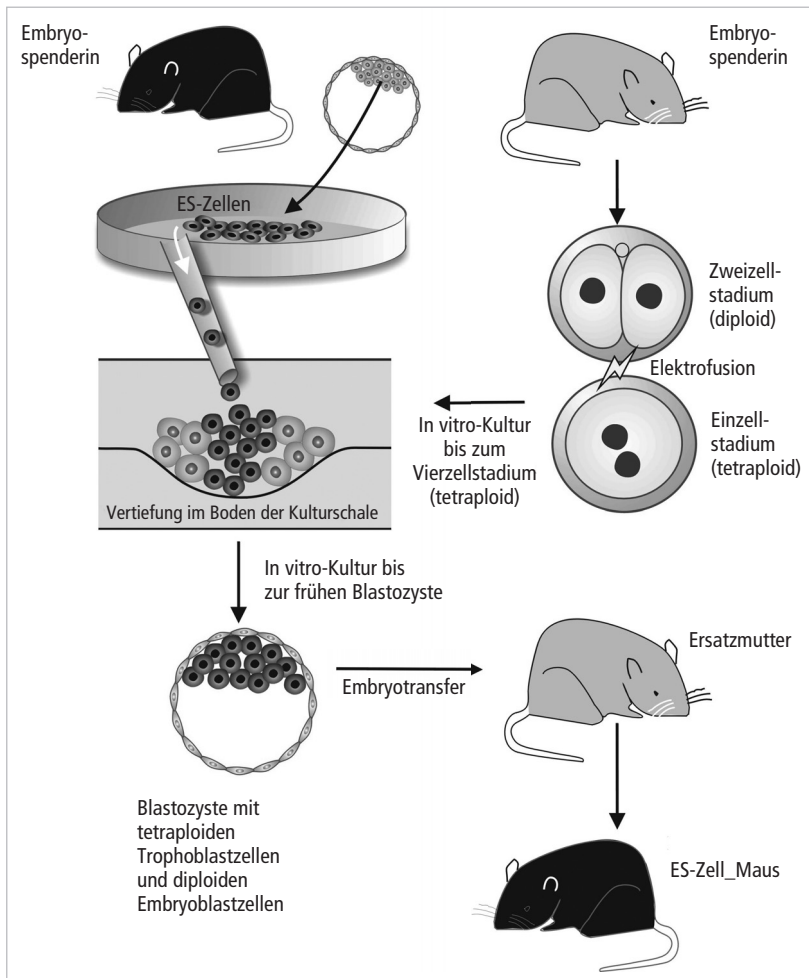
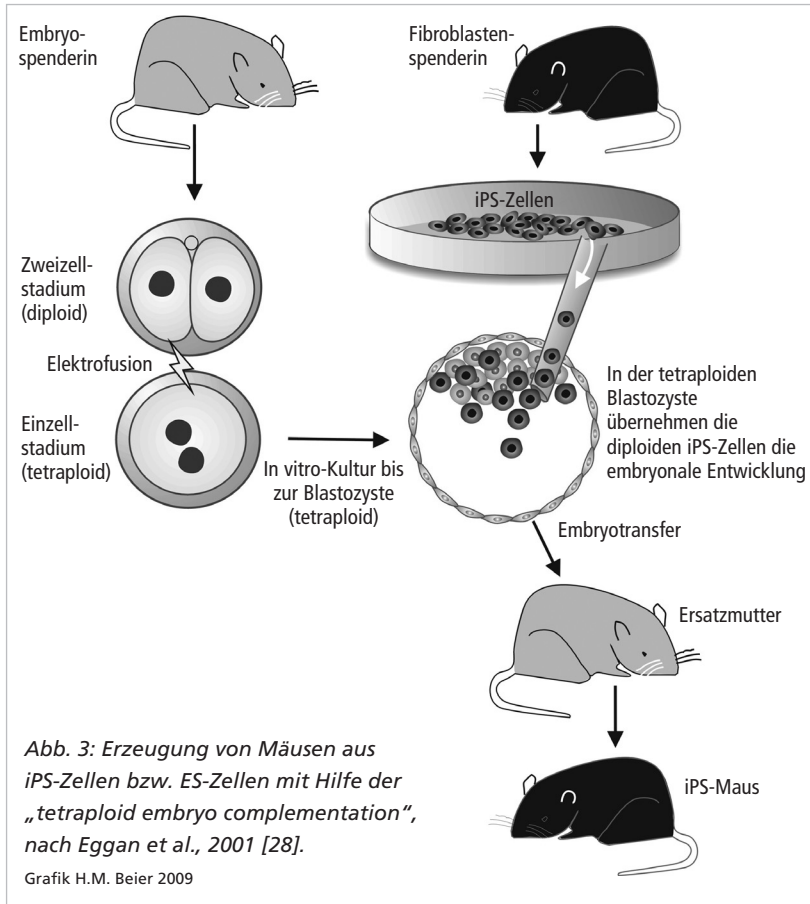


Abb. 2: Erzeugung von Mäusen aus ES-Zellen mit Hilfe der „tetraploid embryo aggregation“, nach Nagy et al., 1993 [42].

Grafik H.M. Beier 2009

mierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc unter dem Einfluss eines HDAC-Inhibitors [48]. Inzwischen ist auch die Reprogrammierung humaner Fibroblasten durch rekombinante Proteine gelungen, wenn auch nur mit geringer Effizienz [49]. Nach weiterer Optimierung der Reprogrammierungsverfahren eröffnet sich



nun die Möglichkeit, zukünftig bei der experimentellen Induktion pluripotenter Zellen des Menschen auf genetische Manipulationen ebenso wie auf komplizierte Verfahren zur Entfernung von viralen Vektorbestandteilen [z. B. 50] zu verzichten.

Bereits heute haben die Arbeiten zur Reprogrammierung entscheidend zum Verständnis grundlegender zellbiologischer Prozesse beigetragen⁵. Im Falle einer

5 Nicht behandelt werden an dieser Stelle die anderen Reprogrammierungstechniken, wie Zellfusion von adulten Zellen mit ES-Zellen, oder die Behandlung von adulten Zellen mit pluripotenten Zell-Extrakten, sowie die Isolation pluripotenter Zellen nach parthenogenetischer Induktion von Eizellen (Greber & Schöler, Bundesgesundheitsblatt 51: 1005–1013, 2008).

medizinischen Anwendung müssen allerdings unerwünschte Nebeneffekte, wie die Bildung von Tumoren oder die Induktion von Mutationen, ausgeschlossen werden. Obwohl noch ein erheblicher Forschungsbedarf insbesondere auch zu offenen Fragen der epigenetischen Modifikation bei Reprogrammierungsvorgängen besteht, sind die Aussichten viel versprechend, dass zukünftig auch humane Körperzellen ohne gentechnologische Eingriffe in pluripotente Stammzellen (mit dem Potenzial von ES-Zellen) verwandelt werden können.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass in der Zukunft aus iPS-Zellen *in vitro* neben somatischen Körperzellen auch funktionelle Keimzellen gebildet werden können. Sollten sich aus humanen iPS-Zellen in ähnlicher Weise wie aus murinen ES-Zellen Keimzellen entwickeln lassen [51], dann wäre hiermit erstmals die Möglichkeit gegeben, die Grenze zwischen somatischer und Keimbahn-Entwicklung beim Menschen zu überschreiten. Zur Befruchtung könnten dann theoretisch *in vitro* entwickelte Keimzellen aus beliebigen reprogrammierten iPS-Zellen eingesetzt werden. Dies könnte in bestimmten Fällen von Infertilität neue Handlungsoptionen eröffnen. Allerdings sollte bereits jetzt über die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet und die sich daraus ergebenden ethischen Implikationen öffentlich diskutiert werden [52,53]. So würde ein Einsatz von iPS-Gameten zur Befruchtung beim Menschen voraussetzen, dass man die Sicherheit dieses Vorgehens zuvor in einem Versuch am Menschen mit ungewissem Ausgang getestet haben müsste.

Insgesamt offenbaren die bisherigen Arbeiten eindrücklich ein allgemeines Prinzip, das Zellen höherer Organismen, d. h. von Pflanzen über das Tierreich bis zum Menschen, auszeichnet, nämlich die Flexibilität ihres Entwicklungspotentials. In höheren Organismen kann der epigenetische Entwicklungszustand von unipotenten oder multipotenten Zellen durch Reprogrammierung in pluripotente iPS-Zellen überführt werden. Diese sind allein aus sich heraus jedoch nicht zur Entwicklung eines Organismus befähigt; d. h., iPS-Zellen sind keine natürlichen embryonalen Zellen und erst recht keine Embryonen.

Derzeit wissen wir nicht, wie sich die embryologischen Phänomene „Totipotenzt“ und „Pluripotenzt“ genetisch, aber auch insbesondere nicht wie sie sich epigenetisch unterscheiden. Ebenso können wir bislang nur in den Anfängen erklären, welche molekularen Mechanismen im entkernten Zytoplasma einer Eizelle für die Reprogrammierung eines ausgereiften, adulten genetischen Programms eines transferierten Zellkerns verantwortlich sind. Des Weiteren ist es wissenschaftlich bisher wenig erforscht, welche molekularen Voraussetzungen und welche daraus folgenden Mechanismen eine totipotente Zelle von einer pluripotenten Zelle unterscheiden. Wie kürzlich in drei unabhängigen Experimenten bei der Maus gezeigt wurde, können sich iPS-Zellen auch funktionell wie pluripotente ES-Zellen verhalten [39–41].

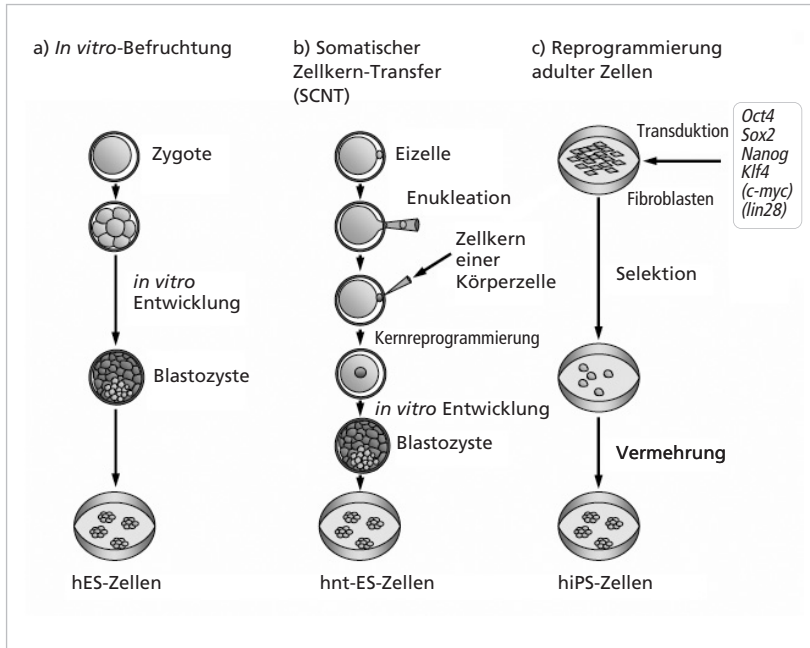


Abb. 4: Vergleichende Darstellung der Gewinnung verschiedener humaner pluripotenter Stammzellen. a) Gewinnung von hES-Zellen aus *in vitro* befruchteten Eizellen. Hierzu entwickelt man die befruchtete Eizelle (Zygote) *in vitro* bis zur Blastozyste weiter und isoliert aus deren Innerer Zellmasse (Embryoblast) pluripotente embryonale Zellen, die als embryonale Stamm (ES)-Zelllinien kultiviert werden. b) Gewinnung von hnt-ES-Zelllinien aus reprogrammierten adulten Zellen nach Transfer eines somatischen Zellkerns in Eizellen, deren Zellkern zuvor entfernt wurde (nt= nuclear transfer; Kerntransfer). Der Nachweis der tatsächlichen Etablierung von pluripotenten hnt-ES-Zellen aus klonierten menschlichen Embryonen steht noch aus. c) Herstellung von humanen induzierten pluripotenten Stamm (iPS)-Zellen nach Reprogrammierung adulter Zellen (z.B. Fibroblasten) am Beispiel des retroviralen Transfers von Pluripotenz-assoziierten Genen. Alternative Verfahren, wie die Reprogrammierung durch Proteintransduktion entsprechender Faktoren sind in Entwicklung [48, 49]. In diesem Fall werden keine Eizellen oder Embryonen benötigt. Derzeit ist auch noch nicht definitiv geklärt, inwieweit die verschiedenen pluripotenten embryonalen Stammzelltypen in genetischer und epigenetischer Hinsicht sich gleichen, bzw. inwieweit sie sich unterscheiden [5].

Es braucht nicht eigens betont zu werden, dass in Deutschland beim Menschen die Überprüfung von natürlicher und von experimentell hergestellter Totipotenz menschlicher Zellen durch Laboruntersuchungen ethisch und rechtlich nicht zulässig ist. Wissenschaftlich ist es wegen der Unterschiede in der Embryonalentwicklung von Mensch und Maus überdies nicht sicher, dass derartige Laboratoriumsmethoden und -untersuchungen überhaupt die normale embryonale Entwicklung eines diploiden menschlichen Embryos ermöglichen würden.

Medizinisch-wissenschaftliche Bedeutung der Reprogrammierbarkeit von Körperzellen

Die vorliegenden Befunde zur Reprogrammierung und induzierten Pluripotenz markieren einen Paradigmenwechsel, der die Stammzellforschung und die Medizin in einem ungeahnten Ausmaß revolutionieren wird. Erstmals ist es möglich geworden, allein durch experimentelle Verfahren das Entwicklungspotential von hochspezialisierten Zellen wieder in ein embryonales Stadium zurückzuführen:

Einmal eröffnen diese Techniken realistische Chancen zur Gewinnung patienteneigener Stammzellen für Zelltherapien. So könnten beispielsweise von Kindern mit Leukämie Fibroblasten entnommen und diese in iPS-Zellen überführt, zu autologen Blutstammzellen differenziert und anschließend retransplantiert werden, ohne dass eine Abstoßungsreaktion zu befürchten wäre. Dadurch könnten Versuche mit der ethisch problematischen SCNT-Technik, die auf dem Verbrauch von Eizellen basiert, vermieden werden.

Zum anderen werden diese Arbeiten auch zunehmend die Erforschung der Entstehungsmechanismen von Krankheiten erlauben, die mit den bisher eingesetzten Methoden nicht durchführbar sind. So können bereits heute iPS-Zellen aus Körperzellen von Patienten mit genetisch bedingten Krankheiten, z.B. einer neurodegenerativen Krankheit, gewonnen und diese *in vitro* in Nervenzellen differenziert werden [54]. Daran lassen sich die molekularen Veränderungen studieren, die dem Krankheitsprozess zugrunde liegen. Diese Zellen können aber auch der Untersuchung von Wirkstoffen und Pharmaka dienen, die später therapeutisch beim Menschen – auch unabhängig von einer Zelltherapie – eingesetzt werden können. Toxikologische Untersuchungen mit aus humanen iPS-Zellen gewonnenen Zellderivaten bieten darüber hinaus die Möglichkeit, Medikamente hinsichtlich ihrer embryotoxischen Wirkung an humanen Zellen (anstelle an tierischen Zellsystemen) *in vitro* zu testen.

Schließlich könnten iPS-Zellen auch für eine somatische Gentherapie eingesetzt werden. So ist es bereits 2007 gelungen, in Hautzellen von Mäusen mit Sichelzellanämie den Gendefekt an iPS-Zellen *in vitro* zu korrigieren und nach Retransplantation in die anämischen Mäuse die Krankheit zu heilen [55]. Wenn es gelänge,

die am Maussystem etablierte Strategie auf humane iPS-Zellen zu übertragen, könnte das Problem von Abstoßungsreaktionen beherrscht und eine somatische Gentherapie möglich werden. Allerdings ist derzeit die Korrektur des genetischen Defektes in den iPS-Zellen mittels homologer Rekombination noch ineffizient.

Ethische und rechtliche Fragen der Stammzellforschung⁶

In Deutschland stehen *extrakorporale* (sich außerhalb des Mutterleibs befindende) menschliche Embryonen rechtlich unter Würde- und Lebensschutz. So verbietet das hier maßgebliche Embryonenschutzgesetz von 1990 alle Handlungen, die nicht dem Wohl des Embryos dienen [56]. Dem Embryo werden dabei ausdrücklich auch totipotente Zellen gleichgestellt.

Die Schutzwürdigkeit erstreckt sich somit auf Zellen oder Zellverbände, die „sich bei Vorliegen der dafür erforderlichen weiteren Voraussetzungen zu teilen und zu einem Individuum zu entwickeln“ vermögen.⁷ Damit wurde vom ESchG Totipotenz zur maßgeblichen Bedingung für den strafrechtlichen Lebens- und Würdeschutz vorgeburtlicher menschlicher Entwicklungsstufen gemacht. Die inhaltliche gleichsinnige Begründung wird in der ethischen Debatte als ‚Potentialitätsargument‘ verwendet [57].

Die Plausibilität dieses Potentialitäts-Argumentes ist in der internationalen rechtsethischen Debatte ebenso umstritten wie es andere Argumente sind, denen zufolge bereits die befruchtete Eizelle kategorisch unter Würde- und Lebensschutz gestellt wird. Entsprechend sind deshalb in zahlreichen anderen Ländern, anders als in Deutschland, bestimmte wissenschaftliche Untersuchungen oder Verwendungen früher menschlicher Embryonen zulässig (z. B. gemäß Embryo Protection Act in Großbritannien bis zum 14. Tag nach In-vitro-Fertilisation).

Die unterschiedlichen Rechtslagen ziehen entsprechende internationale Diskrepanzen etwa in der Praxis der assistierten Befruchtung nach sich: Während im Ausland im Rahmen einer In-vitro-Fertilisation (IVF) an den Blastomeren des 8 bis 12-Zellstadiums eine genetische Präimplantationsdiagnostik (PID) zum Nachweis von

6 Ethische und rechtsethische Diskussionen bedürfen im Zusammenhang mit zellbiologischen und embryologischen Darstellungen neuester Entwicklungen in der Stammzellforschung einer besonders sensiblen und verantwortungsvollen Bemühung um eine verständliche Terminologie. Die kurzen Hinweise dieser Stellungnahme mögen daher lediglich als Anstoß für vertiefende Abwägungen und Diskurse zwischen Naturwissenschaftlern und Ethikern sowie Philosophen und Juristen dienen.

7 §8 Abs. 1 ESchG. Allerdings ist diese Legaldefinition unvollständig, da sie nur die „befruchtete“ Eizelle und die „einem Embryo entnommene totipotente Zelle“ benennt. Vgl. dazu [56 S. 108f, 273]. Das Stammzellgesetz (s.u.) hingegen schließt in seine Legaldefinition „jede menschliche totipotente Zelle“ mit ein.

Chromosomenanomalien oder bei Verdacht auf das Vorliegen bestimmter Genmutationen durchgeführt werden darf, wird diese Untersuchung in Deutschland nicht praktiziert⁸.

Und während in zahlreichen anderen Ländern die Gewinnung humaner ES-Zellen aus frühen Embryonen unter bestimmten Restriktionen erlaubt ist, ist sie nach deutschem Embryonenschutzgesetz untersagt. Zudem dürfen deutsche Forscher solche im Ausland legal gewonnenen ES-Zellen nur unter besonderen Auflagen nach Deutschland importieren und zu Forschungszwecken verwenden. Das regelt das Stammzellgesetz von 2002 und dessen Novellierung im Jahr 2008: Auch wenn humane ES-Zellen ihrerseits nur pluripotent sind und dem Gesetzgeber damit als solche nicht als schutzwürdig gelten, stammen sie doch aus Embryonen, die für die Stammzellgewinnung zerstört werden mussten. Erklärtes Ziel des Stammzellgesetzes ist es, zu verhindern, dass für die in Deutschland stattfindende Forschung menschliche Embryonen im Ausland zerstört werden. Entsprechend werden Einfuhr und Verwendung ausländischer ES-Zellen an die Einhaltung eines bestimmten Herstellungsstichtages (1. Mai 2007) sowie eine ethische und rechtliche Prüfung durch die Zentrale Ethikkommission für Stammzellenforschung (ZES) und die Bundesoberbehörde, das Robert-Koch-Institut, gebunden.

So wichtig es ist, die rechtsethischen Grundlagen dieser und anderer Aspekte des Umgangs mit frühen vorgeburtlichen Entwicklungsstufen menschlichen Lebens zu diskutieren und sich ihrer Begründetheit, auch im Licht neuer Forschungsergebnisse und internationaler Entwicklungen zu vergewissern, so treten diese Diskussionen bei der Beurteilung der Forschung mit iPS-Zellen eher in den Hintergrund: Da zu *deren* Etablierung keine menschlichen Embryonen verwendet werden und sie selbst nicht totipotent sind, berührt die Arbeit mit ihnen weder den Regelungsbereich noch die rechtsethischen Prämissen des deutschen Embryonenschutzgesetzes oder des Stammzellgesetzes. Und während diese durch Reprogrammierung gewonnenen iPS-Zellen sich also hinsichtlich ihrer *Entstehung* von jenen ES-Zellen unterscheiden, deren Gewinnung in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz unzulässig ist und für deren Einführung nach Deutschland

8 So gilt in Deutschland eine PID an den Blastomeren als nicht erlaubt, da nicht auszuschließen ist, dass die eine oder andere Blastomere noch totipotent sein könnte. Zudem dürfen nach Auslegung des ESchG durch die Bundesärztekammer (BÄK) innerhalb eines Zyklus nicht mehr als 3 Embryonen erzeugt werden, die allesamt in die Gebärmutter übertragen werden müssen. Damit ist nach Auffassung der BÄK auch jedwede gezielte Auswahl unter mehreren, aus gleichzeitig befruchteten Eizellen hervorgegangenen Embryonen nach Maßgabe ihrer Entwicklungsfähigkeit, Morphologie oder genetischen Intaktheit untersagt. Zu dieser Interpretation gibt es Alternativ-Auslegungen, die allerdings noch nicht in den Alltag der Reproduktionsmedizin in Deutschland eingegangen sind. Vgl. [56 S. 116, 164–166, 174–177].

die Regelungen des Stammzellgesetzes gelten, besteht die Hoffnung, dass sie sich von diesen ES-Zellen in ihren relevanten *Eigenschaften* (Proliferation, In-vitro-Differenzierung, epigenetisches Muster) nicht unterscheiden. Diese Hoffnungen lassen sich allerdings nur dadurch erhärten, dass man international vergleichende Forschung mit iPS-Zellen *und* hES-Zellen durchführt.

Wenngleich die Möglichkeit, iPS-Zellen herzustellen und mit ihnen zu arbeiten, auf längere Sicht eine viel versprechende Alternative zur ethisch umstrittenen Forschung mit menschlichen ES-Zellen sein könnte, werfen die Möglichkeiten der Zell-Reprogrammierung zugleich ein neues Licht auf die ethischen Begründungen des Embryonenschutzes: Die Entwicklungsfähigkeit (Entwicklungspotenz) von embryonalen, fetalen sowie adulten Zellen ist derart flexibel, dass in Zukunft ausgereifte, differenzierte Körperzellen allein durch biochemische Faktoren und experimentelle Vorgehensweisen wieder das Potential embryonaler Zellen (Pluripotenz oder Totipotenz?) erreichen könnten. Natürlich wäre es nachgerade absurd, diese experimentell herstellbare Entwicklungspotenz von Zellen zur Grundlage von Lebens- und Würdeschutz zu machen und daraus entsprechende gesetzliche Regeln abzuleiten. Wer die Entwicklungsfähigkeit zu einem Individuum (Totipotenz) als Grundlage von Würde- und Lebensschutz versteht, wird hier vielmehr einen entscheidenden rechtsethischen Unterschied zwischen der künstlich *herstellbaren* Pluripotenz aus einer Körperzelle und der tatsächlich vorliegenden Entwicklungsfähigkeit eines Embryos und seiner bis zum 8-Zellstadium der Entwicklung totipotenten Einzelzellen geltend machen. Mit welchen Argumenten eine „*natürliche Entwicklungspotenz*“ rechtsethisch privilegiert werden müsste und könnte, ohne das philosophische Potentialitätsargument zu diskreditieren, wird gegenwärtig diskutiert [58].

Literatur

1. Müller-Röber, B., Boysen, M., Fehse, B., Hucho, F., Köchy, K., Reich, J., Rheinberger, H.-J., Ropers, H.-H., Sperling, K. und Wobus, A.M. Zweiter Gentechnologiebericht. Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, Forum-W, Dornburg (2009).
2. Beier, H.M. Zur Problematik von Totipotenz und Pluripotenz. In: Bundesministerium für Bildung und Forschung (Hrsg.): Human Stammzellen- Perspektiven und Grenzen in der regenerativen Medizin. Schattauer, Stuttgart 55–71 (2001).
3. Beier, H.M. Der Beginn der menschlichen Entwicklung aus dem Blickwinkel der Embryologie. Z. Ärztl. Fortbild. Qual.sich. 96: 351–361 (2002).
4. Schöler, H.R. Das Potential von Stammzellen – Ist der Mensch regenerierbar? Naturw. Rdsch. 56: 525–539 (2003).
5. Wobus, A.M. Reversibilität des Entwicklungsstatus menschlicher Zellen. Stammzellforschung, Potenzialitätsprinzip und ethisch-rechtliche Konsequenzen. Naturw. Rdsch. 61: 221–225 (2008).
6. Evans, M.J. und Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 292: 154–156 (1981).
7. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 7634–7638 (1981).
8. Wobus, A.M. und Boheler, K.R. Embryonic stem cells: Prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol. Rev. 85: 635–678 (2005).
9. Thomson, J.A., Itskovits-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., und Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282: 1145–1147 (1998).
10. Bernstein, B.E., Meissner, A. und Lander, E.S. The mammalian epigenome. Cell 128: 669–681 (2007).
11. Reik, W., Dean, W. und Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 293: 1089–1093 (2001).
12. Kelly, T.L.J. und Trasler, J.M. Reproductive epigenetics. Clin. Genet. 65: 247–260 (2004).
13. Surani, M.A., Hayashi, K. und Hajkova, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. Cell 128: 747–762 (2007).
14. Surani, M.A. Parthenogenesis in man. Nature Genet. 11: 111–113 (1995).
15. Horsthemke, B. und Buiting, K. Imprinting defects on human chromosome 15. Cytogenet. Genome Res. 113: 292–299 (2006).
16. Reis, A., Ditttrich, B., Greger, V., Buiting, K., Lalande, M., Gillissen-Kaesbach, G., Anvret, M. und Horsthemke, B. Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. Am. J. Hum. Genet. 54: 741–747 (1994).
17. Cox, G.F., Burger, J., Lip, V., Mau, U.A., Sperling, K., Wu, B.L. und Horsthemke, B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. Am. J. Hum. Genet. 71: 162–164 (2002).
18. Halliday, J. Outcomes of IVF conceptions: are they different? Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 21: 67–81 (2006).
19. Roemer, I., Reik, W., Dean, W. und Klose J. Epigenetic inheritance in the mouse. Current Biology 7: 277–280 (1997).
20. Morgan, H.D., Sutherland, H.G.E., Martin, D.I.K. und Whitelaw, E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. Nature Genet. 23: 314–318 (1999).

21. Cropley, J.E., Suter, C.M., Beckman, K.B. und Martin, D.I.K. Germ-line epigenetic modification of the murine A^VY allele by nutritional supplementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103: 17308–17312 (2006).
22. Kaati, G., Bygren, L.O., Pembrey M. und Sjöström, M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. *Eur. J. Hum. Genet.* 15: 784–790 (2007).
23. Pembrey, M., Bygren, L.O., Kaati, G., Edvinson, S., Northstone, K., Sjöström, M., Golding, J., ALSPAC study team. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.* 14: 159–166 (2006).
24. Baer, K.-E. von. Über Entwicklungsgeschichte der Thiere, Königsberg (1828).
25. Briggs, R. und King, T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 38: 455–463 (1952).
26. Birnbaum, K.D. and Alvarado, A.S. Slicing across kingdoms: Regeneration in plants and animals *Cell* 132: 697–710 (2008).
27. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J. Kind, A.J. und Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813 (1997).
28. Eggan, K., Akutsi, H., Loring J., Jackson-Grusby, L. Klemm, M., Rideout, W.M. 3rd und Jaenisch, R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98: 6209–6214 (2001).
29. Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko V., Walter, J., Wolf, E. und Reik, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98: 13734–13738 (2001).
30. Takahashi, K. und Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676 (2006).
31. Okita, K., Ichisaka, T. und Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313–317 (2007).
32. Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E. und Jaenisch, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448: 318–324 (2007).
33. Maherali, N., Sridharan, R, Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K, Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchiew, J., Jaenisch, R., Plath, K. und Hochedlinger, K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling in widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1: 55–70 (2007).
34. Meissner, A., Wernig, M. und Jaenisch, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 25: 1177–1181 (2007).
35. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. und Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5): 861–872 (2007).
36. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin I.I. und Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920 (2007).
37. Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W. und Daley, G.Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141–146 (2008).
38. Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P. und Jaenisch, R. C-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2: 10–12 (2008).
39. Zhao, X., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C., Ma, Q., Wang, L., Zeng,

- F. und Zhou, Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. Doi: 10.1038/nature 08267, July 23 (2009).
40. Boland, M.J., Hazen, J.L., Nazor, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S. und Baldwin, K.K. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. Doi: 10.1038/nature 08310, August 02 (2009).
 41. Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z. und Gaor, S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complementation embryos. *Cell Stem Cell* 5: 135–138 (2009).
 42. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. und Roder, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 90: 8424–8428 (1993).
 43. Shi, Y., Do, J.T., Despons, C., Hahm, H.S., Schoeler, H.R. und Ding, S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2: 525–528 (2008).
 44. Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E. und Melton, D.A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26: 795–797 (2008).
 45. Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T. und Hochedlinger, K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2: 230–240 (2008).
 46. Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H. und Jaenisch, R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2: 151–159 (2008).
 47. Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrlich, M., van den Boom, D., Meyer, J., Hübner, K., Bernemann, C., Ortmeier, C., Zenke, M., Fleischmann, B. K., Zaehres, H. und Schöler, H.R. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136: 411–419 (2009).
 48. Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schoeler, H.R., Duan, L. und Ding, S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381–384 (2009).
 49. Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R. und Kim, K.S. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472–476 (2009).
 50. Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O. und Jaenisch, R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136: 964–977 (2009).
 51. Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F. 3rd, Boiani, M., und Schoeler, H.R. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300: 1251–1256 (2003).
 52. Consensus Statement: Science, Ethics and Policy Challenges of Pluripotent Stem Cell-Derived Gametes, The Hinxton Group, April 11, 2008.
http://www.hinxtongroup.org/Consensus_HG08_FINAL.pdf
 53. Mathews, D.J.H., Donovan, P.J., Harris, J., Lovell-Badge, R., Savulescu, J. und Faden, R. Pluripotent stem cell-derived gametes: Truth and (potential) consequences. *Cell Stem Cell* 5: 11–14 (2009).
 54. Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitumoto, H., Chung, W.,

- Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., und Eggan, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1169–1170 (2008).
55. Hanna, J. Wernig, M. Markoulaki, S., Sun, C.W, Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T.M. und Jaenisch, R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318: 1920–1923 (2007).
56. Günther, H.-J., Taupitz, J. und Kaiser, P. Embryonenschutzgesetz. Juristischer Kommentar mit medizinisch-naturwissenschaftlichen Einführungen. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart (2008).
57. Damschen, G. und Schönecker, D. Der moralische Status menschlicher Embryonen: Pro und contra Spezies-, Kontinuums-, Identitäts- und Potentialitätsargument. Walter de Gruyter, Berlin, New York (2003).
58. Ach, J.S. Schöne-Seifert, B. und Siep, L. Totipotenz und Potentialität: Zum moralischen Status von Embryonen bei unterschiedlichen Varianten der Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen. In: *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik* 11, 261–321 (2006).

Autoren der Empfehlung:

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Henning M. Beier, Aachen

Prof. Dr. med. Boris Fehse, Hamburg

Prof. Dr. rer. nat. Bärbel Friedrich, Berlin

Prof. Dr. Magdalena Götz, München

Prof. Dr. Ingo Hansmann, Halle (Saale) (Koordination)

Prof. Dr. Ferdinand Hucho, Berlin

Univ.-Prof. Dr. Dr. Kristian Köchy, Kassel

Prof. Dr. Bernd Müller-Röber, Potsdam

Prof. Dr. Hans-Jörg Rheinberger, Berlin

Prof. Dr. Jens Reich, Berlin

Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers, Berlin

Prof. Dr. rer. nat. Hans R. Schöler, Münster

Prof. Dr. Bettina Schöne-Seifert, Münster

Prof. Dr. rer. nat. Karl Sperling, Berlin

Prof. Dr. Klaus Tanner, Heidelberg

Prof. Dr. Jochen Taupitz, Mannheim

Prof. Dr. Anna M. Wobus, Gatersleben

