

3. Zusammenfassungen zum Stand wissenschaftlicher und medizinischer Entwicklungen

Moritz Mall und Marius Wernig

3.1 Die neue Technologie der zellulären Reprogrammierung und ihre Anwendung in der Medizin¹

Zusammengefasst und aus dem Englischen übersetzt von Lilian Marx-Stöltzing

Der menschliche Körper besteht aus hunderten verschiedenen Zelltypen, welche spezifische Aufgaben übernehmen. Neueste Entdeckungen auf dem Gebiet der Stammzellforschung ermöglichen Wissenschaftlern, normale Körperzellen (somatische Zellen) von einem Zelltyp in einen anderen umzuwandeln, was als „direkte Reprogrammierung“ (auch: direkte Konvertierung) bezeichnet wird. So ist es heute möglich, Haut- oder Blutzellen in der Petrischale (in vitro) in Nerven-, Leber- oder Herzzellen umzuwandeln. Alternativ ist es sogar möglich, adulte Zellen erwachsener Menschen in ihrem Potenzial sozusagen zu „verjüngen“, indem sie in einen pluripotenten Stammzellzustand „reprogrammiert“ werden. Diese sogenannten humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) gleichen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und können in weiteren Schritten in unterschiedliche Gewebe beziehungsweise Zelltypen des menschlichen Körpers differenziert werden. Die Reprogrammierungstechnologie hat vier nennenswerte Anwendungsbereiche: (1) Reprogrammierte Zellen von Patienten

¹ Dieser Beitrag ist eine deutsche Zusammenfassung des Review-Artikels „The novel tool of cell reprogramming for applications in molecular medicine“ von Moritz Mall und Marius Wernig, der eine umfangreiche Darstellung des wissenschaftlichen Sachstands und der aktuellen Literatur zum Thema (Stand Frühjahr 2017) bietet. Der Artikel ist im Juli 2017 im *Journal of Molecular Medicine* (95/7: 695–703) erschienen und kostenfrei öffentlich zugänglich unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-017-1550-4> [19.10.2017].

können nun verwendet werden, um molekulare Krankheitsprozesse in menschlichen Zellen und krankheitsrelevanten Zelltypen zu studieren. Dies stellt eine bereichernde Alternative zu Tiermodellen dar. (2) Reprogrammierung könnte auch verwendet werden als „klinische Studie in der Petrischale“. Neue Medikamente könnten zunächst an menschlichen Zellen von einer Anzahl an Probanden oder Patienten getestet werden, bevor eine klinische Studie durchgeführt wird. (3) Des Weiteren könnten schon frühzeitig seltene Nebenwirkungen neuer Medikamente in reprogrammierten Zellen aufgedeckt werden, bevor Menschen zu Schaden kommen, wie zum Beispiel lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen. (4) Schließlich könnten reprogrammierte Zellen selbst als Therapeutikum eingesetzt werden, um geschädigte Körperzellen zu ersetzen oder Krankheitsprozesse direkt zu modulieren.

Im hier zusammengefassten Review-Artikel werden verschiedene Möglichkeiten und Mechanismen der Reprogrammierung adulter somatischer Zellen sowie deren aktuelle und potenzielle zukünftige Anwendung in der Medizin vorgestellt.

Die Reprogrammierung somatischer Zellen kann durch Faktoren in der Oozyte vorgenommen werden. Dabei wird der Zellkern der somatischen Spenderzelle isoliert und in eine entkernte Eizelle injiziert. 1996 konnte dieses Verfahren erstmals auch mit Säugetieren durchgeführt werden (zur Erzeugung des „Klonschafes“ Dolly). Inzwischen konnten zahlreiche andere Säugetierarten erfolgreich geklont werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass adulte menschliche Fibroblasten (Bindegewebszellen) in menschliche Oozyten transferiert werden können und dann Blastozysten bilden, die vermehrbare pluripotente Zellen enthalten.

Eine weitere Möglichkeit der Reprogrammierung somatischer Zellen besteht in der gezielten Zugabe von Transkriptionsfaktoren². Diese können bestimmte zelltypspezifische genetische Programme induzieren und werden deshalb auch als „selector genes“ (Auswahlgene) bezeichnet. Ein Beispiel ist das Drosophila-Gen „eyeless“, dessen Überexpression die Bildung von Augenstrukturen an verschiedenen Stellen der Fliege induziert. Ein weiteres Beispiel ist der Transkriptionsfaktor MyoD, der Mäuse-Fibroblasten zu schlagenden Muskelzellen umprogrammieren kann. Inzwischen wurden vier Transkriptionsfaktoren identifiziert, die Fibroblasten in iP5-Zellen umwandeln können: Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc. Durch Zugabe von drei (bzw. bei Menschen vier) anderen Transkriptionsfaktoren (Brn2, Ascl1, Myt1l und zusätzlich Neurod1 beim Menschen) können Fibroblasten oder auch Hepatozyten (Leberzellen) direkt in induzierte neuronale Zellen (iN-Zellen) konvertiert werden. Inzwischen konnten viele verschie-

² Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die DNA binden und die Expression (also das Ablesen) von Genen steuern. Bei der Genexpression wird DNA in RNA umgeschrieben (transkribiert), daher der Name „Transkriptionsfaktoren“.

dene Zelltypen durch direkte Konvertierung von Fibroblasten erzeugt werden, darunter Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen), Hepatozyten, Darmzellen und Blutvorläuferzellen. Diese bahnbrechenden Entdeckungen führten bereits zu zahlreichen neuen Projekten und Erkenntnissen, die erfolgreich zum Verständnis vieler menschlicher Erkrankungen beitragen.

Oftmals induzieren diese Zelltyp determinierenden Reprogrammierungsfaktoren eine direkte Bildung ausdifferenzierter Zellen. So führt MyoD direkt zur Bildung reifer Skelettmuskelfasern und lässt dabei das Stadium der muskelzellbildenden Myoblasten (Muskelvorläuferzellen) aus. Auch die direkte Reprogrammierung von iN-Zellen erfolgt ohne den Umweg über neuronale Vorläuferzellen. Für manche Anwendungen, beispielsweise für die Zelltransplantation, wären jedoch Vorläuferzellen, die etwas weniger differenziert sind, eventuell besser geeignet, da sich diese vermutlich besser in bereits existierende Gewebe einfügen könnten als voll ausgereifte Zellen. Daher ist ein Ziel der Forschung, entsprechende Vorläuferzellstadien für verschiedene Zelllinien zu induzieren. Bisher konnten beispielsweise aus bestimmten Transkriptionsfaktorkombinationen, die für die gewünschten Vorläuferzellen typisch sind, erfolgreich Vorläuferzellen des Nervensystems generiert werden. Ein alternativer Ansatz besteht darin, durch nur kurzen Kontakt mit den iPS-Zell-Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc ein nur vorübergehendes (transientes) pluripotentes Stadium zu induzieren. Diese „formbaren“ Zellen können dann durch gleichzeitige Zugabe von Umweltdifferenzierungssignalen in den gewünschten Zelltyp gelenkt werden, ohne tatsächlich iPS-Zell-Linien zu etablieren. Durch diese Methode konnten erfolgreich verschiedenste Vorläuferzellen gebildet werden, etwa neuronale Vorläuferzellen, hämatopoetische (blutbildende) Vorläuferzellen, Osteoblasten (Knochenvorläuferzellen), Herz- und Endothelvorläuferzellen.

Eine weitere Anwendung der Reprogrammierung, die möglicherweise klinisch interessant sein könnte, ist es, Zellen direkt im Körper (in vivo) umzuwandeln, um beispielsweise zerstörtes funktionelles Gewebe zu regenerieren oder zu ersetzen. So können beispielsweise Sinneszellen klinisch relevante Zielzellen für Umprogrammierungen sein. Bereits heute können beispielsweise in der Maus Stützzellen im Gehirn (sogenannte Gliazellen³) in vivo zu funktionalen Neuronen reprogrammiert werden und dort in einem Modell für Alzheimer verletzte Nervenzellen ersetzen. Auch pankreatische β -Zellen, die Insulin produzieren, konnten in der adulten Maus aus pankreatischen Drüsenzellen erzeugt werden und einer Überzuckerung entgegenwirken. Dies deutet

3 Gliazellen sind nicht neuronale Zellen des Nervensystems und haben eine Neuronen unterstützende Funktion.

– nach Übertragung auf das menschliche System – das erstaunliche therapeutische Potenzial dieser Technologie für die Behandlung von Diabetes an. Sogar Leber- und Darmzellen konnten im Mausmodell in Insulin-abgebende Zellen umprogrammiert werden. Des Weiteren konnten Kardiomyozyten, die aus körpereigenen (endogenen) Herzfibroblasten generiert wurden, die Herzfunktion in Mäusen mit Herzverletzungen verbessern. Gleichwohl besteht hierbei das Risiko von Herzrhythmusstörungen, da die erzeugten Kardiomyozyten noch nicht genau den verletzten Zellen entsprechen. Dennoch scheint die Konversion von β -Zellen und Kardiomyozyten *in vivo* effizienter zu sein als *in vitro*, was darauf hindeutet, dass die natürliche Umgebung einer Zelle für ihre Reprogrammierung von großer Bedeutung ist.

Für den Einsatz in der regenerativen Medizin und bei der Modulierung von Krankheiten muss die Reprogrammierung allerdings streng kontrolliert ablaufen. Hierfür ist es wichtig, Faktoren, die die Zelldeterminierung ermöglichen oder diese verhindern, zu identifizieren. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang sogenannte Pionier-Transkriptionsfaktoren (siehe unten), die Unterdrückung der genetischen Programme der Spenderzelle und die Kenntnis von epigenetischen Regulatoren der Reprogrammierung.

Die DNA-Bindung der meisten Transkriptionsfaktoren ist sehr abhängig von der Chromatinkonfiguration⁴ in einer Zelle, also davon, wie zugänglich die DNA und wie eng „verpackt“ das Chromatin ist. Es gibt vielfache Belege dafür, dass die Beschaffenheit des Chromatins die Affinität der Bindung normaler Transkriptionsfaktoren verändert, zusätzlich zu der DNA-Sequenz-basierten Spezifität. So bilden zum Beispiel Nukleosome, in denen die DNA eng um bestimmte Proteine herum gewickelt vorliegt, meistens eine Barriere für Transkriptionsfaktoren. Es gibt jedoch Ausnahmen von dieser Regel. Einige wenige Transkriptionsfaktoren können auch nukleosomale DNA (auch als „geschlossenes Chromatin“ bezeichnet) binden. Diese Klasse von Transkriptionsfaktoren wurde „Pionier-Transkriptionsfaktoren“ genannt.

Erstaunlich viele Reprogrammierungsfaktoren sind Pionier-Transkriptionsfaktoren. So konnte etwa bei drei der vier iPS-Zell-Reprogrammierungsfaktoren (bei Oct4, Sox2 und Klf4, aber nicht bei cMyc) eine Pionierfaktor-Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings hängt die Bindung dieser drei Faktoren an die DNA immer noch sehr vom Zellkontext ab. Ihre Bindung variiert zwischen verschiedenen Reprogrammierungsstadien und ändert sich auch, wenn andere Reprogrammierungsfaktoren aktiv sind. Diese Faktoren binden also trotz ihrer Pionierfähigkeit auch abhängig vom Chromatinzustand.

4 Als Chromatin bezeichnet man den Komplex aus DNA und Proteinen, aus dem die Chromosomen bestehen.

Ascl1 als einer der Schlüssel-Reprogrammierungsfaktoren bei der Generierung von iN-Zellen aus Fibroblasten verhält sich dagegen offenbar fundamental anders als andere Pionier-Transkriptionsfaktoren. Seine Bindungsmuster sind in Fibroblasten wie auch Neuronen sehr ähnlich, trotz sehr unterschiedlichem Chromatinzustand. Ascl1 scheint demnach zusätzlich noch eine weitere Qualität zu haben, in dem Sinne, dass es seine neuronalen Zielstrukturen unabhängig vom Chromatinstadium der Zellen bindet, was auch als On-target-Pionierfaktor-Aktivität („on target pioneer factor activity“) bezeichnet wird.

Pionierfaktor-Aktivität scheint eine gemeinsame Fähigkeit von Reprogrammierungsfaktoren zu sein. Da sie mit „stillem“ Chromatin interagieren und zumindest teilweise Chromatinbarrieren überwinden können, muss ihre Expression während der Entwicklung streng reguliert werden, damit spezifische Zellen sich normal entwickeln können.

Beim Erwerb einer neuen Zelllinienidentität ist es neben der gezielten Induktion von genetischen Programmen des gewünschten Zelltyps ebenso wichtig, dass genetische Programme der Ausgangszellen sowie andere unerwünschte Genprogramme ausgeschaltet werden. In der Tat scheinen die meisten Reprogrammierungsprotokolle die für den Ausgangszelltyp typischen genetischen Programme zunächst zu unterdrücken, bevor sie die Zielzellprogramme aktivieren. Die kontinuierliche Expression exogener Reprogrammierungsfaktoren ist in manchen Fällen sogar die Voraussetzung für die Beibehaltung des neu erworbenen Zustandes der Zellen, die sich andernfalls wieder in Fibroblasten redifferenzieren. Ein Fehler bei der Stilllegung der Expressionsprogramme der ursprünglichen Zellpopulation sowie die Induktion von unerwünschten Programmen könnte unreife Phänotypen erklären, die während der Reprogrammierung auftreten.

Die Zellidentität wird überwiegend durch die Gesamtheit der Genexpression einer Zelle bestimmt, die wiederum über den Grad der Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren durch den Chromatinzustand reguliert wird. Es gibt verschiedene Beispiele dafür, dass Transkriptionsregulatoren mit Chromatin-modifizierenden Faktoren eng zusammenarbeiten und die Remodellierung des Chromatins ermöglichen, welche die Zellidentität prägt. Daher ist es wahrscheinlich, dass epigenetische Mechanismen, die das Chromatin und die Genexpression beeinflussen, auch für die erfolgreiche Reprogrammierung essenziell sind. Bei Fibroblasten konnten Gene, die für die Etablierung von Pluripotenz wichtig sind, durch bestimmte chemische Modifikationen (Methylierungen)

der Histone⁵ unzugänglich gemacht werden, was den Zugang von Reprogrammierungsfaktoren verhindert. Demzufolge können epigenetische Faktoren wichtige Barrieren für die Zellreprogrammierung darstellen. Die direkte Methylierung von DNA ist ein weiterer epigenetischer Regulierungsmechanismus, der zelllinienspezifische Programme stabilisiert. Die Entfernung bestimmter Methylierungen induziert die Differenzierung von Fibroblasten in Muskelzellen, Fettzellen (Adipozyten) und Knorpelzellen (Chondrozyten). Neue Ansätze der sequenzspezifischen Veränderung des Epigenoms könnten es in Zukunft sogar erlauben, Zellen zu reprogrammieren, welche eigentlich durch epigenetische Barrieren verfestigt sind.

Die experimentelle Kontrolle der Zelllinien-Reprogrammierung hat die biomedizinische Forschung in den letzten Jahren revolutioniert. Sie ist ein neues Werkzeug der Forschung geworden und ermöglicht die Untersuchung von Krankheitsmechanismen und therapeutischen Ansätzen für verschiedene Krankheiten, weshalb heutzutage jede größere akademische Institution und fast jede pharmazeutische Firma Stammzellabteilungen unterhält.

Die Möglichkeit, Zelltypen zu reprogrammieren, hat vier sehr wichtige Einsatzbereiche für die Medizin:

1. Wissenschaftler können Haut- oder Blutzellen von Patienten gewinnen und diese in andere Zelltypen umwandeln, die für die Erkrankung relevant sind, um Krankheitsprozesse zu erforschen. So können menschliche Patientenzellen statt Tiermodellen genutzt werden, was der Komplexität der typisch menschlichen Merkmale und Krankheitsmechanismen Rechnung trägt. Allerdings sind Zellen in Zellkultur nicht mit den dreidimensionalen Organen des Körpers vergleichbar und spiegeln die komplexen Interaktionen verschiedener Zelltypen innerhalb eines Organismus nur bedingt wider. Erste Lösungsansätze für dieses Problem werden jedoch bereits erforscht, etwa „Organe auf einem Chip“ („organs on a chip“) oder auch dreidimensionale Organoide (siehe Kapitel 3.5: Bartfeld/Clevers). Darüber hinaus haben pluripotente Stammzellen die Fähigkeit zur Selbstorganisation und bilden frühe embryonale Strukturen, an denen geforscht werden kann.

2. Die Reprogrammierung kann auch genutzt werden, um spezifische Zelltypen von einer großen Gruppe von Patienten zu generieren, die verschiedene genetische Hintergründe aufweisen. An solchen Zellen könnten dann „klinische Versuche in der Petrischale“ („clinical trial in a dish“) durchgeführt und neu entwickelte Medikamente evaluiert werden, bevor die Medikamente an Menschen getestet würden. Dieser Ansatz

5 Histone sind Proteine, die der Verpackung der DNA dienen. Ihre Methylierung verändert den Zustand des Chromatins und dessen Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren.

kann sowohl zur Abschätzung der Effizienz als auch von unerwünschten Nebenwirkungen genutzt werden. Aufgrund der hohen Kosten klinischer Versuche sind solche In-vitro-Testverfahren von großem Interesse für die Medikamentenentwicklung.

3. Viele bereits zugelassene Arzneimittel haben schädliche Nebenwirkungen wie Herzrhythmusstörungen, die in einer kleinen und nicht vorhersagbaren Untergruppe von Patienten auftreten können. Die Methoden der Reprogrammierung können eine Präzisionsmedizin ermöglichen, bei der Medikamente mit bekannten Nebenwirkungen zunächst an reprogrammierten Zellen getestet werden, bevor sie Patienten verabreicht werden. So würden Medikamente, die in einigen Patienten Herzrhythmusstörungen auslösen, zunächst an reprogrammierten Herzmuskelzellen eines individuellen Patienten getestet werden, um herauszufinden, wie dieser Patient reagieren wird.

4. Darüber hinaus ermöglicht die Reprogrammierung auch die Züchtung von neuem Gewebe aus Patientenzellen, das transplantiert werden kann, um abgestorbene oder beschädigte Zellen zu ersetzen. Da es sich hier um autologe Zellen, das heißt um Zellen des gleichen Menschen handelt, könnten so Komplikationen mit der Immunabwehr vermieden werden. Die Reprogrammierung könnte auch mit Gene-Editing-Verfahren (siehe Kapitel 4: Fehse) verbunden werden, um neue therapeutische Ansätze für seltene monogene Erkrankungen oder auch die genetische Manipulation von körpereigenen Zellen zu ermöglichen. Spannend ist für das Ziel des Zellersatzes auch die In-vivo-Reprogrammierung. Statt Zellen in vitro zu reprogrammieren und dann zu transplantieren, könnten sie dabei in vivo direkt reprogrammiert werden, etwa durch Vektoren, die Reprogrammierungsfaktoren direkt in die Zielorgane einschleusen.