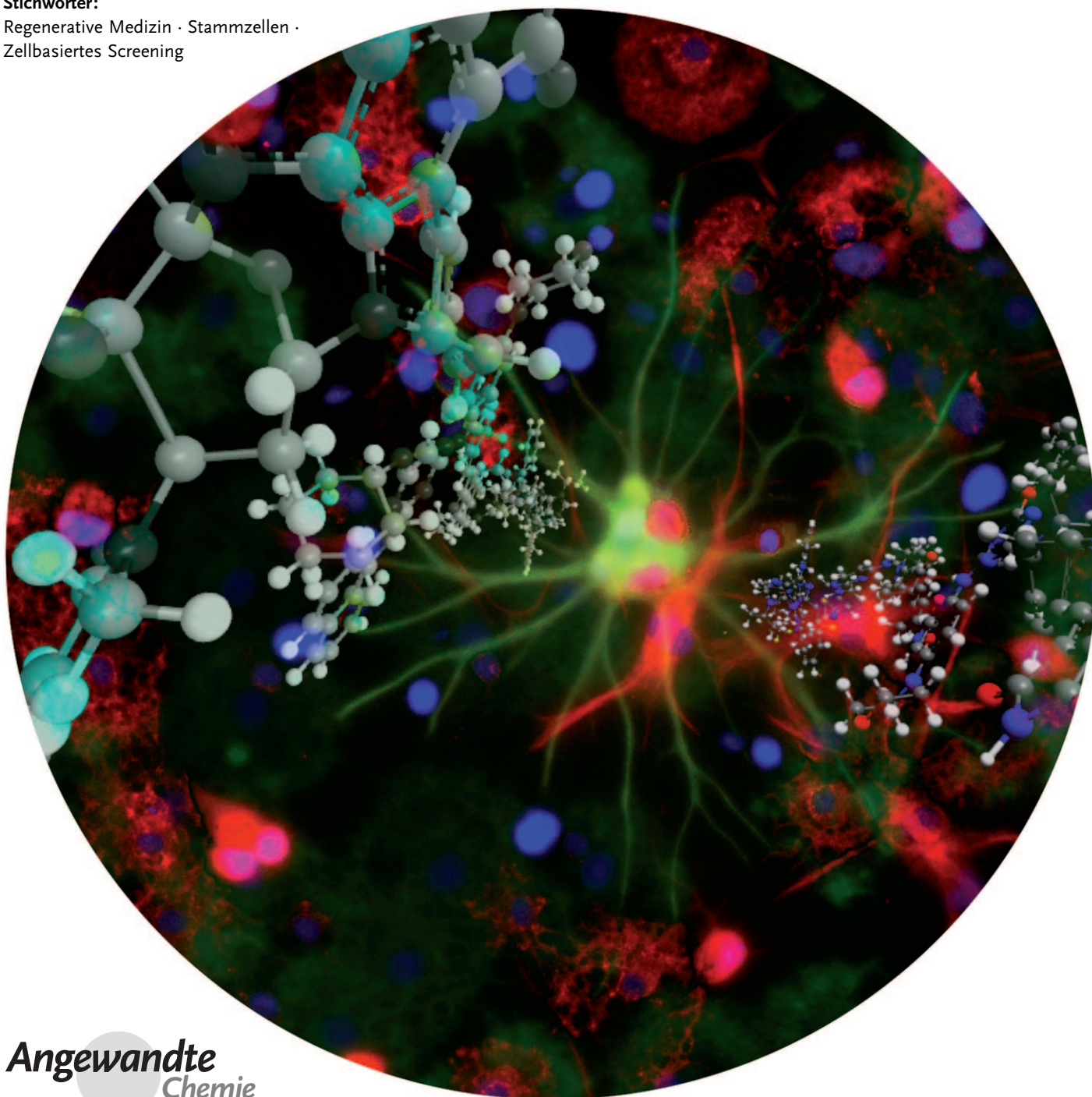


# Chemische Kontrolle des Schicksals und Entwicklungspotenzials von Stammzellen

*Costas A. Lyssiotis,\* Luke L. Lairson, Anthony E. Boitano, Heiko Wurdak, Shoutian Zhu und Peter G. Schultz\**

**Stichwörter:**

Regenerative Medizin · Stammzellen · Zellbasiertes Screening



**M**ögliche Anwendungen von Stammzellen in der Medizin reichen von der Modellierung von Krankheiten und der Wirkstoffsuche bis hin zu Zelltransplantation und regenerativen Therapien. Bevor diese Versprechen jedoch eingelöst werden können, müssen noch einige Hindernisse überwunden werden, unter anderem die Kontrolle der Stammzelldifferenzierung, die allogene Abstoßung und die eingeschränkte Zellverfügbarkeit. Dies erfordert ein vertieftes Verständnis der Mechanismen, die das Stammzellpotenzial kontrollieren, und die Entwicklung robuster Methoden, um das Schicksal von Stammzellen effizient zu steuern. In der letzten Zeit wurden eine Reihe niedermolekularer Verbindungen entdeckt, die *in vitro* und *in vivo* verwendet werden können, um Stammzellen zu expandieren, ihre Differenzierung zu dirigieren oder somatische Zellen in ein naiveres Stadium zu reprogrammieren. Diese Moleküle haben tiefe Einblicke in Signalwege und epigenetische Mechanismen ermöglicht, die die Stammzellbiologie regulieren, und sie beginnen bereits, zur Entwicklung effizienter Behandlungen für Gewebereparatur und –regeneration beizutragen.

## 1. Einleitung

Pluripotente embryonale Stammzellen (ES) stellen eine unerschöpfliche Quelle von Zellen dar, die theoretisch in jeden gewünschten Zelltyp differenziert werden können.<sup>[1]</sup> Beispiele sind Kardiomyozyten für kardiovaskuläre Erkrankungen, Nervenzellen für neurodegenerative Erkrankungen, Muskel und Knorpel für genetische oder altersbedingte Skelettmuskelschäden und Pankreas- $\beta$ -Zellen für Diabetes. Die direkte Injektion von ES-Zellen in einen Wirt löst allerdings Tumorbildung aus. Dementsprechend müssen pluripotente ES-Zellen in die gewünschten Gewebe oder eine spezifische Zellpopulation differenziert werden, bevor sie sicher und effizient in klinischen Anwendungen zum Einsatz kommen können. Die Entwicklung einer Zellersatztherapie erfordert also effiziente und reproduzierbare Methoden, um ES-Zellen zu expandieren und ihre Differenzierung in einen gewünschten Zelltyp zu induzieren. Niedermolekulare Verbindungen bieten hier eine mögliche Lösung.<sup>[2]</sup> Im Gegensatz zu den meisten genetischen Methoden sind niedermolekulare Verbindungen in der Lage, spezifische Funktionen eines einzelnen Proteins (oder mehrerer Proteine) mit ausgezeichneter zeitlicher Kontrolle zu beeinflussen. Dies ist eine besonders nützliche Eigenschaft für die Stammzellbiologie, wo die Differenzierung in eine bestimmte Abstammungslinie durch eine besondere Sequenz zellulärer Ereignisse kontrolliert wird. Ein anderer Vorteil niedermolekularer Verbindungen ist, dass mit ihnen schnell der Übergang von Primärzellen zu *In-vivo*-Modellen gelingt, um biologische Hypothesen im komplexen Zusammenhang des gesamten Organismus zu testen. Niedermolekulare Verbindungen können auch als nützliche Sonden für die Erforschung der Mechanismen dienen, die das Entwicklungspotenzial und das Zellschicksal kontrollieren.

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	211
2. Grundsätzliches zu Stammzellen	212
3. Chemische Ansätze zur Identifizierung niedermolekularer Verbindungen, die die Entwicklungsrichtung von Stammzellen steuern	214
4. Signalwege für die Entwicklung	216
5. Chemische Kontrolle des Entwicklungspotenzials embryonaler Mäusestammzellen	219
6. Chemische Kontrolle des Entwicklungspotenzials humaner ES-Zellen	226
7. Chemische Kontrolle des Entwicklungspotenzials somatischer Stammzellen	229
8. Chemische Kontrolle zellulärer Plastizität: Entdifferenzierung und Reprogrammierung	237
9. Funktionale Proliferation reifer Zellen	244
10. Chemische Kontrolle von Krebsstammzellen	246
11. Schlussbemerkungen und Ausblick	249

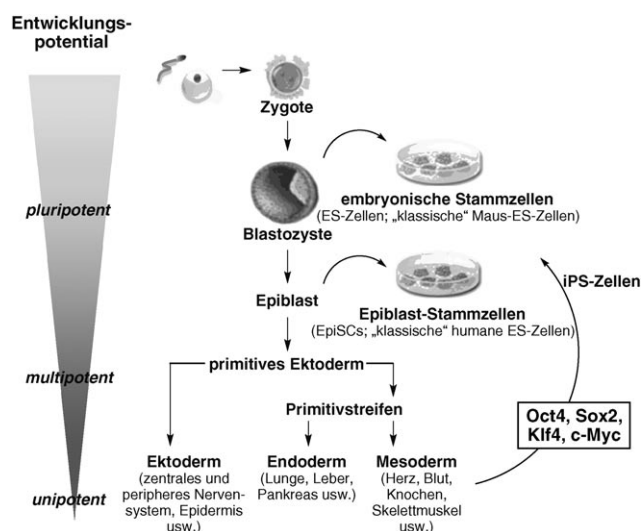
Neben embryonalen Stammzellen können auch andere Zellquellen eine Basis für regenerative und verwandte Therapien bilden. So werden Moleküle identifiziert, die 1) die Expansion, das Homing und/oder die Differenzierung multipotenter Stammzellen, die auch im adulten Organismus persistieren (somatische Stammzellen) regulieren, 2) die somatischen Zellen in weniger differenzierte Zellen revertieren, die dann in unterschiedliche Entwicklungsrichtungen weitergeleitet werden, 3) die selektiv tumorigenitierende stammzell-

[\*] Dr. C. A. Lyssiotis, Dr. H. Wurdak, Dr. S. Zhu, Dr. P. G. Schultz  
Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical  
Biology, The Scripps Research Institute  
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Fax: (+1) 858-784-9440  
E-Mail: costas@lyssiotis.com  
schultz@scripps.edu  
Dr. L. L. Lairson, Dr. A. E. Boitano  
The Genomics Institute of the Novartis Research Foundation  
10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, CA 92121 (USA)

ähnliche Populationen verschiedener Krebsarten angreifen oder differenzieren und 4) die den reversiblen Wiedereintritt terminal differenzierter Zellen (z.B. von  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse oder Kardiomyozyten) in den Zellzyklus fördern. In diesem Aufsatz schildern wir die aufregenden Möglichkeiten, die sich Chemikern bei der Erforschung der komplexen Biologie bieten, die das Schicksal und Verhalten von Zellen bestimmt.

## 2. Grundsätzliches zu Stammzellen

Stammzellen sind unspezialisierte Vorläuferzellen mit der Fähigkeit, im undifferenzierten Zustand zu verharren und als Reaktion auf geeignete Signale in spezialisierte Zellen zu differenzieren. Wenn eine Stammzelle proliferiert, kann daraus eine Tochterzelle entstehen, die mit der Mutterzelle identisch ist (symmetrische Teilung), oder es entsteht eine Zelle mit eingeschränktem Entwicklungspotenzial (asymmetrische Teilung).<sup>[3]</sup> Die symmetrische Teilung wird auch als Selbsterneuerung bezeichnet und ist für die Erhaltung der Stammzellidentität verantwortlich. Demgegenüber ist das Ergebnis der asymmetrischen Teilung die Spezialisierung einer Linie in einen differenzierteren Zelltyp. Es ist üblich, Stammzellen nach ihrem Differenzierungspotenzial zu klassifizieren (Abbildung 1). Aus ES-Zellen können beispielsweise alle Zelltypen entstehen, die in den drei primären Keimblättern des Embryos (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) vorkommen, und werden deshalb als pluripotent eingestuft.<sup>[1]</sup> Gewebespezifische Stammzellen (auch somatische oder adulte Stammzellen genannt) kommen in differenzierten Geweben und Organen vor. Aus ihnen können alle Zelltypen innerhalb einer bestimmten Abstammungslinie hervorgehen (z.B. können sich hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark zu allen Blutzelllinien differenzieren). Entsprechend werden somatische Stammzellen als multipotent klassifiziert. Inzwischen mehren sich die Hinweise, dass es auch bei manchen Krebsarten ähnlich wie in Organen und Organismen eine zelluläre Hierarchie gibt.<sup>[4]</sup> An der Spitze dieser Hierarchie stehen Krebsstammzellen, die wie normale Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung besitzen.



**Abbildung 1.** Entwicklung eines Säugetierorganismus: hierarchische Darstellung, die den graduellen Rückgang des Entwicklungspotenzials verdeutlicht, der mit der Differenzierung von einer totipotenten Zygote zu den postmitotischen somatischen Zellen einhergeht, aus denen ein adulter Organismus besteht. Pluripotente Zellen in Kultur können gewonnen werden 1) aus der inneren Zellmasse des Blastozysten (ES-Zellen), 2) vom Epiblasten (EpiSCs) oder 3) durch Reprogrammierung differenzierter Zellen mit Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc (iPS-Zellen).

### 2.1. Epigenetik und Eigenschaften der Abstammungslinien

Die Differenzierung von Stammzellen in eine bestimmte Abstammungslinie während der Zellentwicklung erfolgt als Ergebnis einer gewebespezifischen Genaktivierung und Stummschaltung von Genen für die Stammzeleigenschaft und solchen, die mit anderen Schicksalen der Zellen verbunden sind. Eine Stammzelle tut dies, indem sie ein definiertes und erbliches Genexpressionsmuster auf eine Tochterzelle überträgt, ohne die primäre DNA-Sequenz zu verändern.<sup>[5]</sup> Vielmehr führen Veränderungen in der übergeordneten Chromatinstruktur zu einer differenzierten Zugänglichkeit der primären DNA-Sequenz zur Transkriptionsmaschinerie. Die molekularen Einzelheiten dieses Vorgangs umfassen die Reorganisation der Chromatin-Architektur (also Remodellierung der Nukleosomen, Kom-



Costas Lyssiotis studierte Chemie und Biochemie an der University of Michigan (B.S. 2004) und promovierte mit einem NSF-Stipendium 2010 unter Anleitung von Prof. Peter Schultz am Scripps Research Institute. Seine Forschung galt der Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, die die Entwicklungsrichtung von Zellen reprogrammieren. Anschließend wechselte er als Damon Runyon Postdoctoral Fellow in die Gruppe von Lewis Cantley an der Harvard Medical School, wo er sich mit der Aufklärung biochemischer Signalwege und Stoffwechselerfordernisse der Zellproliferation befasst wird.



Peter Schultz promovierte 1984 am Caltech und forschte anschließend in Berkeley (ab 1985) und am Scripps Research Institute (ab 1999), wo er gegenwärtig Scripps Family Chair Professor of Chemistry ist. Er befasst sich mit chemischen und genomischen Untersuchungen zur Stammzellbiologie, der Entwicklung neuer Therapeutika für seltene Krankheiten und der Entwicklung und Anwendung von Methoden, um neue Bausteine in den genetischen Code von Organismen einzufügen. Er ist Mitbegründer mehrerer Unternehmen und wurde mehrfach ausgezeichnet, unter anderem mit dem Alan T. Waterman Award (NSF), dem Wolf-Preis in Chemie, dem Paul-Ehrlich-Preis und dem Arthur C. Cope-Preis.



partmentierung und Dynamik des Zellkerns) und chemische Veränderungen des Chromatins, einschließlich der Methylierung der DNA und einer Reihe posttranslationaler Histonmodifikationen.<sup>[6]</sup> Gemeinsam bestimmen diese Prozesse die Genexpression und in der Konsequenz die Spezifikation der Zelle bzw. der Abstammungslinie. Obwohl also die überwiegende Masse der Zellen in einem vielzelligen Organismus einen identischen Genotyp hat, erzeugt die Entwicklung des Organismus eine Diversität von Zelltypen mit unterschiedlichen, aber stabilen Genexpressionsprofilen und unterschiedlichen Zellfunktionen. Bei der Analyse dieser Prozesse entstand das Feld der Epigenetik; die Spezifikation der einzelnen Linien kann als epigenetisches Phänomen betrachtet werden, das eine bestimmende Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellidentität während der Entwicklung und der Lebenszeit eines Organismus spielt.

## 2.2. Pluripotente Stammzellen

ES-Zellen, die aus dem Embryoblasten eines sich entwickelnden Embryos stammen, sind das klassische und am besten untersuchte Beispiel pluripotenter Zellen. Es gibt allerdings noch eine Reihe anderer pluripotenter Zelltypen, ebenso wie es zahlreiche Methoden gibt, solche Zellen abzuleiten oder zu erzeugen. In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf drei Arten pluripotenter Stammzellen: ES-Zellen aus dem Embryoblasten, aus dem Epiblasten (EpiSCs) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) (Abbildung 1). Ein umfassenderer Überblick über pluripotente Stammzellen und ihre Erzeugung oder Ableitung kann aus mehreren ausgezeichneten Aufsätzen gewonnen werden.<sup>[7]</sup>

Die Bedeutung embryonaler Stammzellen für die moderne Biologie und Medizin rührt von zwei einzigartigen Eigenschaften her, die sie von allen anderen Stammzellen unterscheiden. Erstens können sie als reine Population undifferenzierter Zellen über einen ausgedehnten Zeitraum, möglicherweise auf Dauer, in Kultur gehalten und vermehrt werden. Anders als transformierte Tumorzelllinien behalten ES-Zellen auch nach zahlreichen Passagen in Kultur einen normalen Karyotyp. Zweitens besitzen sie die Fähigkeit, jeden der mehr als 200 verschiedenen Zelltypen, die einen erwachsenen Organismus ausmachen, zu erzeugen, außerdem auch die vielen transienten Zelltypen, die während der Entwicklung entstehen.<sup>[1,8]</sup> Untersuchungen während der letzten 20 Jahre haben Kulturbedingungen und Protokolle hervorgebracht, um eine Reihe dieser Entwicklungslinien *in vitro* anzusteuern.<sup>[9]</sup> Mit den unterschiedlichen Zelltypen, die man aus ES-Zellen gewinnen konnte, erhielt man die Möglichkeit, die Embryonalentwicklung im Labor zu modellieren und die Ereignisse zu untersuchen, die die frühesten Stadien der Induktion und Spezifikation von Zelllinien regulieren. Zusätzlich zum Modellcharakter für die frühe Embryonalentwicklung wird das Differenzierungssystem von ES-Zellen von vielen Wissenschaftlern als neue unbegrenzte Quelle für Zellen und Gewebe für Transplantationen angesehen, mit denen theoretisch ein weites Spektrum von Krankheiten behandelt werden kann.

Während Mäuse-ES-Zellen schon seit Jahrzehnten eingesetzt werden,<sup>[10]</sup> ist die Gewinnung und routinemäßige Verwendung von humanen ES-Zelllinien erst in jüngster Zeit erforscht worden.<sup>[11]</sup> Dies lag zum Teil daran, dass menschliche ES-Zellen andere Kulturbedingungen als Maus-ES-Zellen erfordern, um den pluripotenten Status zu erhalten. So reagieren Maus-ES-Zellen auf LIF (Leukämieinhibitionsfaktor; leukemia inhibitory factor) und BMP (knochenmorphogenes Protein; bone morphogenic protein) und werden daher in Medien gehalten, die diese Faktoren enthalten.<sup>[12]</sup> Demgegenüber reagieren menschliche ES-Zellen nicht auf LIF, sondern benötigen FGF (Fibroblastenwachstumsfaktor; fibroblast growth factor) und eine Activin/Nodal-Signalisierung, um den undifferenzierten Zustand aufrechtzuerhalten.<sup>[11,13]</sup> Außerdem ist die Anwendung humaner embryonaler Stammzellen Gegenstand ethischer und gesellschaftspolitischer Debatten.<sup>[14]</sup>

Zunächst hatte man angenommen, dass die Unterschiede zwischen humanen und murinen ES-Zellen auf speziesspezifischen Mechanismen für die Erhaltung des pluripotenten Zustands beruhen. Inzwischen geht man davon aus, dass sich die Zellen, aus denen die ES-Zellen bei Mäusen und Menschen stammen, nicht im selben Entwicklungsstadium befinden (Abbildung 1).<sup>[7d]</sup> Gestützt wurde diese Hypothese durch aktuelle Befunde, wonach selbsterneuernde, pluripotente Zelllinien aus dem späten Epiblasten von Mäuseembryonen nach der Implantation gewonnen wurden. Diese Zellen, EpiSCs genannt, verhalten sich in mehrfacher Hinsicht viel mehr wie menschliche ES-Zellen als die üblichen aus dem Embryoblasten stammenden Maus-ES-Zellen, vor allem in ihren Genexpressionsmustern und der Reaktion auf Signale.<sup>[15]</sup> Die Entwicklung eines alternativen pluripotenten Mauszelltyps, der den menschlichen ES-Zellen besser entspricht, wird die Übertragung von Befunden in der Maus auf den Menschen spürbar verbessern. Da humane und murine ES-Zellen aus verschiedenen Stadien abgeleitet sind, gibt es wahrscheinlich kaum Überlappungen zwischen niedermolekularen Verbindungen, die als Wirkstoffe zur Kontrolle des Zellpotenzials agieren.

Außer aus Embryos können pluripotente Stammzellen auch direkt aus differenzierten Zellen gewonnen werden, indem spezielle Kombinationen von Transkriptionsfaktoren überexprimiert werden. Bei diesen Zellen wurde die Pluripotenz induziert, entsprechend werden sie als iPS-Zellen bezeichnet.<sup>[16]</sup> Solche Zellen sind in vielen Aspekten mit ES-Zellen identisch. So reagieren sie auf stadienspezifische Entwicklungssignale für bestimmte Zelllinien und können sich zu vollständigen Organismen entwickeln, wenn sie in einen sich entwickelnden Embryo verpflanzt werden.<sup>[7a,17]</sup> Die Technologie zur Erzeugung von iPS-Zellen hat große Aufmerksamkeit erregt, denn sie kann leicht eingesetzt werden, um krankheitsspezifische pluripotente Zelllinien zu erzeugen.<sup>[18]</sup> Solche Linien werden inzwischen benutzt, um Einsetzen und Fortschreiten von Erkrankungen *in vitro* zu verfolgen; sie dienen dabei als Ersatz für transgene Tiermodelle für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Außerdem haben iPS-Zellen das Interesse an der Erstellung patientenspezifischer pluripotenter Zellbanken neu geweckt, da sie die gesell-

schaftspolitischen Diskussionen um menschliche embryonenstammige Zellen umgehen.

### 2.3. Multipotente Stammzellen

Multipotente Stammzellen finden sich unter den differenzierten Zellen in einem Gewebe oder Organ. Während der Lebenszeit eines Organismus spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, indem sie für die Bildung neuer Zellen in dem Gewebe oder Organ sorgen, aus dem sie stammen und in dem sie sich befinden. Aus diesen Gründen werden sie auch als gewebespezifische, adulte oder somatische Stammzellen bezeichnet. Das Differenzierungspotenzial somatischer Stammzellen ist beschränkt auf die spezialisierten Zelltypen des Gewebes oder Organs, in dem sie sich befinden. So entwickeln sich aus den aus dem Knochenmark stammenden hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) verschiedene Blutzellen (z.B. rote und weiße Blutkörperchen).<sup>[19]</sup> Andere gut charakterisierte somatische Stammzellen gibt es im Gehirn (neuronale Stammzellen, NSCs),<sup>[20]</sup> im Knochenmarkstroma (mesenchymale Stammzellen, MSCs),<sup>[21]</sup> im Skelettmuskel (Satellitenzellen)<sup>[22]</sup> und im Epithel des Verdauungstraktes.

Verschiedene Eigenschaften somatischer Stammzellen machen sie zu einer attraktiven Alternative zu pluripotenten Stammzellen für den Einsatz in zellbasierten Therapien. Anders als pluripotente Zellen sind sie beispielsweise nicht generell tumorerzeugend, wenn sie transplantiert werden. Sie können auch direkt von einem Patienten für eine spätere autologe Therapie isoliert werden, wodurch sich Probleme mit der Gewebeverträglichkeit umgehen lassen. Somatische Stammzellen haben ex vivo allerdings eine begrenzte Lebensdauer, und ihre Reaktion auf Differenzierungssignale nimmt in Kultur mit jeder Generation ab. Mit den experimentellen Routineprotokollen lassen sich die Zellen nur einige Wochen in Kultur halten. Erhebliche technische Probleme gibt auch bei der Isolierung somatischer Stammzellen aufgrund ihrer eingeschränkten Verbreitung (z.B. im Gehirn) und ihrer relativ geringen Zahl (HSCs machen nur 1 von 10000 Knochenmarkszellen aus). Nichtsdestotrotz erfolgte der erste klinische Einsatz von Stammzellen mit allogenen Knochenmarkstransplantaten von HSCs, eine Strategie, die inzwischen routinemäßig bei verschiedenen Bluterkrankungen verfolgt wird.<sup>[19]</sup>

### 2.4. Tumorstammzellen

Krebszellen in manchen Tumoren (z.B. bei akuter myeloischer Leukämie) sind heterogen und bestehen aus verschiedenen Typen differenzierter und undifferenzierter Zellen. Das Auftreten verschiedener Differenzierungsstadien bei solchen Tumoren stützt die Hypothese eines hierarchischen Modells bei einigen Krebsarten.<sup>[4a,b]</sup> An der Spitze dieser Hierarchie stehen die am wenigsten differenzierten Zellen. Diese Zellen initiieren die Tumorbildung und werden für den Rückfall nach einer Behandlung verantwortlich gemacht. Solche tumorinitiierenden Zellen, verbreitet auch

Krebsstammzellen (CSCs) genannt, besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und der Differenzierung in Zellen des Tumorgewebes.<sup>[4c-e]</sup> CSCs haben auch andere Charakteristika mit normalen Stammzellen gemeinsam, unter anderem eine lange Lebensdauer, eine gedämpfte Stoffwechselaktivität, Resistenz gegenüber Wirkstoffen und Toxinen durch die Expression von Multiwirkstoffresistenztransportern, eine hohe DNA-Reparatur-Kapazität und Resistenz gegen Apoptose. Konsequenterweise werden die Erkenntnisse aus der Stammzellbiologie nun auf die Untersuchungen und die Behandlung von Krebs übertragen.<sup>[23]</sup>

## 3. Chemische Ansätze zur Identifizierung niedermolekularer Verbindungen, die die Entwicklungsrichtung von Stammzellen steuern

Niedermolekulare Verbindungen mit gut charakterisierten biologischen Aktivitäten und Wirkmechanismen können in einem hypothesengetriebenen, auf eine Zielstruktur gerichteten Ansatz benutzt werden, um das Entwicklungspotenzial und die Entwicklungsrichtung von Stammzellen zu untersuchen. Zu den Beispielen gehören Moleküle, die gegen epigenetisch modifizierende Enzyme und entwicklungspezifische Signalwege gerichtet sind. Dieser zielorientierte Ansatz hat sich als äußerst wertvoll erwiesen, um Einblicke in die komplexen Regelkreise der Entwicklungs- und Stammzellbiologie zu gewinnen. Er wird jedoch dadurch eingeschränkt, dass man vorab die an den zu untersuchenden biologischen Vorgängen beteiligten molekularen Stoffwechselwege kennen muss. Dies ist besonders in der Stammzellbiologie ein Problem, weil hier die biologischen Mechanismen noch weithin unbekannt sind. Ein alternativer Ansatz beruht auf zellbasierten phänotypischen oder Signalweg-orientierten Durchmusterungen chemischer Bibliotheken, um Moleküle zu identifizieren, die die Biologie der Stammzellen in definierter Weise beeinflussen.<sup>[2,24]</sup> Ungerichtet durchgeführt lassen zellbasierte Suchläufe dieser Art die Identifizierung neuer Gene und Signalwege erwarten, die die Entwicklungsrichtung der Zellen steuern.

### 3.1. Entwurf eines Hochdurchsatz-Screenings

Eine ganze Reihe von Testformaten wurde entwickelt, um Moleküle zu finden, die das Schicksal der Stammzellen beeinflussen; sie variieren stark in ihrer Skalierbarkeit und ihrem Maß an Komplexität. So sind relativ einfache zelluläre Tests mit einem Reportergen, in denen die Expression eines lumineszierenden oder eines fluoreszierenden Reportergens durch den Promotor des interessierenden Gens (in der entsprechenden Wirtszelle) gesteuert wird, besonders geeignet, um große Verbindungsbibliotheken zu durchmustern. Bei solchen promotorgetriebenen Screeningansätzen sind allerdings robuste Sekundärtests notwendig, um die große Zahl falsch positiver Treffer oder nichtspezifischer Moleküle, die mit solchen Methoden gefunden werden, zu reduzieren.<sup>[25]</sup> Alternativ können multiparametrische High-Content-Tests mit Bildauswertung verwendet werden, in denen die Para-

meter, die mit einem gewünschten Phänotyp assoziiert sind (z.B. Anwesenheit mehrerer Immunfluoreszenzmarker, Zellmorphologie, Organellenlokalisierung usw.), simultan auf Einzelzellebene analysiert werden. Allerdings sind diese Verfahren meist zeitaufwändiger und teurer. Sie wurden auch bereits auf der Ebene eines ganzen Organismus (z.B. Zebrafisch) durchgeführt, doch werden dabei vergleichsweise große Mengen an Testsubstanz benötigt. Eine ausführlichere Diskussion über die Strategien des Hochdurchsatz-Screenings übersteigt den Rahmen dieses Aufsatzes, doch es liegen bereits einige Übersichten zu diesem Gebiet vor.<sup>[26]</sup>

Substanzbibliotheken mit niedermolekularen Verbindungen reichen von den großen Sammlungen zur Entdeckung von Leitstrukturen (> 2 Millionen Verbindungen), die in der pharmazeutischen Industrie verwendet werden, bis zu kleineren (< 10000 Verbindungen), eingegrenzten Sammlungen (z.B. bekannte Wirkstoffe, Naturstoffbibliotheken, bekannte Kinaseinhibitoren usw.), die typischerweise im akademischen Umfeld eingesetzt werden. Die Zahl der Verbindungen, die mit einem bestimmten Testsystem durchmustert wird, hängt meistens von den Kosten und der Verfügbarkeit der Reagentien und dem Grad der Miniaturisierung, die auf einer bestimmten Screening-Plattform möglich ist, ab. Organismenbasierte Screenings oder Tests mit Primärzellen sind durch die Verfügbarkeit von Zellen bzw. Organismen begrenzt und werden daher oft gegen fokussiertere Substanzsammlungen gescreent. Immortalisierte Zelllinien, die leicht in ein 384er oder 1536er Mikrotiterplattenformat miniaturisiert werden können, werden andererseits oft gegen sehr umfangreiche Bibliotheken gescreent. Diese großen Screeningansätze werden allerdings meist nur im Einzeldosisformat durchgeführt, wodurch der gewünschte Phänotyp durch antiproliferative oder andere Nebeneffekte überdeckt werden kann.

Verschiedene Argumente wurden eingebracht bezüglich der chemischen Diversität und der Struktur motive, die in chemischen Bibliotheken vertreten sein sollten. Die Möglichkeiten reichen von komplexen Naturstoffen<sup>[27]</sup> bis zu den einfacheren Heterocyclen (z.B. Purinen, Benzimidazolen, Benzothiazolen, Indolen, Chinazolen, Chinolinen und anderen „privilegierten“ Gerüsten),<sup>[28]</sup> die in vielen Wirkstoffen vorkommen.<sup>[29]</sup> Letztere haben den Vorteil, präparativ gut zugänglich zu sein; außerdem gibt es bereits umfangreiche pharmakologische Informationen. Diese Umstände erleichtern die Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen für eine affinitätsbasierte Identifizierung der Zielstruktur und die schnelle chemische Optimierung zur Verbesserung von Selektivität und pharmakokinetischen Eigenschaften, die für In-vivo-Studien notwendig sind. Unsere Erfahrung ist, dass Heterocyclen-Bibliotheken eine außergewöhnlich reiche Quelle selektiver und wirksamer Kandidaten sind, deren Eigenschaften schnell optimiert werden können.

Außer niedermolekularen Verbindungen lassen sich auch Proteinbibliotheken auf Chips (z.B. sezernierte Proteine, Antikörper usw.) einfach in dem oben beschriebenen Testformat durchmustern. So haben wir jüngst einen durchsatzstarken Prozess entwickelt, mit dem wir eine Bibliothek sezernierter Proteine in Säugerzellen exprimierten, reinigten und in 384er Titerplatten für verschiedene biologische Tests

anordneten.<sup>[30]</sup> Im Unterschied zu großen chemischen Bibliotheken besteht das gesamte sezernierte Proteom aus nur einigen Tausend Proteinen und kann so einfach in multiparametrischen Tests mit Primärzellen oder ganzen Organismen mit niedrigem Durchsatz durchsucht werden. Der Einsatz dieser und ähnlicher Plattformen eröffnete neue Einblicke in die Wirkungsweise natürlicher Faktoren, die das Zellschicksal steuern und eine zusätzliche Quelle therapeutischer Kandidaten für die regenerative Medizin bieten.<sup>[30,31]</sup>

### 3.2. Der Wirkungsmechanismus niedermolekularer Verbindungen

Ungerichtete zellbasierte Screenings sind eine wirkungsvolle Strategie, um neue Wege zu identifizieren, die komplexe zelluläre Prozesse regulieren; sie stellen jedoch eine Herausforderung dar, wenn der genaue Mechanismus aufgeklärt werden soll, nach dem ein Molekül seine Wirkung entfaltet. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen niedermolekularer Verbindungen wird durch eine Reihe von Umständen verkompliziert.<sup>[25b]</sup> So können interessierende Verbindungen mit irrelevanten Zielstrukturen wechselwirken, was die Analyse erschwert.<sup>[32]</sup> Die gefundenen Moleküle können auch relativ geringe Wirksamkeit oder Löslichkeit haben, zytotoxisch sein oder eine schlechte Pharmakokinetik zeigen. Daher sind normalerweise detaillierte Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen erforderlich, um die Eigenschaften eines Moleküls zu optimieren und seinen Wirkmechanismus zu bestimmen.

#### 3.2.1. Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays kann hilfreiche Informationen über die Mechanismen liefern, die der Aktivität einer niedermolekularen Verbindung zugrunde liegen.<sup>[33]</sup> In der Praxis werden Zellen mit aktiven und strukturell ähnlichen inaktiven Analoga behandelt und anschließend die Genexpressionssignatur analysiert. Gene, deren Expressionsspiegel durch die Behandlung mit niedermolekularen Verbindungen verändert wird (und die durch das eng verwandte inaktive Analogon nicht beeinflusst werden), werden identifiziert und die Signalwege oder -netzwerke, die mit diesen Veränderungen zusammenhängen, durch bioinformatische Analyse bestimmt. Die osteogene Aktivität von Purmorphamin kommt beispielsweise durch die Aktivierung der Hedgehog(Hh)-Signalkaskade zustande: Man konnte beobachten, dass Purmorphamin eine Reihe bekannter Hh-Signalgene induziert.<sup>[33,34]</sup> Davon ausgehend wurde später die biologische Zielstruktur von Purmorphamin, nämlich der Hh-Rezeptor Smoothened (Smo) gefunden.<sup>[35]</sup> Wenig später wurde mit einem ähnlichen Ansatz der relevante Angriffspunkt von StemRegenin 1 (SR1) identifiziert, einer Verbindung, die die Selbsterneuerung von HSCs fördert. Hier ergab die Genexpressionsanalyse, dass verschiedene Zielstrukturen unmittelbar stromabwärts vom Aryl-Kohlenwasserstoffrezeptor (aryl hydrocarbon receptor, AhR) in Gegenwart von SR1 unterschiedlich exprimiert wurden.<sup>[36]</sup> Anschließend wurde die direkte Wechselwirkung

zwischen SR1 und AhR mit biochemischen Methoden bestätigt.

### 3.2.2. Funktionales genomisches Screening

Funktionales genomisches Screening, unter anderem auf Funktionsgewinn mit cDNA („gain-of-function“) und auf Funktionsverlust mit RNAi („loss-of-function“), wird vielfach benutzt, um Genprodukte zu identifizieren, die an den interessierenden biologischen Prozessen beteiligt sind. Die Hits in diesem Screening sind Proteine oder miRNAs, die sich auf der Screening-Platte leicht identifizieren lassen. Daher stellen genomische Screening-Ansätze einen alternativen Zugang dar, um niedermolekulare Verbindungen mit einem bestimmten Phänotyp in Fällen zu identifizieren, in denen der Durchsatz begrenzt ist (z. B. beim Screening mit ganzen Organismen oder mit seltenen Primärzellen). In diesen Fällen kann das genomische Screening zur Identifizierung eines neuen Targets dienen, und in einem zweiten Schritt kann ein bekannter Wirkstoff oder eine bioaktive Verbindung verwendet werden, um die Aktivität des untersuchten Proteins zu modulieren. Ein Beispiel für einen solchen Ansatz stammt von Wurdak et al., die eine kleine Sammlung von shRNAs, die mit Kinasen wechselwirken, gegen tumorinitiierende Gliomazellen einsetzten. In diesem Test wurde eine Anzahl von Genen identifiziert, deren Ausschaltung das Zellwachstum verhindert.<sup>[37]</sup> Anhand der gewonnenen Liste von Zielgenen wurden dann Kinaseinhibitoren ausgewählt, die anstelle der shRNAs verwendet werden konnten (detaillierte Diskussion siehe Abschnitt 10.3.2). In diesem Fall wurden wirkstoffähnliche niedermolekulare Verbindungen mit der gewünschten biologischen Aktivität über eine genomische Screening-Plattform identifiziert, die für ein Hochdurchsatz-Screening nicht geeignet waren.

### 3.2.3. Affinitätsbasierte Identifizierung der Zielstrukturen

Auch affinitätsbasierte Ansätze mit festen Matrizen oder photoaktiven Linkern können für das Screening von niedermolekularen Verbindungen genutzt werden. In ersterem Fall wird die betreffende Verbindung über einen flexiblen, inerten Linker (z. B. Polyethylenglycol) an einer festen Matrix immobilisiert. Die Verknüpfung erfolgt an einer Gruppierung des Moleküls, deren Derivatisierung die Aktivität der Verbindung nicht beeinträchtigt. Proteine, die an die immobilisierte Verbindung binden, können aus dem Zelllysat (typischerweise in Gegenwart oder Abwesenheit eines freien Kompetitors) isoliert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Färbung mit Coomassie-Blau oder Silber sichtbar gemacht werden. Eine Identifizierung ist danach durch LC/MS/MS möglich. Auf diesem Wege haben wir tatsächlich bereits Zielproteine für niedermolekulare Regulatoren der Zellentwicklung identifiziert, darunter Pluripotin,<sup>[38]</sup> Reversin<sup>[39]</sup> und TWS119.<sup>[40]</sup>

Zellpermeierende Affinitätssonden (z. B. mit einem Biotin-Ende oder einem Alkin-Rest für die Klick-Chemie) sind weit verbreitet; sie ermöglichen eine Bindung der Sonde an ihr Ziel in der lebenden Zelle. In manchen Fällen ist dies entscheidend, da die Wechselwirkung zwischen Verbindung

und Target bei der Zelllyse aufgelöst wird. So identifizierten wir als Angriffspunkt von Stauprimid das Protein NME-2 (non-metastatic cell protein expressed in-2), indem wir ein biotinyliertes Stauprimid-Analogon in ES-Zellkulturen inkubierten.<sup>[41]</sup> Strategien, die die Wechselwirkung zwischen einem kleinen Molekül und seinem Target kovalent fixieren (z. B. durch photoaktivierte Vernetzung), können besonders bei niedriger Affinität zwischen Verbindung und Zielstruktur hilfreich sein.<sup>[42]</sup> Allerdings behalten nicht alle niedermolekularen Verbindungen ihre Aktivität, wenn man eine Affinitätsmarkierung anbringt. Unter diesen Umständen bietet die Markierung mit radioaktiven Isotopen eine Alternative, mit der das Zielprotein einer bestimmten Substanz auf denaturierenden Gelen bei kovalenter Wechselwirkung und auf nicht-denaturierenden Gelen oder durch chromatographische Fraktionierung (bei nicht-kovalenter Wechselwirkung) sichtbar gemacht werden kann. Die Identifizierung des Inhibitorproteins der Raf-Kinase (RKIP) als Zielprotein von Locostatin ist ein Beispiel für diese Strategie.<sup>[43]</sup>

Die biologische Funktion potentieller Targets muss validiert werden, vor allem, wenn mehrere Targets für eine einzige niedermolekulare Verbindung gefunden werden. Dies kann mit Verfahren der funktionellen Genomik wie Protein-Überexpression mit Gain-of-Function, Protein-Knockdown mit Loss-of-Function und/oder konstitutiv aktiven und dominant negativen Mutanten erreicht werden. Die Modulation der Aktivität eines Proteins durch eine Verbindung in lebenden Zellen kann mit Enzymtests (z. B. auf Kinaseaktivität in Baf-Zellen)<sup>[44]</sup> oder durch die Bestimmung der Phosphorylierung stromabwärts gelegener Signalkomponenten durch Western-Blot analysiert werden. Und schließlich kann die physikalische Wechselwirkung zwischen den Proteinen und der Verbindung mit biochemischen Verfahren wie Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) oder In-vitro-Enzymtests bestimmt werden.

## 4. Signalwege für die Entwicklung

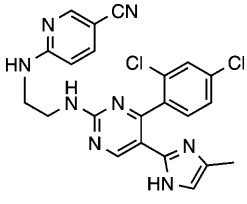
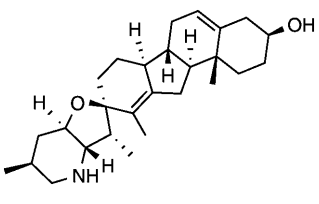
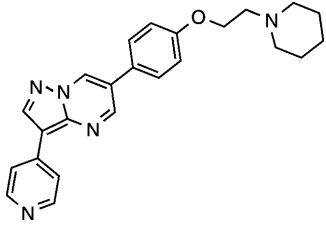
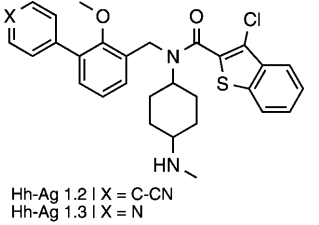
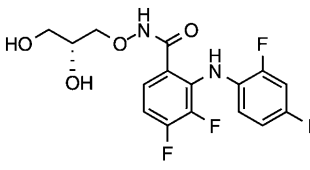
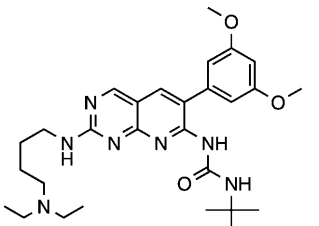
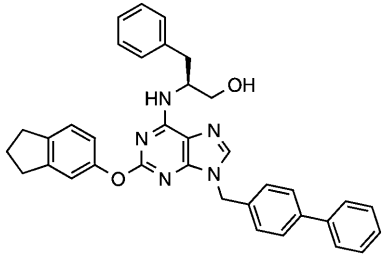
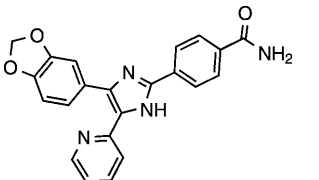
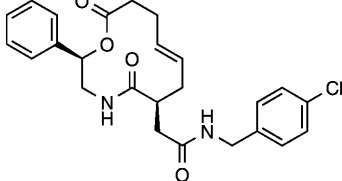
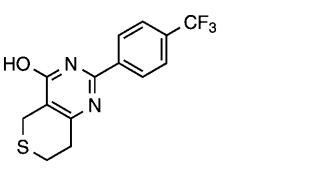
Die Signalwege für die Entwicklung kontrollieren die Musterbildung im Embryo und das Zellverhalten, und sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Stammzellregulierung. Daher sind Moleküle, die diese Wege selektiv aktivieren oder inhibieren, wertvolle Werkzeuge für die Modulation und Untersuchung der Stammzellbiologie. In diesem Abschnitt werden einige Moleküle beschrieben, die die Signalwege der Zellentwicklung modulieren und mit deren Hilfe verschiedene Aspekte der Stammzellbiologie aufgeklärt wurden (Tabelle 1). Für einen ausführlicheren Überblick über niedermolekulare Verbindungen, die die kanonischen Signalwege der Zellentwicklung beeinflussen, verweisen wir auf weitere, umfassende Aufsätze.<sup>[45]</sup>

### 4.1. Die kanonische Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkette

Die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkette ist an einer Vielzahl von Ereignissen beteiligt, bei denen sich embryonale Muster bilden, und sie vermittelt die Zellentwicklung in einer Viel-



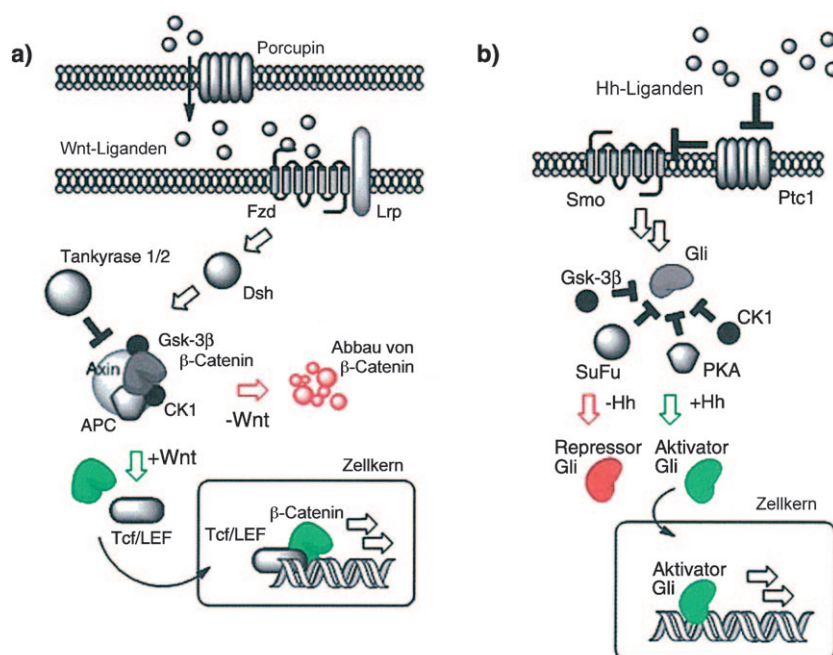
**Tabelle 1:** Auswahl niedermolekularer Modulatoren entwicklungsrelevanter Signalwege.

Verbindung	Zielstruktur Funktion	Verbindung	Zielstruktur Funktion
	<b>CHIR99021</b> GSK-3 $\beta$ Aktivator des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges		<b>Cyclopamin</b> Smo Inhibitor des Hh-Signalweges
	<b>Dorsomorphin</b> Typ I-Rezeptor (ALKs 2, 3, 6) Inhibitor des BMP-Signalweges		<b>Hh-Ag 1.2/1.3</b> Smo Aktivator des Hh-Signalweges
	<b>PD0325901</b> MEK/ERK1 Inhibitor des MEK-Signalweges		<b>PD173074</b> FGFR Inhibitor des FGF-Signalweges
	<b>QS11</b> ARFGAP1 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Synergist		<b>SB-431542</b> Typ I-Rezeptor (ALKs 4, 5, 7) Inhibitor des TGF- $\beta$ -Signalweges
	<b>Robotnikinin</b> Shh-Ligand Inhibitor des Hh-Signalweges		<b>XAV939</b> Tankyrase Inhibitor des Wnt-Signalweges

zahl somatischer Stammzellen.<sup>[46]</sup> Eine ganze Anzahl niedermolekularer Substanzen, die den Wnt-Signalweg aktivieren, ist bereits beschrieben und zur Untersuchung der Stammzellbiologie eingesetzt worden.<sup>[45]</sup> Die am häufigsten benutzten Verbindungen sind GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren, die den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg direkt aktivieren, indem sie die Phosphorylierung und die anschließende Zerstörung von  $\beta$ -Catenin blockieren (Abbildung 2a).<sup>[47]</sup> Mit GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren wurde beispielsweise die Selbsterneuerung humaner ES-Zellen befördert,<sup>[48]</sup> und in Kombination mit MEK-Inhibitoren lässt sich auch die Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen unter chemisch definierten Bedingungen aufrechterhalten.<sup>[49]</sup> Mit GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren wurde auch die Bildung von iPS-Zellen erleichtert,<sup>[50]</sup> und murine Kardiomyozyten und  $\beta$ -Zellen (zwei Zelltypen, die ansonsten mitotisch inaktiv sind) ließen sich so expandieren.<sup>[51]</sup>

Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivatoren wurden auch in zellbasierten Tests und Tests mit ganzen Organismen entdeckt. So fanden wir mit einem für den Wnt-Signalweg spezifischen Screening ein 2-Amino-4,6-disubstituiertes Pyrimidin, das den Wnt-Signalweg aktiviert.<sup>[52]</sup> Anders als viele bekannte Wnt-Aktivatoren hemmt diese Verbindung nicht GSK-3 $\beta$ , und ihre Aktivität kann durch die dominant negative Mutation Tcf4 blockiert werden. Vermutlich greift diese Verbindung also stromaufwärts der Tcf-Faktoren in der kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalkaskade an. In einem anderen Beispiel wurde mit einem zellbasierten Suchsystem ein Purinderivat (QS11) gefunden, das synergistisch mit dem Wnt-3a-Liganden agiert.<sup>[53]</sup> Mit Affinitätschromatographie und nachfolgenden funktionalen Tests wurde nachgewiesen, dass QS11 das GTPase-aktivierende Protein des ADP-Ribosylierungsfaktors 1 (ARFGAP1) bindet und hemmt, was vermuten lässt,





**Abbildung 2.** Der kanonische Wnt/β-Catenin- und der Hedgehog-Signalweg: a) Die kanonische Wnt-Signalkaskade kann durch die Bindung von Wnt-Proteinen an den Membranrezeptor Frizzled (Fzd) und an Lipoproteinrezeptor-verwandte Proteine (Lrps) eingeleitet werden. Ohne ligandenvermittelte Aktivierung des Signalweges wird β-Catenin durch einen zytosomatischen Komplex phosphoryliert, der die Proteine Axin, adenomatöse Polyposis coli (APC), Caseinkinase-1 (CK1) und Glycogensynthasekinase-3β (GSK-3β) enthält. Diese Phosphorylierungen markieren letztlich das Zielprotein β-Catenin für den Abbau im Proteosom. Der Axin/APC/CK1/GSK-3β-Komplex wird gehemmt durch Dishelled (Dsh), ein Zytosolprotein, das durch die Bindung von Wnt an seinen Rezeptor aktiviert wird. Die Wnt-Signalgebung stabilisiert so β-Catenin, das als Transkriptions-Coaktivator wirkt, indem es sich mit Transkriptionsfaktoren aus der Tcf/LEF-Familie zusammenlagert. b) Der Hh-Signalweg wird durch zwei Transmembranproteine, Patched-1 (Ptc1) und Smoothened (Smo), kontrolliert und durch die Bindung eines sezernierten Hh-Proteins aktiviert. Im Ruhezustand wird die Smo-Aktivität durch Ptc unterdrückt, das die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Gli durch Proteinkinase A (PKA), GSK-3β und CK1 zulässt. Durch die Phosphorylierungen wird Gli in einen inaktiven Transkriptionsrepressor umgewandelt. Wird ein Hh-Ligand gebunden, wird der inhibitorische Effekt von Ptc durch Smo aufgehoben und Signale werden ausgesandt, die die stromabwärts liegende Transkriptionsfaktorfamilie Gli aktivieren. Die Translokation des Gli-Aktivatorproteins in den Zellkern, die durch die Bindung von Hh an Smo ausgelöst wird, fördert die Expression der Zielgene der Hh-Signalgebung.

dass QS11 die Wnt/β-Catenin-Signalstrecke durch Einwirken auf den Proteintransport moduliert. Weil dieses Molekül der bislang einzige bekannte ARFGAP-Inhibitor ist, sollte er nicht nur nützlich für die Untersuchung des Wnt/β-Catenin-Signalweges sein, sondern könnte sich auch als hilfreich erweisen, um neue Funktionen von ARFGAP in lebenden Zellen zu erforschen.

Niedermolekulare Verbindungen, die den Wnt/β-Catenin-Signalweg an verschiedenen Stellen der Kaskade unterbrechen, wurden auch mit zellbasierten Screeningansätzen gefunden. Hierzu gehören: 1) eine Familie von Benzothiazolen (IWP),<sup>[54]</sup> die Antagonisten des Wnt-Liganden-sezernierenden Proteins Porcupine sind, 2) Moleküle, die Axinproteine (XAV939) durch die Hemmung von Tankyrase 1/2 stabilisieren,<sup>[55]</sup> und 3) Moleküle (PKF115-584), die die Bildung der β-Catenin-Tcf/LEF-Komplexe verhindern.<sup>[56]</sup> Letztere wurden verwendet, um die weniger differenzierten

Zellen in multiplen Myelomen anzusteuern, die von einem konstitutiven Wnt/β-Catenin-Signal abhängen.<sup>[57]</sup> Zusammengefasst stellen diese Moleküle vielfältig wirksame Werkzeuge dar, um die Rolle der Wnt-Signalgebung vor dem Hintergrund verschiedener Stammzellen herauszuarbeiten.

## 4.2. Der Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog (Hh)-Signalweg reguliert eine Gruppe von biologischen Vorgängen auf eine gewebespezifische und dosisabhängige Weise, darunter Zellproliferation, Differenzierung und Organbildung.<sup>[58]</sup> Wie beim Wnt/β-Catenin-Signalweg wurden auch hier eine Reihe niedermolekularer Agonisten (z.B. SAG, Hh-Ag1.3 und Purmorphamin)<sup>[33,35,59]</sup> und Antagonisten (z.B. Cyclopamin und SANT1-4)<sup>[59b,60]</sup> gefunden, die das Hh-Signal modulieren. Allerdings sind fast alle bekannten niedermolekularen Modulatoren des Hh-Signalwegs gegen das Hh-Rezeptorprotein Smoothened gerichtet (Smo; Abbildung 2b). Dennoch waren diese Verbindungen als biologische Sonden in verschiedenen Stammzell- und CSC-Systemen wertvoll. So wurden mit den Smo-Agonisten Hh-Ag1.3 und Purmorphamin verschiedene neuronale Musterbildungsvorgänge in ES-Zellen und NSCs beeinflusst.<sup>[59a,61]</sup> In einem anderen Beispiel wurde der Hh-Antagonist Cyclopamin zur Induktion spezifischer Zelllinien aus ES-Zellen verwendet, und er hat unser Verständnis von der Signalweitergabe in CSCs erweitert.<sup>[59a,62]</sup>

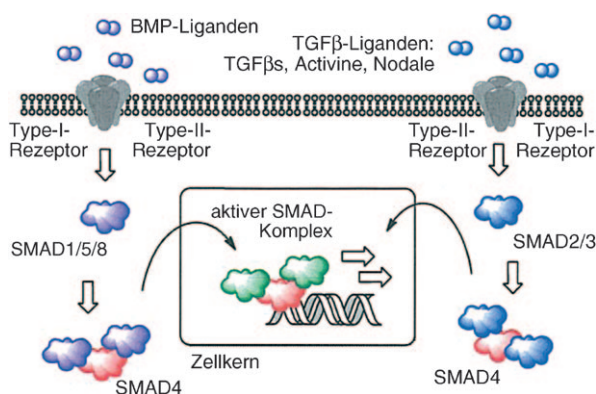
Im Anschluss wurden auch zellbasierte Screeningansätze durchgeführt, um Verbindungen zu finden, die den Hh-Signalweg unabhängig von Smo modulieren. Beispielsweise entwickelten wir eine Methode mit mesenchymalen Vorläuferzellen, die stabil mit einem Promotor der Gli-abhängigen Luciferase als Reporter transfiziert waren, um Verbindungen zu suchen, die den Hh-Signalweg hemmen. Mit diesem Test identifizierten wir eine Klasse von 2,4-disubstituierten Thiazolen, von denen ein Vertreter (JK184) die Gli-abhängige Transkriptionsaktivität dosisabhängig hemmte.<sup>[63]</sup> Nachfolgende biochemische und funktionale Tests ergaben, dass JK184 nicht an Smo bindet, sondern stattdessen an die der Klasse IV zugehörige Alkoholdehydrogenase 7 (Adh7). Ein anderes Beispiel ist der zwölfgliedrige Makrocyclus Robotnikinin, der bei einem Screening nach Verbindungen, die rekombinantes Sonic Hedgehog (Shh) binden, gefunden wurde.<sup>[64]</sup> Robotnikinin hemmt die Aktivierung des Hh-Signalweges, die durch den Liganden Shh induziert wird, es hat aber keinen inhibitorischen

schen Effekt auf die Expression der Zielgene von Hh in „patched null“-Fibroblasten oder in Zellen, die mit Purmorphamin aktiviert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Robotnikinin die Bindung von Shh an Pth1 verhindert, allerdings sind die molekularen Details dieses Mechanismus noch nicht aufgeklärt.

#### 4.3. Signalwege des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta$ und des knochenmorphogenetischen Proteins

Die Superfamilie der sezernierten transformierenden Wachstumsfaktoren- $\beta$  (TGF $\beta$ ) besteht aus einer großen Sammlung extrazellulärer Faktoren, die Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose, zelluläre Homöostase und andere Funktionen im adulten Organismus und im sich entwickelnden Embryo regulieren. Die mehr als 30 Liganden der TGF $\beta$ -Familie sind in die Untergruppen TGF $\beta$  (zu denen die TGF $\beta$ - und Activin/Nodal-Liganden gehören), knochenmorphogenetische Proteine (BMP) und Wachstumsdifferenzierungsfaktoren (GDF)<sup>[65]</sup> organisiert.

Während die Signalwege von TGF $\beta$  und BMP für die Modulation zahlreicher Entwicklungsprozesse verantwortlich sind und in verschiedenen Krebsarten aktiv sind, gibt es auf der anderen Seite nur wenige niedermolekulare Substanzen, die ihre Aktivität regulieren. Unter diesen befinden sich Kinaseinhibitoren, die die ligandenvermittelte SMAD-Phosphorylierung blockieren.<sup>[66]</sup> So hemmt der ALK4/5/7-Inhibitor SB-431542 die Phosphorylierung von SMAD2/3 und als



**Abbildung 3.** Signalwege des knochenmorphogenetischen Proteins (BMP) und des transformierenden Wachstumsfaktors- $\beta$  (TGF $\beta$ ). Liganden der TGF $\beta$ -Superfamilie werden als proteolytisch prozessierte Homodimere sezerniert und lösen das Signal über einen heterotetrameren Rezeptorkomplex aus, der aus zwei Arten von Serin/Threonin-Kinasen besteht. Die Liganden der TGF $\beta$ -Superfamilien binden an einen Typ-II-Rezeptor (ACVR2, ACVR2B, TGFBR2, BMPR2 und AMHR2), der einen Typ-I-Rezeptor rekrutiert und phosphoryliert (Activinrezeptor-ähnliche Kinaserezeptoren 1–7); verschiedene Rezeptorkombinationen dienen zur Erkennung spezifischer Liganden und lösen unterschiedliche Signale aus. Der Typ-I-Rezeptor phosphoryliert rezeptorregulierte SMADs (SMAD1/5/8 für BMP-Signalgebung und SMAD2/3 für TGF $\beta$ -Signalgebung), die dann coSMAD–SMAD4 binden (rot dargestellt). Die SMAD/coSMAD-Komplexe sammeln sich im Kern an (grün/rot dargestellt), wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken und an der Regulation der Zielgen-Expression beteiligt sind. Ausgewählte Elemente der BMP- und TGF $\beta$ -Signalwege sind lila und blau dargestellt.

Folge die Aktivierung der kanonischen TGF $\beta$ -Signalgebung (Abbildung 3). Tatsächlich wurde SB-431542 verwendet, um 1) die Bedeutung der TGF $\beta$ -Signalgebung für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes humaner ES-Zellen zu zeigen,<sup>[13]</sup> 2) den Reprogrammierungsfaktor Sox2 während der Bildung muriner iPS-Zellen zu ersetzen<sup>[67]</sup> und 3) die Differenzierung von Glioblastom-CSCs zu fördern.<sup>[68]</sup> Dorsomorphin, ein Hemmstoff der BMP-vermittelten Signaltransduktion durch SMAD1/5/8 (Abbildung 3) wurde in einem Screening anhand der Entwicklung von Zebrafischen entdeckt.<sup>[66b]</sup> Das Molekül ist verwendet worden, um die Myokard-Differenzierung aus murinen ES-Zellen durch Blockade des BMP-Signals zu verstärken.<sup>[69]</sup> Außerdem fördert die Kombination aus SB-431542 und Dorsomorphin in humanen ES-Zellen die robuste und effiziente neuronale Differenzierung auf Kosten anderer Abstammungslinien.<sup>[70]</sup>

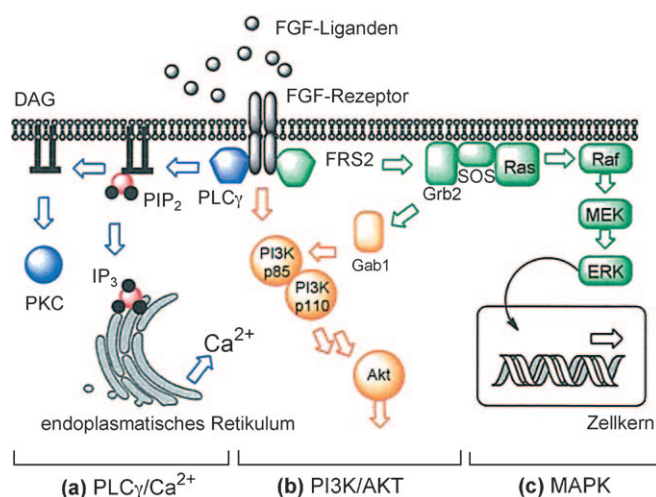
#### 4.4. Signalwege des Fibroblasten-Wachstumsfaktors

Das System der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) besteht aus einer der vielseitigsten Wachstumsfaktorfamilien in Wirbeltieren, und es spielt eine entscheidende Rolle bei zahlreichen biologischen Vorgängen.<sup>[71]</sup> Die Bindung der FGFs an ihre zugehörigen Rezeptoren führt zur Rezeptor-Dimerisierung, zur Autophosphorylierung der Tyrosinkinase und zur Zusammenlagerung und Rekrutierung von Signalkomplexen. Die FGF-Signaltransduktion verläuft letztlich über einen oder eine Kombination von drei Signalwegen: 1) PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>-Signalweg, 2) Phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/Akt-Signalweg und/oder 3) Ras/MAPK-Signalweg (MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; Abbildung 4). Zu den wichtigsten Funktionen der FGF-Signalgebung in der Stammzellbiologie gehören die Erhaltung von neuronalen Stammzellen und die Selbsterneuerung humaner ES-Zellen. Folglich wird in fast allen aktuellen Vorschriften für die Kultivierung von NSCs oder humanen ES-Zellen basisches FGF (bFGF) zugegeben.<sup>[11,72]</sup>

Es gibt eine große Zahl niedermolekularer Verbindungen, mit deren Hilfe die verschiedenen Aspekte der FGF-Signaltransduktion spezifisch kontrolliert werden können. So wurden FGF-Rezeptor (FGFR)-Inhibitoren verwendet, um einzelne Teilvorgänge der Selbsterneuerung von ES-Zellen in Maus, Ratte und Mensch aufzuklären.<sup>[13b,49,73]</sup> Darüber hinaus ließ sich mit PI3K-Inhibitoren die Proliferation von Prostata-CSCs differenziell hemmen,<sup>[74]</sup> und MEK/ERK-Inhibitoren werden routinemäßig verwendet, um die Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen aufrechtzuerhalten und die Bildung von iPS zu vermitteln.<sup>[49,50]</sup>

### 5. Chemische Kontrolle des Entwicklungspotenzials embryonaler Mäusestammzellen

Murine ES-Zellen können unbegrenzt in Kultur gehalten oder in alle Zelltypen des adulten Organismus differenziert werden.<sup>[5c,10,75]</sup> Im folgenden Abschnitt werden wir die Verbindungen vorstellen, die eingesetzt werden, um die Entwicklungsrichtung muriner ES-Zellen zu steuern (Tabelle 2).



**Abbildung 4.** Die Signale des Fibroblasten-Wachstumsfaktors können mehrere Signalwege auslösen: a) den PLCγ/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg (blau), (b) den PI3K-Signalweg (orange) und/oder c) den MAPK-Signalweg (grün). a) Die Aktivierung des FGF-Signalweges führt zur Trans-Auto-phosphorylierung und legt Bindestellen für stromabwärts liegende Ef-fektoren frei, sodass die aktivierten FGFRs verschiedene intrazelluläre Signalwege anstoßen können. Im Fall des PLCγ/Ca<sup>2+</sup>-Signalweges akti-viert die Bindung von PLC an FGFR die PLCγ-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu zwei Sekundärboten-stoffen, Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG). Pro-teinkinase C (PKC) wird durch Diacylglycerin aktiviert, während IP<sub>3</sub> die Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Reti-kulum stimuliert. b) Der Phosphoinositid-3-kinase(PI3K)/Akt-Signalweg kann nach FGFR-Aktivierung über drei Mechanismen induziert werden: 1) Gab1 kann an FRS2 indirekt über Grb2 binden, wodurch der PI3K/ Akt-Signalweg über p85 aktiviert wird; 2) die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K kann an einen phosphorylierten Tyrosinrest von FGFR binden; 3) aktiviertes Ras kann die katalytische Untereinheit p110 der PI3K aktivieren. c) Die MAPK-Signalgebung wird eingeleitet, wenn das FGFR-Substrat 2 (FRS2) durch das aktivierte FGFR-Homodimer gespalten und phosphoryliert wird; dadurch kann es das Adapter-protein Grb2 (growth factor receptor-bound) und den Guaninnukle-otid-Austauschfaktor Sos (Son of sevenless) an die Plasmamembran rekrutieren. Das membranlokalisierte Sos vermittelt dann die Ras-ab-hängige Aktivierung der Raf-Kinase, und dies löst die MEK/ERK-Kina-sekaskade aus, was in die Aktivierung der MAPK-abhängigen Tran-skriptionsfaktoren mündet. Der MAPK-Signalweg aktiviert Gene, die den Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus und das Fortschreiten des Zellzyklus vermitteln; eine verlängerte MAPK-Signalgebung dagegen ist ein wirkungsvoller Induktor der Zelldifferenzierung.

### 5.1. Selbsterneuerung muriner ES-Zellen mit bekannten Zielstruktur- und Signalweg-basierten Modulatoren

Die Selbsterneuerung embryonaler Mäusestammzellen kann durch die LIF-abhängige Aktivierung von STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), die schon lange als entscheidender Mechanismus betrachtet wird, über den murine ES-Zellen den undifferenzierten Zustand erhal-ten, reguliert werden.<sup>[12]</sup> LIF wirkt, indem es die Heterodi-merisierung von gp130 mit dem LIF-Rezeptor (LIFR) ver-mittelt, wodurch die Janus-assoziierten (JAK) Tyrosinkinasen und danach STAT3 aktiviert werden. Gleichzeitig reguliert LIF auch die ERK1/2-Aktivität hoch. Dies fördert die Dif-ferenzierung,<sup>[76]</sup> was darauf hindeutet, dass die Balance zwi-

**Tabelle 2:** Auswahl niedermolekularer Modulatoren der embryonalen Stammzellentwicklung.

Verbindung	Zielstruktur Funktion
	<b>all-trans-Retinsäure</b> RAR/RXR Vermittelt die Zelldifferenzierung in verschiedenen Kontexten
	<b>Cardiogenol C</b> Steuert die Kardiomyozyten-Diffe-renzierung muriner ES-Zellen
	<b>SU5402</b> FGFR und VEGFR Wurde verwendet, um die Rolle des FGF-Signalweges für die Entwick-lungsrichtung der ES-Zellen zu be-stimmen
	<b>Verapamil</b> Ca <sup>2+</sup> -Kanal vom L-Typ Vermittelt die Differenzierung von murinen ES-Zellen zu Kardiomyo-zyten
	<b>BIO</b> GSK-3β Vermittelt die Selbsterneuerung von murinen und humanen ES-Zellen
	<b>IQ-1</b> PP2A Hält murine ES-Zellen im undiffe-renzierten Zustand
	<b>TWS119</b> GSK-3β Steuert die neuronale Differenzie-rung von murinen ES-Zellen
	<b>Y-27632</b> Rho-Kinase Erhöht die Effizienz der klonalen Expansion humaner ES-Zellen

schen den LIF-induzierten STAT3- und ERK-Signalen wichtig ist, um die Entwicklungsrichtung einer sich teilenden, undifferenzierten ES-Zelle festzulegen.<sup>[75b]</sup> Dies ist im Ein-



klang mit dem Befund, dass der MEK/ERK-Inhibitor PD098059 in Gegenwart von LIF die Selbsterneuerung von ES-Zellen der Maus verstärkt, was auch die Vorstellung stützt, dass die Aktivierung von ERK die Selbsterneuerung beeinträchtigt.<sup>[76]</sup>

Daneben wurden auch andere Wege identifiziert, die zur Regulation der Selbsterneuerung in murinen ES-Zellen beitragen, unter anderem die BMP-, PI3K-, Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Nanog-Signalwege. Beispielsweise reicht in serumfreier Kultur LIF nicht aus, um die neuronale Differenzierung zu blockieren und die Pluripotenz aufrechtzuerhalten. Qi et al. fanden heraus, dass BMP4, das von Feeder-Zellen abgegeben wird, eine herausragende Rolle bei der Selbsterneuerung von Mäuse-ES-Zellen spielt.<sup>[77]</sup> Tatsächlich können Mäuse-ES-Zellen ohne Serum oder Feeder-Zellen aus einzelnen Zellen nur mit LIF plus BMP4 vermehrt oder de novo abgeleitet werden.<sup>[77,78]</sup> Die Auftrennung dieses Signalweges lässt vermuten, dass BMP4 die Selbsterneuerung in murinen ES-Zellen durch Hemmung der ERK- und p38-MAPK-Signalwege fördert, die beide die Differenzierung induzieren. Dieser Mechanismus wurde mit Hemmstoffen für MEK (PD098059) und p38-MAPK (SB203580) validiert, die auch die Ableitung von murinen ES-Zellen von Embryos ermöglichen, denen der BMP4-Rezeptor fehlt.<sup>[77]</sup> Wie BMP beeinflusst auch der PI3K-Signalweg die Selbsterneuerung von Maus-ES-Zellen über die MEK/ERK-Signalgebung. So führt die Behandlung von Maus-ES-Zellen mit einem PI3K-Hemmstoff (LY294002) zu einer verringerten Fähigkeit von LIF, die Selbsterneuerung in Gang zu halten, sodass die Zellen gleichzeitig eine differenzierte Morphologie einnehmen. Die Hemmung der PI3Ks verstärkt die LIF-induzierte Signalgebung durch ERKs und lenkt dadurch die Differenzierung über den ERK-Zweig der LIF-induzierten Signalgebung. Außerdem kehrt die Hemmung von MEK den Einfluss der PI3K-Inhibition auf die Selbsterneuerung um, vermutlich, weil die gesteigerte ERK-Aktivität, die nach Hemmung durch PI3K beobachtet wurde, zu der beobachteten funktionalen Antwort beiträgt.<sup>[79]</sup>

Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mit 6-Bromindirubin-3'-oxim (BIO) – einem Inhibitor von GSK-3 $\beta$  und anderen Kinasen – kann die Selbsterneuerung von Maus-ES-Zellen auch ohne LIF oder Feeder-Zellen vermitteln<sup>[48]</sup> und die Ableitung von Maus-ES-Zellen aus verschiedenen Mäusestämmen verbessern.<sup>[80]</sup> Studien ergaben, dass die Aufrechterhaltung des zellulären c-Myc-Spiegels ein kritischer Faktor für die BIO-vermittelte Selbsterneuerung ist: Die Hemmung von GSK-3 $\beta$  unterdrückt die c-Myc-T58-Phosphorylierung und den nachfolgenden Abbau.<sup>[81]</sup> Diese Beobachtung schlägt eine unmittelbare Brücke zwischen dem LIF- und dem Wnt-Signalweg (die c-Myc-Expression wird durch LIF-vermittelte STAT3-Kerntranslokation aktiviert). Es ist aber auch möglich, dass BIO über alternative Signalwege agiert, weil die Hemmung von GSK-3 $\beta$  von zentraler Bedeutung für die Signaltransduktion, unter anderem in Hh-, PI3K/AKT-, nichtkanonischem Wnt- und cAMP-Signalwegen ist.<sup>[47b]</sup> Bone et al. setzten eine Serie von GSK-3 $\beta$ -spezifischen Inhibitoren in einem Testsystem mit sich erneuernden embryonalen Mäusestammzellen ein und fanden, dass die GSK-3 $\beta$ -Hemmung die Selbsterneuerung der Stammzellen in

Serum und/oder LIF-haltigen Medien verstärkt.<sup>[82]</sup> Sie zeigten aber auch, dass die Hemmung von GSK-3 $\beta$  alleine nicht ausreicht, um LIF überflüssig zu machen. Außerdem stellten sie fest, dass frühere Daten zu anderen GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren (z.B. BIO und TWS119) vermengt waren, da diese Verbindungen auch mit anderen wichtigen Signalwegen der Selbsterneuerung in ES-Zellen wechselwirken (z.B. PI3K und MAPK).

Niedermolekulare Modulatoren der Signaltransduktionswege haben auch dazu beigetragen, Einblicke in die Unterschiede zwischen murinen und humanen ES-Zellen zu gewinnen. EpiSCs, die das murine Gegenstück zu humanen ES-Zellen darstellen, reagieren nicht auf LIF, sondern benötigen stattdessen eine Supplementierung des Mediums mit bFGF und Activin (siehe Abschnitt 2.2, Bedingungen für humane ES-Zellen). Auch die Hemmung des Activin/Nodal-Weges in EpiSCs mit dem ALK4/5/7-Inhibitor SB-431542 fördert – ebenso wie in humanen ES-Zellen – die Differenzierung in Richtung neuroektodermaler Zelltypen.<sup>[83]</sup> Im Gegensatz dazu behalten murine ES-Zellen ihre Pluripotenzmarker bei Hemmung des Activin/Nodal-Weges. Andererseits unterstützt die Hemmung der STAT3-Phosphorylierung am Tyrosin 705 mit einem JAK-Inhibitor (Jaki I) den undifferenzierten Zustand von EpiSCs und fördert die Differenzierung in murinen ES-Zellen. Darüber hinaus lassen sich ES-Zellen der Maus, die mit JAK- und Activin/Nodal-Hemmern behandelt wurden, nicht von EpiSCs unterscheiden, die nur mit dem Activin/Nodal-Inhibitor behandelt wurden.<sup>[15a]</sup> Diese Versuchsreihe verdeutlicht die schrittweise Differenzierung von Maus-ES-Zellen beginnend mit der aus Blastozysten erworbenen molekularen Signatur über die Epiblasten-Signatur bis letztlich zu neuroektodermalen Zellen. Wichtig ist, dass auch humane ES-Zellen die Pluripotenzgene schnell herunterregeln und neuronale Eigenschaften erwerben, wenn sie nur mit dem Activin/Nodal-Inhibitor behandelt werden.<sup>[15a,83]</sup> Diese Befunde stimmen mit der Beobachtung überein, dass EpiSCs und menschliche ES-Zellen funktionell ähnlich sind (Abbildung 1).

Aufgrund dieser und anderer mechanistischer Erkenntnisse werden nun zahlreiche Target-gerichtete Kinaseinhibitoren eingesetzt, um die Selbsterneuerungsmechanismen von Maus-ES-Zellen aufzuklären. Beispielsweise werden Inhibitoren von p38, MAPK und MEK verwendet, um stromabwärts liegende Effektoren der BMP4- und LIF-Signalketten zu identifizieren.<sup>[76,77,84]</sup> Inhibitoren der Tyrosinkinase der Src-Familie wurden eingesetzt, um die individuellen Beiträge der verschiedenen Kinasen der Src-Familie voneinander abzugrenzen.<sup>[85]</sup> Mit einem gamma-Secretase-Inhibitor wurde der Notch-Signalweg untersucht,<sup>[86]</sup> und mit Hemmern der FGF-Signalgebung wurden die stromabwärts liegenden Beiträge zu Selbsterneuerung und/oder neuronaler Differenzierung aufgetrennt.<sup>[84c,d,86,87]</sup> Unbestritten führt der Einsatz niedermolekularer Hemmstoffe definierter Komponenten eines Signalweges zu einem genaueren Verständnis der komplexen Regelkreise der Stammzellbiologie.

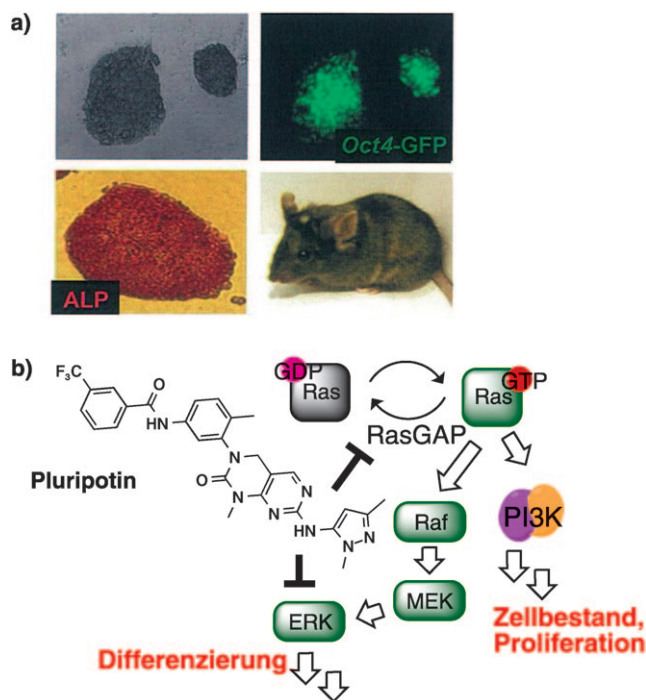
## 5.2. Identifizierung und Charakterisierung neuer Modulatoren der Selbsterneuerung muriner ES-Zellen

Ungerichtete phänotypische Screeningläufe mit chemischen Bibliotheken sind ebenfalls nützlich für die Identifizierung von Molekülen, die Selbsterneuerung und Differenzierung von ES-Zellen modulieren. Mit diesem Ansatz entdeckt man mit guter Wahrscheinlichkeit Moleküle, die über neue oder unerwartete Mechanismen wirken. Um beispielsweise Verbindungen zu identifizieren, die die Selbsterneuerung von Maus-ES-Zellen vermitteln, wurde eine transgene Reporter-ES-Zelllinie, die GFP unter Kontrolle der regulatorischen Elemente *Oct4* (als Marker für Pluripotenz) exprimiert, zum Screening von Verbindungen unter LIF-freien Differenzierungsbedingungen genutzt. Diese Strategie führte zur Identifizierung von Pluripotin, das eine homogene Langzeit-Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen in chemisch definiertem Medium (ohne Feeder-Zellen, Serum, LIF oder BMP4 für mehr als 10 Passagen) erhält.<sup>[38]</sup> Mit Pluripotin expandierte Maus-ES-Zellen exprimierten verschiedene Pluripotenz-assoziierte Marker (*Oct4* und alkalische Phosphatase, ALP), konnten in vitro in Gewebetypen differenzieren, die jedes der drei primären Keimblätter repräsentieren, und waren in vivo keimbahnkompetent (Abbildung 5a). Nachfolgende Experimente zeigten, dass Pluripotin unabhängig von den kanonischen Signalwegen der Selbsterneuerung von Maus-ES-Zellen (darunter LIF-STAT3, BMP und

Wnt/ $\beta$ -Catenin) wirkt, sondern stattdessen durch gleichzeitige Hemmung von ERK1 und des Ras-GTPase-aktivierenden Proteins agiert (RasGAP; Abbildung 5b). Pluripotin wurde auch verwendet, um Maus-ES-Zelllinien von refraktären Stämmen abzuleiten; dies weist ebenfalls darauf hin, dass die Hemmung von ERK1 und RasGAP die Aufrechterhaltung des undifferenzierten, pluripotenten Status vermittelt.<sup>[88]</sup>

In einer Folgestudie wurde mit einem Screening auf Basis der ALP-Expression die Verbindung IQ-1 identifiziert, die die Langzeit-Expansion von ES-Zellen in Wnt-3a-haltigem Medium ohne Feeder-Zellschicht oder LIF induziert.<sup>[89]</sup> IQ-1 hemmt PR72/PR130, blockiert dadurch die Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit p300 und fördert die Wechselwirkung von  $\beta$ -Catenin mit CBP. Es scheint also, dass die Zunahme der  $\beta$ -Catenin/CBP-vermittelten Transkription auf Kosten der  $\beta$ -Catenin/p300-vermittelten Transkription entscheidend für die Erhaltung der ES-Zell-Pluripotenz bei Mäusen ist. Interessanterweise wirkt IQ-1 auf einen ganz anderen Signalweg als Pluripotin, was nebenbei die Effektivität ungerichteter Suchverfahren zur Identifizierung neuer Mechanismen belegt. Außerdem hat die Arbeit mit IQ-1 weitere Hinweise auf die Rolle der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung bei der Selbsterneuerung von murinen ES-Zellen gegeben.

Vor kurzem zeigten Q.-L. Ying, A. Smith und Mitarbeiter, dass Maus-ES-Zellen in Medien ohne Wachstumsfaktoren, Feeder-Zellen und Serum durch Zugabe eines Cocktails von niedermolekularen Inhibitoren (gegen MEK und GSK-3 $\beta$  oder MEK, GSK-3 $\beta$  und FGFR) ohne Differenzierung kultiviert werden können.<sup>[49]</sup> Dies waren die ersten chemisch definierten Medien zur Züchtung von Maus-ES-Zellen. Damit war klar, dass die Zellen ein angeborenes Programm zur Selbstreplikation besitzen, das keine extrinsische Anleitung benötigt. Ying et al. erhielten die ersten keimbahnkompetenten Ratten-ES-Zelllinien,<sup>[73b,c]</sup> indem sie MEK- und FGF-Inhibitoren für Ableitung, Expansion und Erhaltung der Selbsterneuerung verwendeten. So haben diese chemischen Ansätze unser Wissen um die Signalwege und unsere Fähigkeit zur Kontrolle der Selbsterneuerung von ES-Zellen stark erweitert.



**Abbildung 5.** Pluripotin hält die Selbsterneuerung in murinen ES-Zellen aufrecht: a) Mittels Pluripotin expandierte Maus-ES-Zellen, die unter LIF- und Feeder-freien Bedingungen gehalten werden, exprimieren Gene, die für den selbsterneuernden, pluripotenten Zustand charakteristisch sind (*Oct4* und ALP), und vermögen zur Mausentwicklung beizutragen. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [38]; Copyright 2006, National Academy of Sciences, USA. b) Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Pluripotin.

## 5.3. Gerichtete Differenzierung von Maus-ES-Zellen

Maus-ES-Zellen besitzen die Anlage für die Bildung aller fötalen und adulten Zelltypen.<sup>[75a]</sup> Der Nutzen von Maus-ES-Zellen als Entwicklungsmodell oder als Quelle definierter Zellpopulationen (z. B. für pharmazeutische Screeningsysteme) wird jedoch dadurch beeinträchtigt, dass sich die Differenzierung in vitro nur schwer kontrollieren lässt.<sup>[9,90]</sup> Eine Methode, die entwickelt wurde, um die Differenzierung einzuleiten, beinhaltet die Entfernung der ES-Zellen aus LIF-haltigem Medium und Überführung in Suspensionskultur. Unter diesen Bedingungen bilden die Zellen Aggregate aus differenzierten und undifferenzierten Zellen (so genannten Embryoidkörperchen; embryoid bodies, EBs).<sup>[91]</sup> Zell-Zell-Wechselwirkungen zusammen mit einem differenziellen Zugang zu Nährstoffen und Wachstumsfaktoren führen zu einer heterogenen Differenzierung in eine Reihe von Entwicklungslinien. Nach einem anderen Verfahren werden ES-

Zellen direkt auf Stromazellen kultiviert, und die Differenzierung findet in Kontakt mit diesen Zellen statt.<sup>[92]</sup> Allerdings können undefinierte Faktoren, die von diesen Helferzellen produziert werden, die Differenzierung der Maus-ES-Zellen zu unerwünschten Zelltypen beeinflussen. Nach einer dritten Vorschrift werden Maus-ES-Zellen als Monoschicht auf extrazellulären Matrixproteinen differenziert.<sup>[93]</sup> Die Differenzierung in Monoschichten auf bekannten Substraten kann den Einfluss der Nachbarzellen minimieren und in dieser Hinsicht eine einfache, reproduzierbare Methode darstellen, um ES-Zellen in die gewünschte Richtung zu differenzieren. Diese Strategie lässt sich jedoch nur auf eine kleine Zahl der mehr als 200 Zelltypen anwenden, aus denen ein adulter Organismus besteht. Klar ist, dass die Spezifikation der primären Entwicklungslinien nicht gut verstanden ist und in vielen Fällen die Differenzierungsmethoden daher schwankende und heterogene Ergebnisse hervorbringen. Es werden also effizientere und selektivere Verfahren benötigt, um die Differenzierung von ES-Zellen zur Produktion homogener Populationen bestimmter Zelltypen anzuregen. Daher haben wir und andere Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen unter verschiedenen Randbedingungen durchsucht, um Werkzeuge zu identifizieren, mit denen die Mechanismen aufgeklärt und kontrolliert werden können, die die Linienauswahl in Maus-ES-Zellen regulieren.

#### 5.4.1. Neuronale Differenzierung

Das Nervensystem besteht hauptsächlich aus Zellen ohne oder mit eingeschränktem Expansionspotenzial, darunter Gliazellen (d.h. Astrocyten und Oligodendrocyten) und Neuronen (von denen es viele Unterarten gibt).<sup>[94]</sup> Verlust oder Beschädigung dieser Zellen kann zu verheerenden Erkrankungen führen. So ist der Verlust dopaminergischer Neuronen mit der Parkinsonschen Krankheit assoziiert, wiederholte Schädigungen der Oligodendrozyten lösen multiple Sklerose aus, und der Verlust der mittelgroßen dornentragenden („medium spiny“) Projektionsneuronen im Striatum ist mit Chorea Huntington assoziiert.<sup>[95]</sup> In mehreren Arbeitsgruppen wurde mit der Entwicklung schrittweiser Differenzierungsverfahren begonnen, um neuronale Vorläuferzellen,<sup>[1,87,96]</sup> gemischte Populationen von Neuronen<sup>[40,62,97]</sup> und homogene Subtyp-spezifische neuronale Populationen<sup>[61c,62b]</sup> aus Maus-ES-Zellen zu gewinnen. Der Einsatz von niedermolekularen Verbindungen in chemischen Differenzierungsprotokollen hat dabei geholfen, die Signalwege nachzuzeichnen und die Mechanismen aufzuklären, die die neuronale Differenzierung gegenüber ES-Zellen steuern. Letztlich können solche Zellen benutzt werden, um die Entwicklung von neuronalen Krankheiten im Labor zu untersuchen und um vielleicht Verfahren zu finden, um Zellen für regenerative Therapien zu erzeugen.

In einem Fall führten wir ein zellbasiertes phänotypisches Screening durch, um niedermolekulare Verbindungen zu suchen, die die neuronale Differenzierung von Maus-ES-Zellen induzieren. Eine pluripotente Mauszelllinie wurde stabil mit einem Luciferase-Reportergen unter Kontrolle eines neuronalen differenzierungsspezifischen Promotors (Tubulin alpha-1a) transfiziert, um eine große Zahl einzelner

niedermolekularer Verbindungen zu durchmustern. Die primären Treffer wurden durch Immunfluoreszenzfärbung mehrerer spezifisch neuronaler Marker, darunter Map-2ab,  $\beta$ III-Tubulin, Neurofilament-M und Synapsin, validiert. In diesen Tests und nachfolgenden Struktur-Wirkungs-Analysen wurde ein disubstituiertes Pyrrolopyrimidin, TWS119, gefunden, das die neuronale Differenzierung in Maus-ES-Zellen wirksam induziert.<sup>[40]</sup> TWS119 wurde dann über eine für die Wirkung unerhebliche Gruppe an eine Affinitätsmatrix gebunden. In einem Test ließ sich damit GSK-3 $\beta$  verankern. Western-Blots von mit TWS119 behandelten Zellen zeigten einen Anstieg der  $\beta$ -Cateninkonzentration, was einen Wirkungsmechanismus über den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Cateninweg vermuten lässt (Abbildung 2a). In einer Reihe von Untersuchungen wurde dann gezeigt, dass die Hemmung von GSK-3 $\beta$  in geeignetem Umfeld eine Rolle bei neuronaler Subtyp-spezifischer Differenzierung<sup>[98]</sup> und Expansion neuronaler Vorläuferzellen<sup>[99]</sup> spielen kann. Während die komplexen mechanistischen Zusammenhänge der Beteiligung von GSK-3 $\beta$  an der neuronalen Entwicklung noch weiter untersucht werden müssen, ist die prinzipielle Beteiligung von GSK-3 $\beta$  klar.

Eine große Herausforderung bei der Erzeugung hochspezifischer neuronaler Subtypen aus pluripotenten ES-Zellen ist die Notwendigkeit für sequenzielle Signale, denn die Zellen reifen auf dem Weg über verschiedene Vorläuferzelllinien. Um dieses Problem zu lösen, züchteten Jessell et al. Motoneuronen schrittweise aus Maus-ES-Zellen.<sup>[61c]</sup> Zunächst wurden EBs mit Induktionssignalen aus der PA6-Stromazelllinie erzeugt. Diese wurden dann mithilfe von Retinsäure (RA) in neuronale Vorläuferzellen differenziert, die wiederum mithilfe eines spezifischen niedermolekularen Agonisten (Hh-Ag1.3) des Hh-Signalweges in Motoneuron-Vorläufer umgewandelt wurden. Durch zeitliche Verfolgung des Vorgangs konnte beobachtet werden, wie die sich entwickelnden Motoneuronen die erwarteten Entwicklungsmarker sequenziell und zeitabhängig exprimierten. Wichtig war, dass die aus den ES-Zellen entstandenen Motoneuronen das embryonale Rückenmark besiedelten und Synapsen mit den zugehörigen Muskeln ausbildeten, wenn man sie in Hühnchenembryos verpflanzte. Später verfolgten Vanderhaeghen und Mitarbeiter eine ähnliche Strategie, um Pyramidenzellen der Hirnrinde aus ES-Zellen zu entwickeln.<sup>[62b]</sup> Auch dieser Vorgang erforderte eine schrittweise Differenzierung über verschiedene aufeinanderfolgende Vorläuferstadien, bis die endgültigen Charakteristika kortikaler Neuronen erreicht waren. Ein primärer Schritt in dieser Differenzierungskaskade war die Hemmung des Hh-Signals mit Cyclopamin: Wenn das Hh-Signal nicht ausreichend blockiert wurde, entstanden aus den meisten neuronalen Vorläuferzellen GABAerge Vorläufer anstelle der kortikalen Vorläufer.

Die Folgerung aus diesen Ergebnissen scheint zu sein, dass eine effektive Strategie zur Steuerung der Differenzierung zu reifen Zelltypen iterative Schritte über verschiedene Zwischenstufen der Zellentwicklung erfordert. Entsprechend könnten Screening-Strategien, die sequenziell und/oder mit Kombinationen von Wirkstoffen durchgeführt werden, ein Weg sein, um die Differenzierung zu Zelltypen zu dirigieren, die man sonst aus ES-Zellen nicht effizient ableiten könnte.



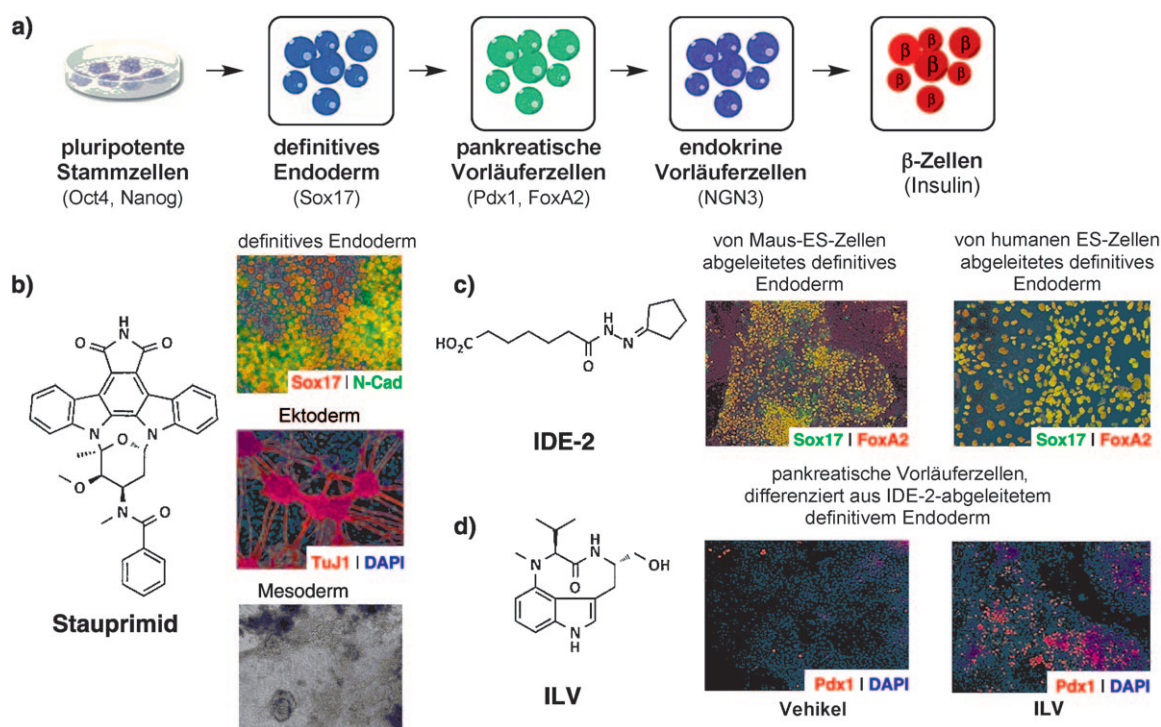
### 5.4.2. Differenzierung von $\beta$ -Zellen

Diabetes Typ 1 ist die Folge einer Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch Autoantikörper. Obwohl die  $\beta$ -Zellen direkt durch die Gabe von Insulin ersetzt werden können, erfordert dies eine regelmäßige Bestimmung des Blutglucosespiegels und zieht Komplikationen nach sich.<sup>[100]</sup> Eine Therapie für Diabetes muss daher Ersatz für die verlorenen  $\beta$ -Zellen schaffen und die Autoimmunreaktion unterbinden. Klinische Studien ergaben, dass die Transplantation von Inselzellen eine vorübergehende Unabhängigkeit von Insulin und eine Erleichterung bei diabetesbedingten Symptomen schafft,<sup>[101]</sup> womit der prinzipielle Nachweis geführt ist, dass eine Restauration der funktionalen  $\beta$ -Zell-Population den Krankheitsverlauf umkehren würde. Der Mangel an Donorzellen hoher Qualität hat die Suche nach alternativen Quellen für  $\beta$ -Zellen verstärkt. Inzwischen werden mehrere Ansätze verfolgt, um funktionelle  $\beta$ -Zellen für zellbasierte Therapien zu erzeugen. Eine Strategie läuft über die Expansion primärer  $\beta$ -Zellen (siehe Abschnitt 10); bei einer zweiten wird versucht, andere reife Entwicklungslinien in  $\beta$ -Zellen umzulenken („Trans-Differenzierung“);<sup>[102]</sup> in einem dritten Ansatz wird versucht,  $\beta$ -Zellen aus pluripotenten Vorläuferzellen zu erzeugen.<sup>[103]</sup>

Die Versuche, pluripotente Zellen in  $\beta$ -Zellen zu differenzieren, waren auch auf schrittweise Differenzierungsvorschriften konzentriert, mit denen die in vivo beobachteten

Entwicklungsprozesse nachvollzogen werden sollten. Dazu müssen zunächst pluripotente Zellen zu definitivem Endoderm differenziert werden, danach zu Pankreas-Vorläuferzellen, anschließend zu endokrinen Vorläuferzellen und zuletzt zu reifen  $\beta$ -Zellen (Abbildung 6a). Solche Verfahren sind allerdings zeit- und arbeitsintensiv und liefern die  $\beta$ -Zellen nur in schlechten Ausbeuten (< 1 % der Ausgangspopulation), und obwohl die entstehenden Zellen  $\beta$ -Zellen ähneln, sind sie oft nicht in der Lage, funktionell auf Glucosestimulation zu reagieren.<sup>[104]</sup> Um diese Hürden zu überwinden, suchen inzwischen einige Arbeitsgruppen nach niedermolekularen Verbindungen, die die individuellen Entwicklungsschritte während der Umwandlung von pluripotenten Zellen in funktionelle  $\beta$ -Zellen potenzieren.

In einer Versuchsreihe suchten wir nach Molekülen, die den ersten Schritt in der Entwicklung von Pankreas- $\beta$ -Zellen aus Maus-ES-Zellen, der Bildung des definitiven Endoderms, beschleunigen. Außer zu definitivem Endoderm können sich ES-Zellen auch zu extraembryonalen endodermalen Linien (d.h. primitives Endoderm und viszerales Endoderm) differenzieren, die nicht zur Bildung von  $\beta$ -Zelllinien in der Lage sind. Um Verbindungen zu finden, die die Bildung des definitiven Endoderms fördern, wurden Maus-ES-Zellen als Monoschicht serumfrei mit Activin A ausplattiert und der Substanzbibliothek ausgesetzt. Mit einem Test, der an eine Bildauswertung gekoppelt ist, wurden Moleküle identifiziert, die ES-Zellen in Sox17-positive und Sox7-negative Zellen



differenzieren (Sox17 ist ein Transkriptionsfaktor für alle Endoderm-Linien, Sox7 ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch ist für primitives und viszerale Endoderm, nicht aber für definitives Endoderm). Ein Staurosporin-Derivat – Stauprimid – wurde dabei gefunden; es kann die Bildung von definitivem Endoderm (aus murinen und humanen ES-Zellen; Abbildung 6b) wirksam vermitteln.<sup>[41]</sup> Aus diesem durch Stoffeinfluss entstandenen definitiven Endoderm können bei weiterer Stimulation reife endodermstammige Linien entstehen, darunter Hepatocyten und  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

Stauprimid fördert die Bildung von definitivem Endoderm nur zusammen mit Activin A; ohne dieses auf die Bildung von Zelltypen einwirkende Morphogen entstehen keine endodermalen Zelltypen. Auf ähnliche Weise fördert Stauprimid die Differenzierung in spezifische Entwicklungslinien in Reaktion auf ektoderm- oder mesodermispezifisierende Bedingungen. Vermutlich prägt Stauprimid die Zellen für eine Differenzierung, ohne die Differenzierungsrichtung hin zu einer bestimmten Linie zu lenken (Abbildung 6b). Ein Biotin-markiertes Analogon von Stauprimid wurde zur Identifizierung von NME2 als zellulärer Zielstruktur von Stauprimid eingesetzt. NME2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von c-Myc reguliert. c-Myc spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des proliferationsfähigen, selbsterneuernden Status der ES-Zellen. Wird er herunterreguliert, nimmt die Proliferationsfähigkeit der Zelle ab. Nachfolgende biochemische Untersuchungen ergaben, dass Stauprimid an NME2 bindet und seine Translokation in den Zellkern und so die Aktivierung der c-Myc-Transkription verhindert. Weil Stauprimid ES-Zellen für eine Differenzierung in Reaktion auf externe Stimuli prägt, wurde es in vielen ES-Zelldifferenzierungsansätzen genutzt, um eine gewünschte Population anzureichern. Da Stauprimid außerdem die c-Myc-Expression direkt hemmt, wird es sich wahrscheinlich auch in verschiedenen anderen biologischen Zusammenhängen als nützlich erweisen (z. B. in anderen Stammzellsystemen, in c-Myc-abhängigen Tumoren usw.).<sup>[105]</sup>

Melton und Mitarbeiter verwendeten einen ähnlichen Ansatz für die Suche nach Molekülen, die Maus-ES-Zellen zur Differenzierung in definitives Endoderm anregen.<sup>[106]</sup> Ähnlich wie in unserer Studie nutzten sie die Expression von Sox17 als Indikator für definitives Endoderm. Anders als in unserem Fall induzierten sie die Zellen aber nicht mit Activin A, und sie fanden zwei Verbindungen – IDE1 und IDE2 –, die die Differenzierung zu definitivem Endoderm einleiten (Abbildung 6c). Interessant ist, dass diese Verbindungen die Phosphorylierung von SMAD2 aktivieren, indem sie die Signalgebung durch Nodal hochregulieren. Außerdem kann die Differenzierungsaktivität jeder der Verbindungen durch Activin A oder Nodal (beides sind Morphogene, die ihr Signal über Phospho-SMAD2 senden) verstärkt werden, während ihre Aktivität durch Inhibitoren der SMAD-Phosphorylierung blockiert werden kann (in diesem Fall durch den TGF $\beta$ -Inhibitor SB431542). Insgesamt lassen diese Untersuchungen vermuten, dass IDE1 und IDE2 die Bildung von definitivem Endoderm über die kanonischen Activin/Nodal-Signalwege fördern, obwohl die genauen molekularen Zielstrukturen noch nicht bekannt sind.

#### 5.4.3. Differenzierung von Kardiomyozyten

Das adulte Säugetierherz besteht hauptsächlich aus postmitotischen, terminal differenzierten Muskelzellen (Kardiomyozyten) ohne intrinsische Regenerationsfähigkeit. Gegenwärtig besteht die einzige wirksame Behandlung von Patienten mit schwerem Herzversagen in der Organtransplantation. Weil die Spenderorgane selten sind, sind Herzerkrankungen eine bedeutende Indikation für die Anwendung ES-Zell-basierter Therapien. Viele Arbeitsgruppen haben berichtet, dass Wachstumsfaktoren, die während der Herzentwicklung aktiv sind, die Kardiogenese in Kulturen differenzierender Maus-ES-Zellen signifikant verstärken. Beispielsweise wurden TGF $\beta$ 1,<sup>[107]</sup> BMPs<sup>[107b]</sup> oder ihre endogenen Antagonisten,<sup>[108]</sup> FGFs,<sup>[109]</sup> Stickstoffmonoxid und verschiedene Mitglieder der Wnt-Familie bei der Differenzierung von ES-Zellen zu Herzzellen einbezogen.<sup>[110]</sup>

Eine steigende Zahl niedermolekularer Verbindungen, die die Kardiogenese in Maus-ES-Zellen fördern, ist mittlerweile bekannt geworden, darunter Retinsäure,<sup>[110,111]</sup> Dorsomorphin,<sup>[69]</sup> Ascorbinsäure,<sup>[112]</sup> Cardiogenol A–D<sup>[113]</sup> und verschiedene andere.<sup>[114]</sup> Die Retinsäure-vermittelte Kardiogenese hängt wesentlich von Konzentration und Zeitpunkt der Anwendung ab. Die späte Zugabe von Retinsäure zu Maus-ES-Zellen in niedriger Konzentration hat einen robusten prokardiogenen Effekt, während die frühere Applikation höherer Konzentrationen die Differenzierung zu Herzzellen unterdrückt.<sup>[111]</sup> Dorsomorphin, ein selektiver niedermolekularer Inhibitor der BMP-Signalgebung, der bei der Suche nach Verbindungen, die die Bildung der dorsoventralen Achse in Zebrafischen stören, gefunden wurde,<sup>[66b]</sup> induziert ebenfalls die myokardiale Differenzierung in Maus-ES-Zellen.<sup>[69]</sup> In diesem Fall steigerte Dorsomorphin die Ausbeute spontan schlagender Kardiomyozyten auf das 20fache in einer zeit- und dosisabhängigen Weise. Außerdem reduzierte die Dorsomorphin-Behandlung, anders als das BMP-hemmende Morphogen Noggin, die Differenzierung zu anderen mesodermalen Zelltypen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass kleine Moleküle die zelltypspezifische Differenzierung in manchen Fällen effektiver vermitteln können als die nativen Entwicklungssignale.

In einem anderen Fall durchsuchten wir kombinatorische Bibliotheken nach synthetischen niedermolekularen Wirkstoffen, die selektiv und effektiv die Differenzierung von Maus-ES-Zellen zu Kardiomyozyten induzieren sollten.<sup>[113]</sup> In unserem Primärscreening verwendeten wir embryonale Karzinomzellen, die stabil mit Luciferase transfiziert waren. Letztere stand unter Kontrolle des Promotors des herzmuskelspezifischen natriuretischen Vorhoffaktors (atrial natriuretic factor). Die Expression der schweren Sarkomer-Myosinkette (myosin heavy chain MHC), eines der zentralen Motoproteine, die für das Kontraktionsvermögen des Herzmuskels verantwortlich sind, diente als Sekundärscreening für die Differenzierung. Vier Diaminopyrimidine, Cardiogenol A–D, wirkten am stärksten bei der Induktion der MHC-Expression; die differenzierten Zellen exprimierten auch weitere Marker für Herzzellen (GATA-4, Nkx2.5 und MEF2). Auch die Anwendung von Cardiogenol auf Maus-ES-Zellen, die ohne LIF als Monoschicht kultiviert wurden, re-

sultierte in der Bildung schlagender Herzmuskelzellen, während in den unbehandelten Kontrollen keine schlagenden Zellen erschienen.

In einer vergleichbaren Studie durchsuchten Takahashi und Mitarbeiter Verbindungen in Maus-ES-Zellen, die stabil mit GFP als Reporter unter der Kontrolle des Promotors der herzspezifischen schweren Kette des  $\alpha$ -Cardiomyosin transfiziert waren.<sup>[112]</sup> Sie fanden heraus, dass Ascorbinsäure die spontane Differenzierung von Maus-ES-Zellen zu Herzzellen deutlich verstärkt. Außerdem induziert Ascorbinsäure die Expression von herzspezifischen Genen wie GATA4 und den schweren Ketten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Myosin auf eine durch die Zellentwicklung kontrollierte Weise. Die Wirkung von Ascorbinsäure auf die Herzzell-Differenzierung wurde von anderen Antioxidantien wie *N*-Acetylcystein, Tiron oder Vitamin E nicht nachgeahmt. Daher ist zu vermuten, dass die Aktivität von Ascorbinsäure nicht von seiner Eigenschaft als Antioxidans abhängt. Interessanterweise zeigte Ascorbinsäure keinen Effekt auf die spontane Kardiomyogenese über die Bildung von Embryoidkörperchen, was darauf hindeuten würde, dass Ascorbinsäure die permissive Umgebung der EBs nachahmt anstatt eine autonome Differenzierung zu induzieren.

Auch Sachinidis und Mitarbeiter identifizierten eine Reihe niedermolekularer Verbindungen, die die Differenzierung muriner ES-Zellen zu Kardiomyozyten induzieren.<sup>[114d]</sup> Mit einer transgenen Maus-ES-Zelllinie, die verstärkt GFP unter Kontrolle des Promotors der schweren Kette von  $\alpha$ -Myosin exprimiert, wurde gefunden, dass Verapamil (ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker vom L-Typ) und Cyclosporin (ein Hemmstoff der Proteinphosphatase 2B) einen starken kardiomyogenen Effekt ausüben. Umgekehrt hemmt Forskolin, ein Stimulator der Adenylatcyclase, die Kardiomyozyten-Differenzierung. Der kardiomyogene Effekt von Cyclosporin und Verapamil korreliert mit der Expression der frühen Herzzell-Marker Nkx2.5 und GATA4, was darauf hindeutet, dass die Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals und/oder des Calcineurin-Signalwegs die Fähigkeit muriner ES-Zellen verstärken sollte, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren.

## 6. Chemische Kontrolle des Entwicklungspotenzials humaner ES-Zellen

Humane ES-Zellen wurden erstmals 1998 von James Thomson und Mitarbeitern isoliert<sup>[11]</sup> und werden inzwischen in vielen Labors routinemäßig verwendet. Wie die Gegenstücke bei Mäusen sind humane ES-Zellen zu karyotypisch stabiler, langanhaltender Selbsterneuerung fähig und können Ausgangspunkt für sämtliche der mehr als 200 Zelltypen sein, aus denen ein adulter Organismus besteht.<sup>[11]</sup> So haben sich humane ES-Zellen als unglaublich wirksames Werkzeug zur Untersuchung der Embryonalentwicklung erwiesen.<sup>[1]</sup> Außerdem können pluripotente Zelllinien, die als Modell für eine gegebene Krankheit dienen können, aus genetisch anomalen Embryos gewonnen werden, oder indem man erkrankte Zellen in pluripotente Zellen reprogrammiert (der zweite Ansatz wird in Abschnitt 8.3 behandelt)<sup>[115]</sup> und diese dann in den gewünschten Zelltyp differenzieren lässt.<sup>[7b]</sup>

Letztendlich ist absehbar, dass mit einem tiefergehenden Verständnis der Biologie humaner ES-Zellen Banken spezifischer Zelltypen zur Behandlung degenerativer Erkrankungen erzeugt werden können.<sup>[116]</sup>

### 6.1. Selbsterneuerung humaner ES-Zellen mit bekannten Modulatoren von Zielstrukturen und Signalwegen

Undifferenzierte humane ES-Zellen werden in Gegenwart von bFGF, Activin aus Feeder-Zellen und Serum gehalten und vermehrt.<sup>[11,72a]</sup> Diese Bedingungen sind zwar effektiv, haben aber einige Einschränkungen, z.B. Schwankungen bei der Formulierung der Feeder-Zellen und des Serums, die die Erhaltung konsistenter und robuster ES-Langzeitkulturen schwierig machen. Die Gegenwart unbekannter und/oder schwankender Faktoren in Aufrechterhaltungs- und Differenzierungscocktails erschwert außerdem den Vergleich experimenteller Ergebnisse aus unterschiedlichen Labors. Feeder-Zellen und Serum komplizieren zudem den Einsatz von ES-Zellen in klinischen Anwendungen. Eine andere Herausforderung ist, dass pluripotente humane Zellen notorisch schwer zu transfizieren oder transduzieren sind und daher nur wenige Knock-in-Linien existieren.<sup>[117]</sup> Dies fällt besonders auf, wenn man es mit der großen Zahl verfügbarer ES-Zelllinien von gentechnisch veränderten Mäusen vergleicht.<sup>[118]</sup> Dies macht auch die Untersuchung von Gen-Überexpressionen und/oder Knock-down in humanen ES-Zelllinien sehr schwierig, da homogene Populationen nicht leicht hergestellt werden können.

Niedermolekulare Verbindungen können viele der oben aufgezählten Schwierigkeiten überwinden und haben sich daher als nützliche Sonden für die Untersuchung humaner ES-Zellen und Werkzeuge zur Manipulation dieser Zellen bewährt (Tabelle 2). Beispielsweise ist einer der wichtigsten Mechanismen, nach denen humane ES-Zellen den undifferenzierten Zustand aufrechterhalten, die Aktivierung von SMAD2/3 und die dadurch ausgelöste Signalgebung.<sup>[13]</sup> Dies wurde durch die Hemmung des TGF $\beta$ /Activin/Nodal-Zweiges des TGF $\beta$ -Signalweges mit SB-431542 nachgewiesen.<sup>[119]</sup> Gibt man SB-431542 zu humanen ES-Zellen, die unter selbsterneuernden Bedingungen gehalten werden, wird dadurch rasche Differenzierung induziert. Außerdem verhindert die Behandlung die Phosphorylierung von SMAD2/3 und dadurch ihre Überführung in den Zellkern. Dieser Versuch zeigte, dass der Activin/Nodal-Signalweg essentiell ist für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz humaner ES-Zellen.<sup>[13]</sup> Die Fähigkeit humaner ES-Zellen zur Bildung von EBs war in mit SB-431542 behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen drastisch reduziert,<sup>[13a]</sup> was darauf hinweist, dass die SMAD2/3-Aktivierung notwendig, aber nur teilweise hinreichend ist für die Erhaltung der Pluripotenz. Demgegenüber ist die TGF $\beta$ /Activin/Nodal-Signalgebung über SMAD2/3 bei Maus-ES-Zellen verzichtbar, denn die Behandlung mit SB-431542 verringerte zwar die SMAD2/3-Phosphorylierung, hatte aber keinen Einfluss auf die Fähigkeit zu verlängerter Selbsterneuerung.<sup>[13a]</sup>

Auch die FGF-Signalgebung scheint eine entscheidende Rolle bei der Selbsterneuerung humaner ES-Zellen zu spie-



len. Der aktivierende Ligand bFGF ist Bestandteil fast aller veröffentlichten Wachstumsmedien für humane ES-Zellen.<sup>[11,120]</sup> Die Hemmung der FGF-Signalübertragung mit einem FGFR-Inhibitor SU5402 begünstigt die Differenzierung von humanen ES-Zellen,<sup>[13b,73a]</sup> was zu der Vorstellung passt, dass der Zusatz von bFGF zu Kulturmedien für humane ES-Zellen für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes notwendig ist. Der positive Effekt von bFGF auf die Erhaltung der Pluripotenz hängt strikt von den TGF $\beta$ -Signalen ab.<sup>[13b]</sup> Dies wurde nachgewiesen, indem der Activin/Nodal-Signalweg mit SB-431542 unterbrochen wurde. Unter solchen Randbedingungen konnte bFGF den undifferenzierten Zustand nicht aufrechterhalten. Es sieht also so aus, als ob der Activin/Nodal-Signalweg die Pluripotenz über Mechanismen sichert, bei denen FGF als Kompetenzfaktor wirkt.<sup>[13b]</sup>

Auch wenn klar ist, dass die Anreicherung des Wachstumsmediums für humane ES-Zellen mit bFGF einen positiven Effekt auf die Erhaltung des undifferenzierten Zustandes hat, sind die genauen mechanistischen Details, die dieser Aktivität zugrunde liegen, noch unbekannt. Zunächst wurde vermutet, dass die Hauptfunktion des FGF-Signals in humanen ES-Zellen darin besteht, die BMP-Aktivität zu hemmen.<sup>[121]</sup> Dies rührte von der Erkenntnis her, dass das BMP-Signal die Translokation von SMAD1/5/8 in den Zellkern aktiviert, was wiederum die *Id*-Expression und als Folge die trophoektodermale Differenzierung antreibt. Durch die Verwendung des FGFR-Inhibitors SU5402 in einem Versuch und einer hohen Dosis bFGF in einem anderen zeigten Vallier et al. jedoch, dass die FGF-Signalgebung keine Hemmung auf die BMP-Signale in humanen ES-Zellen ausübt.<sup>[13b]</sup> Phospho-SMAD1/5/8 wurde in keinem der Versuche beeinflusst, sodass naheliegt, dass die FGF-Signalgebung unabhängig vom BMP-Signal wirkt. Außerdem war keine Zunahme des BMP-induzierten nukleären SMAD1/5/8 zu beobachten, wenn das stromabwärts liegende FGF-Signal mit einem MEK-Inhibitor (U-0126) gehemmt wurde. Insgesamt scheint die Funktion von FGF bei der Selbsterneuerung humaner ES-Zellen nicht über die Hemmung der BMP-Aktivität vermittelt zu werden.

Dennoch stellt die Hemmung der BMP-Signalgebung ein Mittel dar, um die Selbsterneuerung humaner ES-Zellen in Abwesenheit externer Wachstumsfaktoren zu vermitteln. Wir konnten auch zeigen, dass der niedermolekulare Inhibitor der BMP-Signalgebung, Dorsomorphin,<sup>[66b]</sup> der in einem Screening mit einem Oct4-GFP-Reporterkonstrukt auf Moleküle, die die Selbsterneuerung humaner ES-Zellen vermitteln, gefunden wurde, den selbsterneuernden, pluripotenten Zustand aufrechterhält.<sup>[122]</sup> Weiterhin zeigten wir, dass die Dorsomorphin-Behandlung die autokrine Sekretion von BMP-Liganden (die in einem aufgeschalteten Regelkreis die trophoektodermale Differenzierung vermitteln) blockiert. Humane ES-Zellen, die in Gegenwart von Dorsomorphin gewachsen sind, können über einige Passagen ohne Feeder-Zellen und Wachstumsfaktoren gehalten werden, während sie das Potenzial behalten, in vitro verschiedene Entwicklungslinien zu differenzieren und in vivo Teratome zu bilden.

Bendall und Mitarbeiter vermuteten, dass die FGF-Signale in pluripotenten humanen ES-Zellen nicht direkt wirken, sondern eher die parakrine Produktion von IGF II

(Insulinwachstumsfaktor) aus autolog entstandenen fibroblastenähnlichen Zellen, so genannten humanen dermalen Fibroblasten (hDFs),<sup>[73a]</sup> begünstigen. In einer Reihe sorgfältig durchgeführter Versuche, in denen gereinigte Populationen von ES-Zellen und hDFs untersucht wurden, zeigten die Autoren, dass der FGFR-Inhibitor SU-5402 auf hDFs wirkt, indem er die Bildung von IGF-II und – weniger effizient – von TGF- $\beta$ 1 verhindert. Andererseits hatte SU-5402 keine Wirkung auf gereinigte ES-Zellen. Medien, die mit SU-5402-behandelten hDFs konditioniert waren, konnten die Selbsterneuerung humaner ES-Zellen nicht aufrechterhalten. Es wurde nachgewiesen, dass ES-Zellen ohne bFGF im pluripotenten Zustand arretiert werden können, wenn das BasalmEDIUM stattdessen mit IGF-II versetzt wurde. Dieser spezielle Befund hat wesentlich zu unserem Verständnis des Signalmechanismus beigetragen, der die Selbsterneuerung in humanen ES-Zellen steuert.

Unter den für die Entwicklung wichtigsten Signalwegen ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg der einzige, von dem man annimmt, dass er sowohl in humanen als auch murinen ES-Zellen vorkommt.<sup>[48]</sup> Die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signale können durch extrazelluläre Wnt-Liganden oder durch die Hemmung von GSK-3 $\beta$  aktiviert werden (Abbildung 2 a). Die Behandlung humaner ES-Zellen mit dem GSK-3 $\beta$ -Inhibitor BIO aktiviert die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung und hält den undifferenzierten Phänotyp aufrecht. Außerdem ist die BIO-vermittelte Wnt-Aktivierung funktional reversibel. Entfernt man die Verbindungen aus dem Medium, läuft das normale Multidifferenzierungsprogramm ab.<sup>[48]</sup>

Untersuchungen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in humanen ES-Zellen haben ergeben, dass die spezifische Aktivierung des Wnt-Weges die hämatoendotheliale Differenzierungsrichtung erhöht.<sup>[123]</sup> Aufgrund der Daten vermutet man, dass die BIO-vermittelte GSK-3 $\beta$ -Hemmung mehr als nur die Aktivierung von Wnt zur Folge hat. Dies stimmt auch mit der Rolle von GSK-3 $\beta$  bei einer Reihe verschiedener zellulärer Prozesse und seiner Position am Schnittpunkt verschiedener Signalwege (z. B. Hh, PI3K, nicht-kanonischer Wnt-Weg, cAMP) überein.<sup>[47b]</sup> Untersuchungen durch Brivanlou und Mitarbeiter konnten eine weitere Funktion von BIO bei der Selbsterneuerung aufklären: Durch die Behandlung von humanen ES-Zellen mit BIO wird SMAD2/3 aktiviert, was jedoch durch den TGF $\beta$ -Inhibitor SB-431542 wieder blockiert werden kann.<sup>[13a]</sup> Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Konvergenz der TGF $\beta$ /Activin/Nodal- und der BIO-induzierten Wnt-Aktivierung ist, dass die Behandlung mit BIO die Expression von TGF $\beta$ -Liganden in humanen ES-Zellen oder von autolog entstandenen Zellen induziert, die in der Lage sind, die Selbsterneuerung zu vermitteln. Diese Befunde stimmen mit den jüngsten Daten überein, nach denen die Wnt-Signalgebung die Selbsterneuerung oder Differenzierung von humanen ES-Zellen nicht direkt vermittelt, sondern stattdessen abhängig von den Zelltyp-spezifisierenden Faktoren jedes Resultat ermöglicht.<sup>[124]</sup> In Gegenwart von „Selbsterneuerungsfaktoren“ (d. h. exogenem bFGF und/oder BIO-ausgelöster Activin-Produktion) fördert die Wnt-Signalgebung die Proliferation selbsterneuernder ES-Zellen.

Ganz aktuell ist der Befund, dass die Hemmung der Histondeacetylaseaktivität (HDAC) ebenfalls ES-Zellen selbsterneuerungsfähig halten kann und dass dieser Mechanismus auch in Mauszellen greift.<sup>[125]</sup> Die Hemmung der HDAC wirkt sich in humanen Zellen offenbar so aus, dass sie in ein früheres Entwicklungsstadium zurückversetzt werden. Wie oben bereits diskutiert, verhalten sich humane ES-Zellen viel mehr wie EpiSCs aus Mäusen als wie traditionell aus Embryoblasten abgeleitete ES-Zellen (siehe Abbildung 1). Bei Zellvermehrung in Medien mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat scheinen selbsterneuernde Zellen aus Mäusen und humane ES-Zellen auf einen Entwicklungszustand hin zu konvergieren, der zwischen ihren „normalen“ Stadien liegt und an dem sich folgende Beobachtungen machen lassen: 1) Die Genexpressionsprofile mit Butyrat behandelter humaner und muriner ES-Zellen sind sich überraschend ähnlich, während mit Butyrat-freier Lösung behandelte Kontrollen nur wenig Gemeinsamkeiten zeigen. 2) Die Inaktivierung des X-Chromosoms wird in Butyrat-behandelten humanen ES-Zellen verhindert, was ein Charakteristikum von Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium ist. 3) Mit Butyrat behandelte humane ES-Zellen bilden Teratome viel höherer Komplexität. 4) Mit Butyrat behandelte Maus-EpiSCs werden Chimären-kompetent, eine Eigenschaft, die sonst nur in murinen ES-Zellen beobachtet wird, die aus Embryoblasten abgeleitet sind. Zusammengefasst kann man aufgrund dieser Ergebnisse eine chemisch definierte Methode für die Kultivierung von humanen ES-Zellen ableiten. Außerdem bieten sie einen vom Entwicklungsstadium unabhängigen Mechanismus, der den pluripotenten Zustand reguliert.

### 6.2. Gerichtete Differenzierung humaner ES-Zellen mit bekannten Modulatoren von Zielstrukturen und Signalwegen

Der Einsatz humaner ES-Zellen in der regenerativen Medizin und Wirkstoffsuche hängt von der Entwicklung von Techniken ab, die die In-vitro-Produktion der gewünschten Stammzell-abgeleiteten Zelltypen verlässlich ermöglichen. Konventionelle Differenzierungsvorschriften beruhen auf EB-Bildung, Cokultur mit Stroma-Feederzellen und/oder „Cocktails“, die Wachstumsfaktoren oder pleiotrop wirkende niedermolekulare Substanzen (z.B. Retinsäure) enthalten, um bestimmte Entwicklungsrichtungen zu fördern. Wie bei Maus-ES-Zellen erhält man jedoch mit den meisten dieser Methoden heterogene Differenzierungsergebnisse, und der gewünschte Zelltyp muss aus einem Gemisch unterschiedlicher Zelltypen abgetrennt werden. Außerdem kann das Differenzierungsmuster für spezialisierte Entwicklungslinien monatelange Kultivierung erfordern,<sup>[96c,126]</sup> was die Zahl der Zellen, die erzeugt werden können, wegen der Kosten und der Haltungsbedingungen drastisch einschränkt. Gegenwärtig gibt es nur sehr wenige effiziente und robuste Vorschriften für die Erzeugung von ES-Zell-Derivaten. Die Entwicklung solcher Methoden wird die Anwendung humaner ES-Zellen als Krankheitsmodelle und als therapeutische Agentien befördern.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strategien auf Basis niedermolekularer Verbindungen entwickelt, um die Entwicklungsrichtung humaner ES-Zellen selektiv zu kontrollieren. Beispielsweise wurde Rosiglitazon, ein Agonist des Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) eingesetzt, um den Prozentsatz von Adipozyten aus humanen ES-Zellen unter spezifischen Differenzierungsbedingungen zu erhöhen.<sup>[127]</sup> In einer anderen Untersuchung zeigten McLean et al., dass die Unterdrückung der PI3K-Signalgebung mit niedermolekularen Substanzen in Verbindung mit Activin A effizient definitives Endoderm aus humanen ES-Zellen definiert.<sup>[128]</sup> Auch die kombinatorische Anwendung niedermolekularer Verbindungen wurde ausprobiert, um spezielle Zelltypen zu erzeugen. So erhält man nach sequenzieller Anwendung von Retinsäure und dem Hh-Agonisten Purmorphamin mit hoher Ausbeute Differenzierung zu Motoneuronen (ca. 50 %) in chemisch definierter Kultur.<sup>[61b]</sup> In einer anderen aktuellen Untersuchung beschrieben Chambers et al. eine effiziente neuronale Induktionsmethode, indem sie den Hemmstoff SB-431542 des TGF $\beta$ -Signalweges mit dem sezernierten Protein Noggin kombinierten, das BMP4 bindet und hemmt.<sup>[83]</sup> Diese Vorschrift löst neuronale Induktion in hoher Ausbeute aus (> 80 %) und verkürzt die Differenzierungsperiode auf die halbe Zeit verglichen mit den Verfahren mit Stroma-Feederzellen (19 bzw. 30–50 Tage). Zudem lassen sich mit dieser Inhibitorkombination Neuronen aus dem Zentralnervensystem (wenn die ES-Zellen in hoher Zelldichte ausplattiert werden) oder dem peripheren Nervensystem (wenn die ES-Zellen in niedriger Dichte ausplattiert werden) erzeugen. Die ständig weitergeführte Entwicklung von Protokollen, wie der oben beschriebenen, verspricht einfachere Verfahren für die Ableitung von Entwicklungslinien aus humanen ES-Zellen für Anwendungen als Krankheitsmodelle und in Transplantationsstudien.

### 6.3. Identifizierung und Charakterisierung neuer Modulatoren humaner embryonaler Stammzellentwicklung

Der Einsatz niedermolekularer Verbindungen, die bekannte Entwicklungssignale modulieren, ist ohne Frage eine effiziente Strategie, um die Entwicklungsrichtung humaner ES-Zellen zu steuern. Es ist aber auch denkbar, dass die Differenzierung humaner ES-Zellen in vitro nicht den Musterbildungsprozessen der frühen Zellentwicklung entspricht. Insofern erzielt man nicht immer die erwarteten Ergebnisse, wenn man einen Zellentwicklungsprozess in vitro nachvollzieht. Dies ist damit gekoppelt, dass in vivo die Differenzierung von einem komplexen Zusammenspiel von Signalen einer Fülle von Zellen in den verschiedensten Differenzierungsstadien abhängt. Das Entfernen oder Selektieren eines gewünschten Zelltyps aus einer großen heterogenen, sich differenzierenden Zellpopulation kann ebenfalls die klare Ausrichtung auf einen bestimmten Zelltyp verändern. Ungerichtete Suchläufe mit niedermolekularen Verbindungen eröffnen andererseits die Möglichkeit, Modulatoren der Stammzelldifferenzierung auch jenseits bekannter Entwicklungsmuster zu finden. Synthetische Moleküle, die so identifiziert wurden, können direkt in Differenzierungsprotokolle

integriert werden oder als Sonden für die Untersuchung der zugrundeliegenden biologischen Vorgänge dienen.

Bei der Suche nach niedermolekularen Modulatoren für die Stammzellentwicklung wurden für Mauszellen eine Reihe von Verbindungen gefunden; von diesen sind allerdings nur wenige in humanen Zellen aktiv. Eine wichtige Ausnahme ist Stauprimid, das die Differenzierung humaner ES-Zellen in Kombination mit Activin A effizient in Richtung endodermaler Vorläuferzellen lenkt (Abbildung 6b).<sup>[41]</sup> Ein direktes Screening mit humanen ES-Zellen wird dadurch erschwert, dass diese als homogene Populationen in miniaturisierten Formaten (die für die Screeningsysteme notwendig sind) schwer zu vermehren sind, auch wenn dafür bereits effiziente Feederzell-freie und chemisch definierte Systeme entwickelt worden sind.<sup>[72a]</sup> Zentrales Problem ist, dass humane ES-Zellen wegen ihrer Empfindlichkeit für klonale Expansion als Aggregate passagiert werden müssen. Watanabe und Mitarbeiter folgerten aus ihren aktuellen Arbeiten, dass niedermolekulare Verbindungen die Ineffizienzen abmildern können, die mit der klonalen Expansion humaner ES-Zellen zusammenhängen. Sie fanden heraus, dass Inhibitoren der rho-assoziierten Kinase (ROCK; Y27632) die klonale Expansionseffizienz humaner ES-Zellen von ca. 1 % auf 27 % durch Hemmung der Apoptose steigern können.<sup>[129]</sup> Wichtig ist, dass diese klonal expandierten Zellen identisch sind mit humanen ES-Zellen, die als Aggregate passagiert wurden, und sie differenzieren zuverlässig in Entwicklungslinien aus allen drei Keimblättern, wenn man sie in Nacktmäuse injiziert. Die Anwendung von ROCK-Inhibitoren und/oder ähnliche Strategien sollten den Einsatz humaner ES-Zellen in chemischen Screeningverfahren sehr erleichtern.

Ungeachtet der vorher beschriebenen Einschränkungen untersuchten Studer und Mitarbeiter die Wirkung von rund 3000 biologisch aktiven Verbindungen auf humane ES-Zellen, wobei sie die Erhaltung und den Verlust von Pluripotenz anhand der Expression von Oct4 verfolgten.<sup>[130]</sup> Dabei wurden vier Verbindungen gefunden, die die Selbsterneuerung fördern und vier andere, die die Differenzierung fördern. Die Verbindungen, die die Oct4-Expression unterstützten, waren Theanin, Sinomenin, Gatifloxacin und Flurbiprofen. Sie alle förderten eine kurzfristige Selbsterneuerung in Medium, das nicht mit Mitogenen oder Feeder-Zellen konditioniert war. Keine der Verbindungen vermochte jedoch eine Langzeit-Selbsterneuerung zu fördern, weder allein noch in Kombination. Die Verbindungen, die die Differenzierung induzierten, waren Selegilin, Cymarin, Samentogenin und Retinsäure, die alle die Expression von Oct4 dosisabhängig vermindern.

Mit einer ähnlichen Screening-Plattform, in der ebenfalls die Oct4-Expression als Maß für die Pluripotenz diente, testeten wir humane ES-Zellen gegen eine Bibliothek von 529 gereinigten und auf einem Chip immobilisierten sezernierten Proteinen, um Kandidaten zu finden, die den pluripotenten Zustand aufrechterhalten.<sup>[30]</sup> Wir fanden, dass PEDF (Pigmentepithel-abgeleiteter Faktor) ein Langzeitwachstum von humanen ES-Zellen im pluripotenten Zustand ohne bFGF oder TGF $\beta$ /Activin/Nodal-Liganden auslösen kann. Unsere Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass die Aktivierung

des PEDF-Rezeptor-Erk1/2-Signalwegs durch PEDF ausreichend ist, um die Pluripotenz in humanen ES-Zellen zu sichern.

In einem anderen Fall führten Melton et al. ein Screening auf Verbindungen durch, die humane ES-Zellen schrittweise zur Differenzierung in funktionale insulinausschüttende  $\beta$ -Zellen anregen sollen. Grundlage war ein High-Content-Screening mit Bildauswertung, um Wirkstoffe zu identifizieren, die die Gesamtzahl der Pdx1-exprimierenden Pankreas-Vorläuferzellen aus definitivem Endoderm (das aus ES-Zellen gewonnen wurde) erhöhen.<sup>[131]</sup> Dabei wurde die Verbindung (–)-Indolactam-V (ILV) gefunden, das mit Wachstumsfaktoren kombiniert die Differenzierung humaner ES-Zellen so steuern kann, dass 44.5 % der Zellen zu Pdx1-exprimierenden Pankreas-Vorläuferzellen werden (Abbildung 6d). ILV war auch in verschiedenen humanen ES-Zelllinien und gegenüber IDE1-gerichtetem definitivem Endoderm (siehe Abschnitt 5.4.2) funktional.<sup>[106]</sup> Zusammen ergeben diese Verbindungen ein zweistufiges Verfahren zur In-vitro-Erzeugung von Pankreas-Vorläufern. Darin wird zunächst mit niedermolekularen Verbindungen (d.h. IDE-1) das Endoderm erzeugt, aus dem anschließend (d.h. mit ILV) Pankreas-Vorläufer gezüchtet werden. Die mit ILV abgeleiteten Pankreas-Vorläuferzellen waren in der Lage, in vitro zu pankreatischen Entwicklungslinien zu differenzieren und konnten in vivo endokrine und exokrine Zellen sowie Zellen des Pankreasganges beisteuern.

Frühere Untersuchungen mit ILV ergaben, dass die Verbindung die Signalgebung durch Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Um die Rolle dieser Signale bei der Differenzierung von Pankreas-Vorläufern zu testen, wurden PKC-Antagonisten (Bisindolylmaleimid I, Go 6983 und Go 6976) auf ILV-behandeltes definitives Endoderm aus humanen ES-Zellen gegeben. Die PKC-Antagonisten blockierten den Effekt von ILV; dementsprechend lag der Prozentsatz der Pdx1-exprimierenden Zellen in definitivem Endoderm, das mit den PKC-Inhibitoren und ILV behandelt worden war, sogar noch niedriger als die mit DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelten Kontrollen. Außerdem ahmte die Behandlung mit PKC-Agonisten (PMA oder TPB) in Abwesenheit von ILV den Effekt von ILV gegenüber humanem definitivem Endoderm aus ES-Zellen nach. Zusammengefasst lässt sich daraus schließen, dass ILV die Differenzierung von definitivem Endoderm aus ES-Zellen zu Pankreaszellen wenigstens teilweise über die Aktivierung der PKC-Signalgebung auslöst.

## 7. Chemische Kontrolle des Entwicklungspotenzials somatischer Stammzellen

### 7.1. Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sind multipotente Stammzellen, die sich im Knochenmark befinden und dort die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in alle Entwicklungslinien des Blutes haben (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten).<sup>[132]</sup> HSCs waren die erste isolierte Stammzellpopulation und sind die am besten charakterisierten adulten Stammzellen; außerdem sind sie die einzigen



Stammzellen, die routinemäßig in zellbasierten Therapien eingesetzt werden (z.B. bei Knochenmarkstransplantation).<sup>[19]</sup> Trotz der erzielten klinische Erfolge (z.B. bei Blutkrebs und bei Autoimmunerkrankungen) ist das volle klinische Potenzial von HSCs noch nicht realisiert.<sup>[133]</sup> Dies liegt vor allem an dem Mangel an klinisch verfügbaren HSCs – etwa 50% der Kandidaten für eine allogene Knochenmarkstransplantation finden keinen passenden Spender.<sup>[134]</sup> HSCs aus Nabelblut stellen zwar eine mögliche Lösung des Problems dar, doch es gibt noch keine Lösungen, um sie in dem Maß zu expandieren, das für die Transplantation eines Erwachsenen erforderlich ist. Die Identifikation pharmakologischer Wirkstoffe, die die Expansion und die Entwicklungsrichtung von HSCs in vivo oder in vitro kontrollieren, wäre eine große Erleichterung für die Anwendung von HSC-Therapien.

#### 7.1.1. *Selbsterneuerung von HSCs mit bekannten Modulatoren von Zielstrukturen und Signalwegen*

Bei verschiedenen Target-basierten Ansätzen wurden niedermolekulare Modulatoren der HSC-Selbsterneuerung gefunden (Tabelle 3a). So zeigten Young und Mitarbeiter, dass murine und humane HSCs, die in Gegenwart von HDAC-Inhibitoren kultiviert wurden, einen ursprünglicheren Phänotyp behielten als die Kontrollkulturen.<sup>[135]</sup> Einer der getesteten HDAC-Inhibitoren, Chlamydocin, erwies sich als höchst effizient für die Erhaltung der Thy-1-Expression in humanen HSCs (Thy-1 ist ein Marker des undifferenzierten Zustands). In einem Wiederbesiedlungstest in Nod-SCID-Mäusen (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient) wiesen Zellen, die 24 h mit Chlamydocin behandelt worden waren, eine durchschnittlich viermal so hohe Transplantationshäufigkeit auf wie die Kontrollzellen. In einer später erschienenen Arbeit wurden die Auswirkungen von zwei chromatinmodifizierenden Substanzen (dem DNA-Methyltransferasehemmer 5-AzaC und dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A; TSA) auf HSCs aus der Nabelschnur (CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>) untersucht.<sup>[136]</sup> Gleichzeitige Behandlung dieser Zellen mit TSA und 5-AzaC ergab eine 12.5fache Expansion der behandelten Kultur im Vergleich zu den Ausgangszellen. Die Expansion der CD34<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup> war auch begleitet von einem 9.8fachen Anstieg der gebildeten Kolonie-bildenden Einheiten und einem 11.5fachen Anstieg an CAFCs (cobblestone area forming cells; die Tests werden eingesetzt, um die Zahl der multipotenten HSCs zu bestimmen). Während HDAC-Inhibitoren humane HSCs expandieren können, sind ihre Einsatzmöglichkeiten für klinische Anwendungen begrenzt, weil ihre Effekte nur in einem engen Konzentrationsbereich (5–10 nM) beobachtbar sind, während höhere Konzentrationen zu Wachstumsstopp und Zytotoxizität führen.

Serotonin, ein Monoamin-Neurotransmitter, kann ebenfalls humane HSCs in nahezu physiologischer Konzentration (200 nM) expandieren.<sup>[137]</sup> Mit Serotonin expandierte HSCs, die in sublethal bestrahlte Nod-SCID-Mäuse infundiert wurden, wuchsen viel effizienter an als die Kontrollen. Die Beteiligung von Serotonin an der HSC-Expansion hat den vielen Funktionen dieses neuronalen Transmitters eine wei-

tere Wirkung hinzugefügt, die weitere Untersuchungen zur Identifizierung der die HSC-Selbsterneuerung regulierenden Signalwege verlangt.

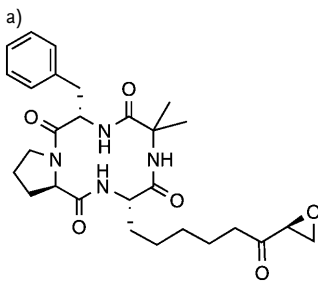
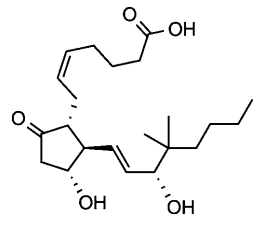
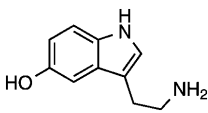
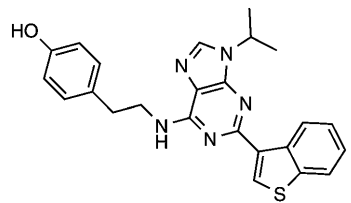
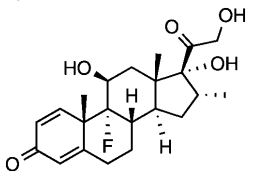
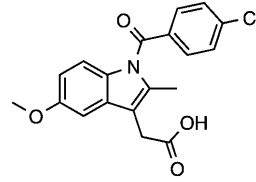
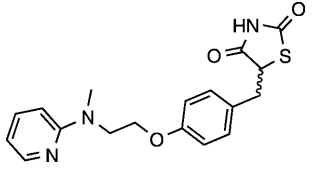
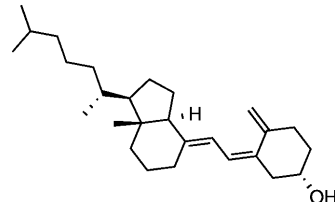
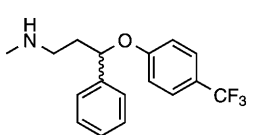
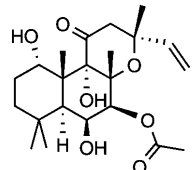
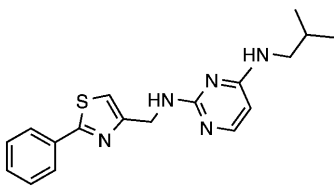
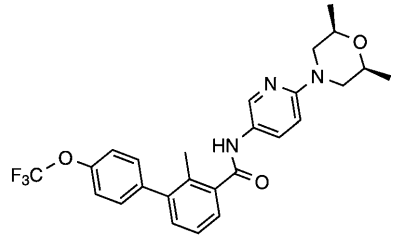
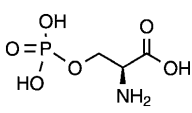
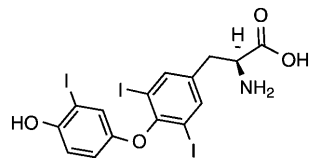
Klinische Befunde lassen vermuten, dass Kupferionen (Cu<sup>2+</sup>) eine Rolle bei der Regulation der HSC-Entwicklung spielen könnten.<sup>[138]</sup> Tatsächlich konnten Peled und Mitarbeiter zeigen, dass ein Chelatligand für Kupfer, Tetraethylenpentamin (TEPA), eine bevorzugte Proliferation naiver HSCs bewirkte, wodurch die Ex-vivo-Langzeitexpansion und die Transplantationskapazität gesteigert wurden. In einem präklinischen Test – nach dreiwöchiger Expansion unter Kulturbedingungen in großem Maßstab – war in Gegenwart von TEPA die Zahl der naiven HSCs um das 89fache und Zahl aller HSCs um das 172fache gegenüber dem Ausgangswert erhöht. Die Transplantation von TEPA-behandelten HSCs in Nod-SCID-Mäuse ergab Hinweise, dass das Anwachspotenzial der ex vivo expandierten Zellen das der nicht-expandierten Zellen übertrifft.<sup>[139]</sup> Die Chelator-gestützte Ex-vivo-Expansionstechnik wird gegenwärtig in einer klinischen Phase II/III bei Patienten getestet, die sich wegen hämatologischer Erkrankungen einer Transplantation von Nabelschnurblut unterziehen.<sup>[138a]</sup>

#### 7.1.2. *Identifikation und Charakterisierung neuer Modulatoren der HSC-Selbsterneuerung*

Unsere Arbeitsgruppe und auch andere haben versucht, mit ungerichteten zellbasierten Screeningansätzen neue niedermolekulare Verbindungen zu finden, die HSCs expandieren. Hochspezifische transgene Reporter-Testsysteme sind an sich gut geeignet für die Suche nach kleinen Molekülen (siehe Abschnitt 3), lassen sich aber wegen der Schwierigkeiten, transgene HSC-Linien zu konstruieren und zu vermehren, nicht auf humane HSCs anwenden. Daher griffen wir bei der Suche nach niedermolekularen Verbindungen, die die Selbsterneuerung von HSCs fördern, zu einem Test mit Bildauswertung, der nach der In-vitro-Kultivierung die undifferenzierten Zellen bestimmt.<sup>[36]</sup> Primäre humane CD34<sup>+</sup>-HSCs wurden in serumfreiem Medium angezogen, das mit Thrombopoietin, Stammzellfaktor, Flt3-Ligand und Interleukin-6 versetzt war. Diese Bedingungen lösten eine robuste Proliferation in Verbindung mit Differenzierung und Verlust von HSC-Aktivität aus.<sup>[135,140]</sup> Die HSC-Differenzierung wurde anhand der Expression der Zelloberflächenmarker für undifferenzierte Zellen (CD34 und CD133, Abbildung 7a) sichtbar gemacht.

Beim Durchmustern einer Heterocyclen-Bibliothek<sup>[29]</sup> wurde das Purinderivat SR1 gefunden, das die Gesamtzahl der aus Nabelschnurblut gewonnenen HSCs nach 5 Wochen mehr als 50fach im Vergleich zu Kontrollkulturen (Medium + Zytokine) vermehrte.<sup>[36]</sup> Biochemische Markierungsversuche deuten darauf hin, dass SR1 symmetrische Zellteilungen vermittelt, ohne dass die ursprünglichen Charakteristika verloren gehen. Zellen, die 21 Tage in Gegenwart von SR1 kultiviert wurden, erreichten eine 17fach bessere Transplantationseffizienz auf Nod-SCID-Mäuse (im Vergleich zu den Ausgangszellen oder Kontrollkulturen); sie bewahren außerdem die Fähigkeit, sich in verschiedene Richtungen zu

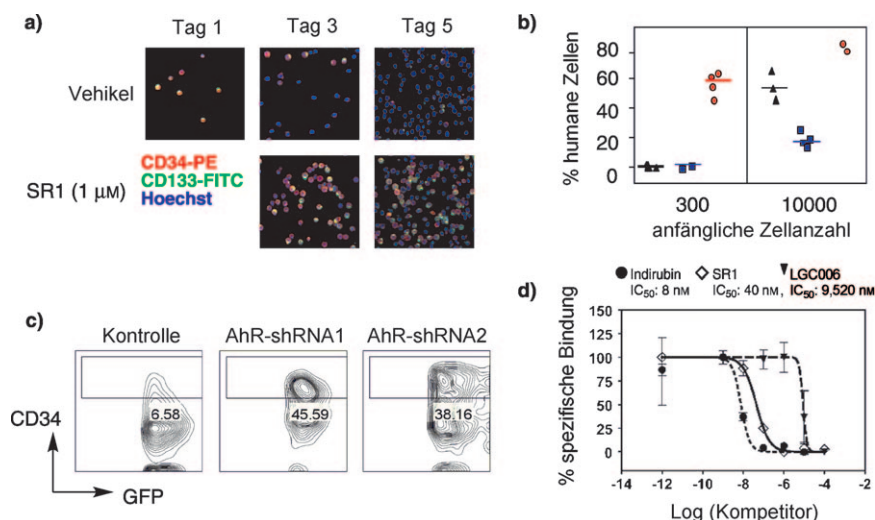
**Tabelle 3:** Ausgewählte niedermolekulare Modulatoren der Entwicklungsrichtung somatischer Stammzellen: a) HSCs; b) MSCs; c) NSCs.

Verbindung	Zielstruktur Funktion	Verbindung	Zielstruktur Funktion
a)			
	<b>Chlamydocin</b> HDACs Aufrechterhaltung eines primitiven Phänotyps in HSCs		<b>16,16-Dimethylprostaglandin E2 (dmPGE2)</b> Prostaglandin E2-Rezeptor Steigert das Anwachspotenzial von HSCs
	<b>Serotonin</b> Serotonin-Rezeptor Verstärkt die Expansion von HSCs		<b>SR1</b> AhR Vermittelt die Selbsterneuerung von HSCs
b)			
	<b>Dexamethason</b> Glucocorticoid-Rezeptor Vermittelt die osteogene Differenzierung von MSCs		<b>Indomethacin</b> COX-1 und COX-2 Vermittelt die adipogene Differenzierung von MSCs
	<b>Rosiglitazon</b> PPARs Vermittelt die adipogene Differenzierung von MSCs		<b>Vitamin D3</b> Vitamin D-Rezeptor Potenziert die osteogene Differenzierung von MSCs
c)			
	<b>Fluoxetin</b> Monoamin-Transporter Stimuliert die Neurogenese im Hippocampus		<b>Forskolin</b> Adenylatcyclase Vermittelt die neuronale Differenzierung von NSCs
	<b>KHS101</b> TACC3 Vermittelt die neuronale Differenzierung von NSCs		<b>NVP-LDE225</b> Smo Hh-Antagonist; induziert den Zelltod von Medulloblastomzellen
	<b>Phosphoserin (P-Ser)</b> mGluR4 Vermittelt die neuronale Differenzierung von NSCs und humanen ES-Zellen		<b>Triiodothyronine (T3)</b> Thyroidhormon-Rezeptor Vermittelt die oligodendrogliale Differenzierung von OPCs

differenzieren und sekundäre Rezipienten zu besiedeln (Abbildung 7b).

Eine mRNA-Expressionsanalyse mit SR1 und einem nahe verwandten inaktiven Analogon ließ vermuten, dass

SR1 die HSC-Expansion kontrolliert, indem es als Antagonist des AhR-Signals wirkt. Gestützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass eine Behandlung mit SR1 die Induktion der Zielgene von AhR (CYP1B1, AHRR) durch den AhR-



**Abbildung 7.** SR1 vermittelt die Expansion CD34-positiver Zellen durch Antagonisierung des AhR. a) SR1-behandelte CD34-positive Zellen halten die Expression von Stamm- und Vorläufer-Zellmarkern aufrecht. b) NOG-Mäusen wurden 300 oder 10000 unkultivierte (▲) CD34-positive CB-abgeleitete Zellen injiziert; resultierende Kulturen mit den Nachkommen der 300 oder 10000 CB-stämmigen CD34-positiven Zellen, die 21 Tage lang mit Cytokinen und SR1 (0.75 µM, ●) bzw. mit Cytokinen und dem Träger (DMSO 0.01 %, ■) kultiviert wurden. Gezeigt ist der Prozentsatz humaner CD45-positiver Zellen im Knochenmark nach 13 Wochen. c) Der shRNA-vermittelte Knock-down von AhR rekapituliert die gleiche Aktivität von SR1. d) Direkte Bindung von SR1 an AhR im Vergleich zum hochaffinen humanen AhR-Agonisten Indirubin und einem weniger aktiven SR1-Analogen (LGC006). Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [36]; Copyright 2010, American Association for the Advancement of Science.

Agonisten 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Dioxin) verhindert. Um eine direkte Beteiligung des AhR an der HSC-Expansion zu zeigen, wurde mit Lentiviren, die gegen AhR gerichtete shRNAs codieren, die AhR-Expression in HSCs aus Nabelschnurblut reduziert. Dies machte sich in einer anhaltenden Expression von CD34 während der Ex-vivo-Kultur bemerkbar, der Phänotyp ähnelt also dem von Kulturen, die mit SR1 behandelt wurden (Abbildung 7c). Außerdem wurde nachgewiesen, dass der antagonistische Effekt von SR1 auf den AhR-Signalweg über eine direkte Wechselwirkung mit diesem nukleären Rezeptor ( $IC_{50} \approx 40$  nM; Abbildung 7d) vermittelt wird. Weil der Erfolg einer Knochenmarkstransplantation mit der Zahl der HSCs korreliert, könnte die Identifizierung von SR1 (und des AhR-Signalweges als Mittel zur Kontrolle der HSC-Selbsterneuerung) den klinischen Einsatz von HSCs aus Nabelschnurblut für autologe und allogene Transplantationstherapien wesentlich erleichtern.

Auch North et al. durchsuchten kürzlich eine Bibliothek biologisch aktiver Substanzen auf Moleküle, die die Hämatopoese beeinflussen.<sup>[141]</sup> Sie verwendeten ein Zebrafischmodell und suchten gezielt nach veränderten HSC-Zahlen. Eine In-situ-Hybridisierungsanalyse 36 h nach der Befruchtung lieferte eine Reihe von Molekülen, die die Zahl der HSCs erhöhen, indem sie die Synthese von Prostaglandin E2 verstärken. Dazu passt, dass niedermolekulare Inhibitoren der PGE2-Synthese auch die Anzahl der Stammzellen reduzieren. Die Zugabe eines lange wirksamen Derivats von PGE2 (16,16-Dimethylprostaglandin E2; dmPGE2) während der Vermehrung der Embryoidkörperchen erhöhte die Zahl der

multipotenten HSCs auf das 2.9fache gegenüber der Kontrolle. Gesamtknochenmark von Mäusen, das ex vivo mit dmPGE2 behandelt und dann in bestrahlte Rezipienten transplantiert wurde, erzielte eine dreifache Zunahme der koloniebildenden Einheiten von Milzzellen 12 Tage nach der Transplantation. Die Häufigkeit sich kurzfristig ansiedelnder HSCs war 12 Wochen nach Transplantation bei den Empfängern des dmPGE2-behandelten vollständigen Knochenmarks ebenfalls viermal so hoch. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die höhere Zahl der dmPGE2-HSCs in den Mäusestudien das Ergebnis eines höheren Transplantationsvermögens der HSCs war und nicht durch eine tatsächliche Vermehrung der HSC-Zahl ex vivo zustande kam.

Festzuhalten bleibt, dass mittels ungerichteter Ansätze gefundene Verbindungen wichtige Einblicke in die Signalwege ermöglichten, die die Selbsterneuerung der HSCs kontrollieren (Tabelle 3a). Außerdem führen diese Befunde bereits zur Entwicklung von Wirkstoffen, die den klinischen Einsatz

von HSCs in der Transplantationstherapie ausweiten werden.

### 7.1.3. Gerichtete Differenzierung von HSCs

Die aktuellen Ergebnisse deuteten auch die Möglichkeit an, dass HSCs und/oder ihre Vorläufer für die Reparatur oder den Ersatz von Blutgeweben und -zellen (z. B. Erythrozyten, Megakaryozyten) nützlich sein könnten. Daher gibt es viele Bestrebungen, eine direkte Differenzierung und/oder Vermehrung von Zellen aus den hämatopoetischen Entwicklungslinien zu induzieren. Thrombozytopenie ist beispielsweise durch eine anomal niedrige Plättchenzahl charakterisiert und stellt für Patienten mit intensiver, hochdosierter Chemotherapie oder mit seltenen genetischen Erkrankungen ein ernsthaftes Problem dar. Möglicherweise ist die Infusion ex vivo vermehrter Megakaryozyten-Vorläuferzellen (MPCs) eine effiziente Strategie, um die Neubildung von Blutplättchen zu beschleunigen. In mehreren klinischen Studien gelang es, die Thrombozytopenie durch die Infusion MPC-reicher Stammzellen aus peripherem Blut<sup>[142]</sup> oder aus Knochenmark<sup>[143]</sup> abzumildern. Daher wird ein Verfahren benötigt, um die Differenzierung von HSCs ex vivo oder in vivo hin zur Bildung von Megakaryozyten zu lenken.

Gegenwärtig verfügbare Verfahren zur Megakaryozyten-Differenzierung ex vivo basieren auf Signalmolekülen, die bei der Untersuchung der Megakaryozytopoese gefunden wurden. Darunter ist Thrombopoietin das effektivste, obwohl es auch Differenzierungsprogramme für die parallele Aktivierung mehrerer Entwicklungslinien aktiviert.<sup>[144]</sup> Um die Nachteile durch diese pleiotropen Differenzierungsstrategien



zu vermeiden, suchten wir nach Molekülen, die die Differenzierung von HSCs zu Megakaryozyten steuern. Das Screening wurde ähnlich durchgeführt wie das auf Vermehrung der HSCs, nur wurden die Zellen jetzt mit Megakaryozyten- und Erythrozytenmarkern gekennzeichnet. Bei diesem Ansatz wurde eine Klasse von Naphthyridinonen identifiziert, die dosisabhängig die Megakaryozyten-Differenzierung steigern. Humane HSCs, die 8 Tage mit dieser Substanz behandelt, dann unter Bedingungen für die Differenzierung zu Megakaryozyten neu ausplattiert und schließlich weitere 12 Tage kultiviert wurden, erzeugten eine drei- bis vierfach höhere Zahl an Megakaryozyten als die Kontrollkulturen. Wichtig ist, dass auch nach Entfernung der Verbindung die Megakaryozyten-Vorläufer funktional bleiben und die Differenzierung abschließen und Kolonien bilden. Die Verbindung wirkt auf allgemeine Myeloid-Vorläufer (common myeloid progenitors; CMPs) und vermehrt die Megakaryozyten-/Erythrozyten-Vorläufer (MEPs). Gereinigte CMPs, die mit der Verbindung behandelt wurden, zeigten eine Zunahme der Megakaryozyten-Differenzierung ähnlich wie bei gemischten Populationen von HSCs.<sup>[145]</sup> Ähnliche Ansätze werden auch verfolgt, um niedermolekulare Verbindungen und sezernierte Proteine zu finden, die die Erythrozyten-Reifung beeinflussen. Solche Moleküle könnten letztendlich zur Ex-vivo-Gewinnung von Blutzellen für Blutplättchen- und Erythrozytenmangel dienen.

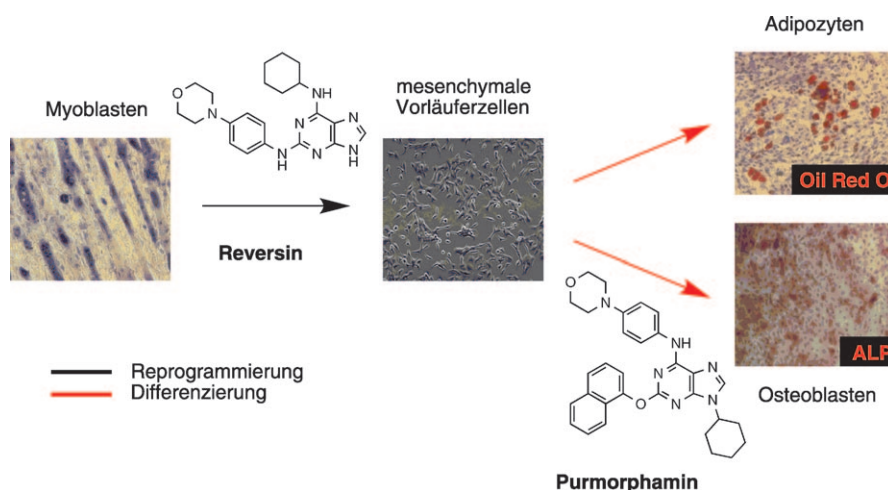
## 7.2. Mesenchymale Stammzellen

Neben den HSCs beherbergt Knochenmark eine weitere Population multipotenter Stammzellen, nämlich solche, die zur Regeneration von mesenchymalen Geweben wie Osteoblasten (Knochen), Chondrozyten (Knorpel) und Adipozyten (Fettgewebe) beitragen.<sup>[21,146]</sup> Das Differenzierungspotenzial dieser Zellen ähnelt dem der mesodermalen Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung; sie werden daher mesenchymale Stammzellen (MSCs) genannt. Außer im Stroma des Knochenmarks hat man MSCs auch in anderen Geweben, darunter Fettgewebe, Muskeln, Gefäßen und Haut gefunden.<sup>[147]</sup> Neuere Studien zu einer Reihe von Krankheiten und Krankheitsmodellen haben ergeben, dass sich adulte MSCs nach Injektion in einer Verletzung ansiedeln können und dort die Wiederherstellung der Gewebefunktion unterstützen.<sup>[148]</sup> MSCs exprimieren auch keine HLA-Antigene der Klasse II und werden daher als nicht-immunogen angesehen; eine Transplantation in einen allogenen Wirt könnte also ohne lebenslange Immunsuppression möglich sein. MSCs lassen sich auch relativ einfach isolieren und vermeh-

ren sich einfach in Kultur. Daher finden sie einige Aufmerksamkeit für zellbasierte Therapien.<sup>[149]</sup>

Die Identifizierung wirksamer und spezifischer niedermolekularer Modulatoren der MSC-Differenzierung sollte nützliche chemische Werkzeuge zur Untersuchung von Entwicklungsmechanismen liefern und könnte letztlich auch zu neuen Therapeutika zur Behandlung einer Reihe degenerativer Erkrankungen führen, etwa Osteoarthritis (OA) und Knochenverlust. Um niedermolekulare Verbindungen zu finden, die selektiv die Osteogenese induzieren, entwickelten wir ein Hochdurchsatz-Screening, das in einem Enzymtest die Expression von ALP (alkalischer Phosphatase) registriert, einem Marker, der auf Osteoblasten, nicht aber auf mesenchymalen Vorläuferzellen exprimiert wird. Ein Screening der murinen mesenchymalen Vorläufer-Zelllinie C3H10T1/2 mit einer chemischen Bibliothek lieferte ein 2,6,9-trisubstituiertes Purin, Purmorphamin, mit starker Differenzierung zu Osteoblasten induzierender Aktivität.<sup>[34]</sup> Die Verbindung reguliert die Cbfa1/Runx2-Expression (einen übergeordneten Regulator der Knochenentwicklung) und andere knochen-spezifische Marker wie Osteopontin und Kollagen-I hoch. Mit Purmorphamin behandelte Zellen haben außerdem die charakteristische Osteoblasten-Morphologie (Abbildung 8). In einer anschließenden Untersuchung stellte sich auch heraus, dass Purmorphamin die terminale Reifung von Maus-Prä-osteoblasten induziert. In Kombination mit BMP4 kann es auch die 3T3L1-Präadipozyten- und die C2C12-Myoblasten-Zelllinie zu Osteoblasten transdifferenzieren.<sup>[150]</sup>

Die BMP-Signalgebung ist an der Osteoblasten-Differenzierung beteiligt. Wenn C3H10T1/2-Zellen mit BMP4 behandelt werden, differenziert die Mehrzahl der Zellen zu Osteoblasten. Eine signifikante Zahl der Zellen differenziert aber zu Adipozyten, was darauf hinweist, dass die BMP-induzierte Differenzierung nicht vollständig spezifisch für eine Entwicklungslinie ist. Um Näheres über die zelluläre Antwort



**Abbildung 8.** Chemische Kontrolle adulter mesodermaler Zellen. Reversin reprogrammiert Myoblasten in multipotente Vorläuferzellen, die in Fettzellen (Adipozyten) und Knochenzellen (Osteoblasten) differenzieren können. Die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoblasten wird durch den Hh-Agonisten Purmorphamin verstärkt. Für Abstammungslinien spezifische Färbungen sind rot; die Zellkernfärbung mit Hämatoxylin ist blau gezeigt. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [39] (Copyright 2007, National Academy of Science, USA) und Lit. [33] (Copyright 2004, Elsevier).

auf die Purmorphaminbehandlung zu erfahren, wurde eine Transkriptionsanalyse an C3H10T1/2-Zellen nach Behandlung mit Purmorphamin oder BMP4 durchgeführt.<sup>[33]</sup> Aufgrund der Genexpressionsdaten wird vermutet, dass Purmorphamin eine andere biologische Aktivität als BMP4 hat und dass durch die Behandlung mit Purmorphamin stromabwärts liegende Schlüsselgene des Hh-Signalwegs, darunter Gli1 und Ptc, hochreguliert werden. Antagonisten des Hh-Signalwegs blockieren die Fähigkeit von Purmorphamin, den Hh-Signalweg zu aktivieren und die Osteogenese zu induzieren. Chen et al. bestätigten, dass Purmorphamin den Hh-Signalweg aktiviert, indem es direkt an den Hh-Rezeptor Smo bindet.<sup>[35]</sup>

Außer Purmorphamin wurden noch mehrere andere niedermolekulare Verbindungen und chemische Cocktails mit der Fähigkeit zur Induktion der MSC-Differenzierung gefunden (Tabelle 3b). 5-Aza-dC fördert beispielsweise die Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten.<sup>[151]</sup> Dabei aktiviert 5-Aza-dC kein spezifisches Differenzierungsprogramm, sondern überführt die Zellen in einen für eine spontane Differenzierung kompetenten Zustand, der für den pleiotropen Effekt verantwortlich ist. Andere niedermolekulare Verbindungen, die die Osteogenese oder Adipogenese aus MSCs modulieren, sind oft bereits in allgemeinen Differenzierungs-Cocktails enthalten. Einige davon enthalten PPAR $\gamma$ -Agonisten (wie Rosiglitazon) und Antagonisten, die weithin als Adipogenese-Modulatoren verwendet werden: Dexamethason (ein Agonist des Glucocorticoidrezeptors), Ascorbinsäure, Isobutylmethylxanthin (IBMX, ein unspezifischer Phosphodiesterase-Inhibitor), Retinsäure, Vitamin D3 und Indomethacin, das unter sorgfältig ausgewogenen Bedingungen Osteogenese oder Adipogenese von MSCs induzieren kann.<sup>[152]</sup>

Osteoarthritis betrifft allein in den Vereinigten Staaten 40 Millionen Menschen, und bislang gibt es keine Therapie, die den Krankheitsverlauf beeinflusst. Die wichtigsten Ereignisse in der Pathogenese von OA sind anomale Aktivierung und chondrozytische Differenzierung von MSCs in den verletzten oder erkrankten Gelenken. Wenn adulte MSCs in vitro jedoch geeigneten Reizen ausgesetzt werden, können sie eine neue funktionale extrazelluläre Knorpelmatrix bilden. Moleküle, die das regenerative Potenzial der Knorpelstammzellen aktivieren, könnten möglicherweise auch weitere Knorpelzerstörung verhindern und die Reparatur der Knorpelschäden stimulieren. Zu diesem Zweck führten wir sowohl Screenings mit Bildauswertung als auch solche mit Alcian-Blau durch, um Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen nach Vertretern zu durchsuchen, die die Bildung chondrogener Keime in primären humanen MSCs und murinen C3H10T1/2-Zellen vermitteln. Mit dieser Plattform fanden wir ein Molekül, Chondrogenin, das selektiv die Chondrogenese induziert (Hochregulation von Sox9, Lubricin, Typ-II-Kollagen und Aggrecan-Expression, nicht aber von Osteocalcin oder Typ-X-Kollagen). Dieses Molekül wirkte auch schützend (durch Glucosaminoglycan- und NO-Freisetzung) in explantierten Knorpel-Kulturen, die in Gegenwart von TNF $\alpha$  und Oncostatin M gezüchtet wurden. In beiden Rattenmodellen von OA (Kollagenase VII und chirurgische Bänderverletzung) linderte Chondrogenin nach In-

jektion ins Gelenk effizient die Schmerzen und verbesserte statistisch die histologische Bewertung des Gelenkzustands verglichen mit der Kontrolle. Der Wirkmechanismus dieses Moleküls und mögliche therapeutische Anwendungen werden gegenwärtig untersucht.<sup>[153]</sup>

### 7.3. Neuronale Stammzellen

Neuronale Stammzellen (NSCs) befinden sich in abgegrenzten Regionen des adulten Gehirns und sind zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in Neuronen, Astrocyten und Oligodendrozyten fähig.<sup>[154]</sup> Neuronen sind die funktionalen Bestandteile des Nervensystems, die für Informationsverarbeitung und -weiterleitung zuständig sind; Astrozyten und Oligodendrozyten sind insgesamt als Glia bekannt und spielen eine unterstützende Rolle, die für das reibungslose Funktionieren des Nervensystems unverzichtbar ist. Im Gehirn können NSCs auf externe Stimuli reagieren und können sich, wenn sie trainiert sind, funktional in die existierenden neuronalen Netzwerke integrieren.<sup>[20]</sup> Die Existenz multipotenter Zellen in verschiedenen Regionen des adulten Gehirns eröffnet die Möglichkeit einer nicht-invasiven Reparatur des Gehirns. Mögliche Therapien könnten in einer Behandlung mit einem Wirkstoff bestehen, um die körpereigenen regenerativen Mechanismen für Überleben, Migration, Proliferation und/oder Differenzierung der endogenen NSCs zu stimulieren.

NSCs können auch einfach ex vivo in Gegenwart von Wachstumsfaktoren (wie dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF und/oder bFGF) vermehrt werden, oder die Differenzierung wird als Reaktion auf das Absetzen des Mitogens oder durch Zugabe verschiedener für die Entwicklungslinien spezifische Stimuli (z. B. BMP4 oder Retinsäure) induziert. Der Einsatz solcher Zellen für die Transplantation stößt allerdings auf verschiedene Hindernisse: Die NSC-Isolierung ist schwierig und invasiv, effiziente Methoden zur Herstellung reiner neuronaler Subtypen von NSCs fehlen, und robuste Methoden zur Integration der eingepflanzten Gewebe in bestehende neuronale Netzwerke werden noch entwickelt. Eine andere Komplikation ist, dass NSCs, die aus verschiedenen Regionen des Gehirns und/oder zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert wurden, verschieden auf die Signale reagieren.<sup>[155]</sup> Außerdem gab es diverse Schwierigkeiten, die experimentellen Ergebnisse von Ratten auf Menschen zu übertragen. Daher sollte die Entwicklung chemischer Werkzeuge, die die Differenzierungsrichtung von NSCs kontrollieren, unser Verständnis der NSC-Biologie vertiefen und vielleicht irgendwann in therapeutische Anwendungen münden.

#### 7.3.1. Selbsterneuerung neuronaler Stammzellen

Je nach Umfeld spielen verschiedenste Signalwege mit hinein (EGF, VEGF, BMP, LIF-JAK-STAT, Notch und andere), ob eine NSC sich selbst erneuert oder differenziert.<sup>[72b]</sup> Mithilfe niedermolekularer Verbindungen, die Signalwege und Zellzyklus unterbrechen, wurden zahlreiche Erkenntnisse über diese komplexen Vorgänge gewonnen

(Tabelle 3 c). Zum Beispiel wurde gefunden, dass der Notch-Signalweg die Selbsterneuerung von NSCs vermittelt und dass das JAK-STAT-Signal über den LIF-Rezeptor (LIFR) antagonisiert werden kann. McKay und Mitarbeiter wiesen nach, dass die Hemmung von JAK oder p38 (stromabwärts gelegenen Mediatoren von LIFR) die Selbsterneuerung von NSCs vermittelt und dass dies auf Kosten der Differenzierung geht.<sup>[157]</sup> Der Hh-Signalweg reguliert die Proliferation adulter NSCs aus dem Hippocampus in vitro und in vivo.<sup>[61a]</sup> Porter et al. zeigten, dass ein für den Hh-Signalweg spezifischer Agonist (Hh-Ag1.2) in der Lage ist, die Proliferation von NSCs zu stimulieren.<sup>[59a]</sup> Dies ist mit der Beobachtung von Berman et al. konsistent, dass der niedermolekulare Hh-Antagonist Cyclopamin die Proliferation hemmen kann und die Differenzierung der murinen aus dem Gehirn stammenden CSCs initiiert.<sup>[62a]</sup> Cyclopamin oder der neue Hh-Antagonist NVP-LDE225 sind bei Anwendung auf murine Tumor-Allografts in vivo wirksam und induzieren einen raschen Zelltod humaner Medulloblastomazellen.<sup>[59a,158]</sup> Diese Ergebnisse haben schlüssig belegt, dass der Hh-Signalweg eine beherrschende Rolle bei der Selbsterneuerung verschiedener Stammzellen des Gehirns spielt.

Um neue Mechanismen zu entdecken, die an der Selbsterneuerung von NSCs beteiligt sind, führten Diamandiset et al. ein zellbasiertes Screening mit einer Bibliothek pharmakologisch aktiver Verbindungen durch; gesucht wurden Moleküle, die die Proliferation von Neurosphären in murinen NSCs hemmen.<sup>[159]</sup> Dabei wurden einige neuromodulatorische Verbindungen gefunden, z.B. Dihydrocapsaicin (ein Agonist des Vanilloid-Rezeptors), Apomorphin (ein Agonist des Dopamin-Rezeptors) und *p*-Aminophenetyl-*m*-trifluormethylphenylpiperazin (PAPP; ein Serotonin-Agonist) sowie zahlreiche andere Modulatoren des Serotonin-, Opioid- und Glutamat-Signalwegs. Wichtig ist, dass bei diesem Screening auch bekannte Modulatoren der NSC-Selbsterneuerung und -Differenzierung gefunden wurden, darunter der Hh-Antagonist Cyclopamin ebenso wie Inhibitoren von p38 und JAK (SB-202190 und WHI-P131). Die Autoren zeigten, dass die Bildung der Neurosphären durch viele dieser Verbindungen gehemmt wurde, was bedeutet, dass die replikativen Stammzellen – die die neuen Neurosphären wiederherstellen – inaktiviert worden waren. Auffällig ist, dass viele der Verbindungen, die auf Neurosphären proliferationshemmend wirken, auch das Wachstum von Tumorsphären in vitro hemmen, darunter bekannte Modulatoren der Dopamin-, Opioid-, Vanilloid- und Serotonin-Signalwege. Möglicherweise können klinisch erprobte neuromodulatorische Verbindungen das reife Zentralnervensystem remodellieren und sich dabei als nützlich bei der Behandlung von Hirntumoren erweisen.<sup>[160]</sup>

### 7.3.2. *Gerichtete Differenzierung von NSCs mit bekannten Modulatoren von Zielstrukturen und Signalwegen*

Entwicklung und Homöostase des Zentralnervensystems werden in vivo durch zahlreiche niedermolekulare Verbindungen beeinflusst. Diese können über Kernrezeptoren oder über eine der verschiedenen Zelloberflächenrezeptor-vermittelten Signalkaskaden (z.B. Schilddrüsenhormone, Reti-

noide, Glucocorticoide, biogene Amine) wirken. Retinsäure ist beispielsweise ein bekanntes Signalmolekül, das an der neuronalen Musterbildung, der neuronalen Differenzierung und dem Aussprossen der Axone beteiligt ist,<sup>[161]</sup> während das Schilddrüsenhormon Oligodendrogenese und Stammzellerhaltung vermittelt.<sup>[162]</sup> Aufgrund der gut gesicherten Rolle, die diese niedermolekularen Verbindungen in der Zellentwicklung spielen, werden viele inzwischen genutzt, um die Differenzierung neuronaler Stamm-, Vorläufer- oder ES-Zellen in vitro zu steuern. Zu diesen gut bekannten Verbindungen werden eine Reihe anderer Substanzen eingesetzt, um die Differenzierung in die verschiedenen Entwicklungslinien und die Zuordnungen in NSCs in vitro und in vivo zu untersuchen (Tabelle 3 c). Ein frühes Beispiel ist der Naturstoff und Agonist des PKA-Signalweges Forskolin (FSK). In vitro fördert FSK die Neurogenese aus NSCs, indem es den intrazellulären cAMP-Spiegel anhebt und damit den Hh-Signalweg durch Hemmung der Gli-abhängigen Transkriptionsaktivierung blockiert.<sup>[59a]</sup> Wenn FSK zusammen mit Retinsäure eingesetzt wird, beobachtet man außerdem eine synergistische Zunahme der Neuronenbildung aus NSCs.<sup>[163]</sup> Danach wurde aufgrund weiterer Untersuchungen vermutet, dass die meisten Antidepressiva und umweltbedingten Interventionen, die Verhaltenseffekte ähnlich wie durch Antidepressiva erzeugen, die adulte Neurogenese im Hippocampus in vivo stimulieren. So wurde durch Behandlung mit Wirkstoffen gegen chronische Depressionen wie Fluoxetin die Neurogenese im Hippocampus angeregt.<sup>[164]</sup> Mit diesen und anderen Untersuchungen wurde eine überzeugende Verbindung zwischen der Regeneration von Neuronen und ihrer Rolle bei der Abmilderung der Symptome der Depression hergestellt.<sup>[20,165]</sup>

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die Veränderung epigenetischer Markierungen eine wichtige Determinante für die Bestimmung der Entwicklungslinie neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen ist.<sup>[166]</sup> Beispielsweise wurde mit HDAC-Inhibitoren die Notwendigkeit der HDAC-Aktivität während eines spezifischen Zeitintervalls der Oligodendrozyten-Differenzierung<sup>[167]</sup> und dem Auswachsen der Zellen<sup>[168]</sup> in vitro und in vivo gezeigt. Gage et al. berichteten, dass die Hemmung der HDAC-Aktivität durch niedermolekulare Inhibitoren die neuronale Differenzierung adulter NSCs auf Kosten der Astrozyten- und Oligodendrozyten-Differenzierung begünstigt. Außerdem differenzieren NSCs, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, sogar unter Bedingungen zu Neuronen, die spezifisch sind für die Differenzierung in die Entwicklungslinien von Astrozyten und Oligodendrozyten.<sup>[169]</sup> Eine Analyse des Mechanismus ergab, dass HDAC-Inhibitoren (d.h. TSA, Butyrat und Valproinsäure, VPA) bekannte neurogene oder gliogene Signalwege weder direkt aktivieren noch hemmen; dies deutet auf einen anderen Wirkmechanismus hin. Allerdings zeigte sich, dass HDAC-Inhibitoren den neurogenen Schlüsseltranskriptionsfaktor NeuroD hochregulieren, was nahelegt, dass die HDAC-Hemmung durch die Induktion neurogener Transkriptionsfaktoren gleichzeitig die neuronale Entwicklungslinie fördert und die gliale Entwicklungslinie hemmt. Ähnlich charakterisierten Schneider und Mitarbeiter ein neurogenes Isoxazol, das die CaMKII (die wichtigste HDAC-Kinase)



aktiviert, wodurch HDAC5 aus dem Kern exportiert wird und neurogene Transkriptionsfaktoren (darunter NeuroD) de-reprimiert werden.<sup>[170]</sup> Diese Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass die Blockade der HDAC-Aktivität eine zentrale Rolle bei der Selektion der neuronalen Entwicklungslinie spielt. Entsprechend zeigten Hsieh et al., dass eine Behandlung mit VPA die Proliferation verminderte und gleichzeitig die neuronale Differenzierung im Gyrus Dentatus adulter Ratten in vivo anregte.<sup>[169]</sup> Hao et al. zeigten auch, dass die HDAC-Hemmung die Neurogenese in vivo anregt.<sup>[171]</sup> Sie vermuten allerdings, dass der Effekt, den VPA auslöst, nicht ausschließlich von der Hemmung der HDAC herrührt. Von VPA ist neben seiner Wirkung auf die HDAC-Aktivität auch bekannt, dass sie GSK-3 $\beta$  hemmt und den MEK/ERK-Signalweg aktiviert. Die selektive Hemmung von GSK-3 $\beta$ , von HDAC oder von beiden erreichte nicht die gleiche neurogene Aktivität wie durch VPA, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung von MEK/ERK in vivo ebenfalls pro-neurogen wirken kann. In einer neueren Untersuchung fanden Fischer et al. weitere Hinweise, dass die Hemmung von HDACs in vivo neurogen ist. Eine Behandlung von Mäusen mit Butyrat induzierte das Aussprossen von Dendriten, erhöhte die Anzahl der Synapsen und reaktivierte das Lernverhalten und den Zugang zu Inhalten des Langzeitgedächtnisses.<sup>[172]</sup> Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die HDAC-vermittelte Genregulation ein wichtiger und bestimmender Faktor für die Fortpflanzung und Aufrechterhaltung der Entwicklungslinien im Gehirn ist und dass die Hemmung der HDAC letztlich als Mittel dienen kann, die regenerativen Mechanismen des Gehirns in vivo zu stimulieren.

Am regenerativen Prozess der Remyelinisierung im ZNS, der auf den Verlust von Neuronen oder die Beschädigung von Axonen folgt, sind Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) beteiligt, aus denen reife Oligodendrozyten entstehen, die die demyelinisierten Axone mit neuem Myelin einhüllen.<sup>[173]</sup> Bei verschiedenen Krankheiten, die mit Demyelinisierung einhergehen, wie multipler Sklerose (MS), ist die neurologische Schädigung mit einem progressiven Versagen des Remyelinisierungsprozesses gekoppelt. Dieses Versagen rührt zumindest zum Teil von einer beobachteten Hemmung der OPC-Differenzierung an Stellen der Demyelinisierungsverletzung und entzündlichen Schädigungen her. Die Mechanismen, die die Hemmung der OPC-Differenzierung lenken, sind noch nicht völlig aufgeklärt, aber wahrscheinlich sind inflammatorische Cytokine, exzitatorische Aminosäuren, Myelinproteine und vielleicht neurotrophe Wachstumsfaktoren beteiligt.<sup>[173]</sup> Niedermolekulare Verbindungen, die in solcher Umgebung die Differenzierung von OPCs zu reifen, myelinbildenden Zelltypen vorantreiben, wären für die Entwicklung einer effizienten Kombinationstherapie für die Behandlung von MS vielversprechend. Daher haben wir und andere Gruppen Screeningansätze auf niedermolekulare Verbindungen durchgeführt, die die Differenzierung von OPCs induzieren und/oder die Myelinisierung verstärken. Buckley et al. durchsuchten eine kleine Sammlung bekannter bioaktiver Verbindungen in vivo mit transgenen *Olig2*-GFP-Zebrafischen auf Moleküle, die die Rekrutierung von Zellen der Oligodendrozyten-Entwicklungslinie beeinflussen und

überprüfen die Effekte der Primärhits auf die Oligodendrozyten-Differenzierung mit qRT-PCR auf das basische Myelinprotein MBP.<sup>[174]</sup> Allerdings beeinflussten alle bestätigten Hits aus dem primären Rekrutierungstest die MBP-Expression negativ. In einem anderen Beispiel identifizierten Joubert et al. Verbindungen, die die OPC-Differenzierung induzieren, mit einem High-Content-Screening mit bildgebender Auswertung einer fokussierten Sammlung biologisch aktiver Moleküle in einer OPC-Zelllinie.<sup>[175]</sup> Zusätzlich zu den Klassen bekannter Induktoren der OPC-Differenzierung, darunter cAMP/PKA-Agonisten (Forskolin, dbcAMP), Kernrezeptor-Liganden (Retinsäure, Glucocorticosteroide) und Nukleosid-Analoga (Ribavirin, Leflunomid) wurden auch die ErbB-Inhibitoren PD174265 und 4557W als neue Regulatoren der OPC-Zellentwicklung identifiziert.

Mit aus dem Sehnerv von Ratten gewonnenen primären OPCs führten wir ein High-Content-Screening mit bildgebender Auswertung gegen eine umfangreiche Sammlung bekannter biologisch aktiver Verbindungen durch. Unter den bestätigten Hits aus diesem Ansatz fanden sich verschiedene Verbindungen aus den oben erwähnten Klassen, daneben aber auch andere Verbindungen (am wichtigsten Rho/ROCK-Kinase-Inhibitoren und Ionenkanalblocker). Dazu passt ein kürzlich erschienener Bericht, wonach der Rock-II-Inhibitor Fasudil (einer der wirksamsten Induktoren der OPC-Differenzierung in unseren Tests) die OPC-Differenzierung in Gegenwart hemmender Myelinproteine vorantreibt.<sup>[176]</sup> Interessanterweise sind mehrere der bekannten Substanzen, die wir in unserem Screening gefunden haben, in der klinischen Entwicklung für die Behandlung von MS (z. B. der  $\beta_2$ -Agonist Levalbuterol).<sup>[177]</sup> Der vorgeschlagene Wirkmechanismus für diese Moleküle wird in ihren immunmodulatorischen Eigenschaften vermutet. Nach unseren Ergebnissen könnte die beobachtete klinische Wirksamkeit solcher Moleküle zumindest teilweise darin bestehen, dass sie den Remyelinisierungsprozess direkt beeinflussen.

### 7.3.3. Identifikation und Charakterisierung neuer Modulatoren der NSC-Differenzierung

Obwohl die gezielte Modulation bekannter Signalwege und des Epigenoms eine Reihe operativer Mechanismen bei NSCs ans Licht gebracht haben, ist man noch immer weit von einem vollständigen Verständnis oder gar der Fähigkeit zur selektiven Kontrolle der NSC-Entwicklung entfernt. So haben wir und andere ungerichtete zellbasierte Screeningansätze entworfen, um neue Mechanismen zu finden, die die Entwicklung von NSCs kontrollieren. Dazu isolierten wir primäre neuronale Vorläuferzellen (NPCs) aus dem adulten Ratten-Hippocampus, plattierten sie als Monoschichten aus, kultivierten sie ohne Mitogen-Stimulation und behandelten sie mit chemischen Bibliotheken.<sup>[178]</sup> Nach vier Tagen wurden die Zellen fixiert und mit einem neuronalen ( $\beta$ III-Tubulin) und einem astroglialen Marker (GFAP) immungefärbt, um Verbindungen zu finden, die die Differenzierung adulter NPCs spezifisch in Richtung Neuronen oder Astrozyten lenken. Ein 2-substituiertes Amino-thiazol (Neuropathiazol) induzierte bis zu 80 % der Zellen zur Differenzierung in  $\beta$ III-Tubulin-positive Neuronen mit charakteristischer neuronaler

Morphologie. Die Neuropathiazol-Behandlung induziert die Expression von NeuroD parallel zu einer Abnahme der Expression von Sox2 (einem Marker für neuronale Vorläuferzellen). Wichtig ist, dass Neuropathiazol im Gegensatz zu Retinsäure die Proliferation und die BMP-induzierte Astrozyten-Differenzierung blockiert.

Eine gezielte Struktur-Wirkungs-Studie lieferte ein Molekül (KHS101), das *in vitro* eine höhere neurogene Aktivität als die vorher publizierte Verbindung<sup>[178]</sup> und eine verbesserte Hirnpenetration hatte. Bei systemischer Gabe an adulte Ratten steigerte dieses Molekül die neuronale Differenzierung.<sup>[179]</sup> Affinitätsbasierte Untersuchungen ergaben, dass KHS101 die Neurogenese durch Wechselwirkung mit dem transformierenden sauren TACC3 (coiled-coil containing protein 3) fördert. Ein Ausschalten von TACC3 verursacht einen Phänotyp mit starker neuronaler Differenzierung in kultivierten NPCs, vergleichbar der Behandlung mit KHS101. Die Behandlung mit KHS101 führte zu einer verstärkten Lokalisation des Nervensystem-spezifischen Transkriptionsfaktors ARNT2 im Kern; die Überexpression von ARNT2 (einem mit TACC3 interagierenden Protein) begünstigte die neuronale Differenzierung gegenüber der Astrozytenbildung deutlich, selbst unter Astrozyten-induzierenden Bedingungen (Behandlung mit BMP). Zusammengefasst weisen diese Befunde darauf hin, dass KHS101 die Neurogenese durch Wechselwirkung mit TACC3 beschleunigt und stützen die Annahme einer funktionalen Verbindung zwischen KHS101 und der TACC3-ARNT2-Achse. Dies geschieht durch eine negative Regulation des Zellzyklus und gleichzeitige Aktivierung eines neuronalen Differenzierungsprogramms in NPCs. Umfangreiche Literaturdaten deuten darauf hin, dass TACC3 eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Vorläuferzellen spielt und dass es zur Differenzierung herunterreguliert wird, obwohl die molekularen Mechanismen stromabwärts von TACC3 noch aufgeklärt werden müssen.<sup>[180]</sup>

In einer ähnlichen Untersuchung identifizierten Saxe et al. eine Reihe von Inhibitoren und Verstärkern der neuronalen Differenzierung aus einer Bibliothek mit bioaktiven Verbindungen.<sup>[181]</sup> Unter diesen befand sich der Ligand Phosphoserin (P-Ser), der die Proliferation und Selbsterneuerung muriner NSCs hemmt, die Entwicklung in Richtung Neuronen verstärkt und das Überleben der Neuronen verbessert. Wichtig ist auch, dass die Aktivität von P-Ser von der Bindung an den metabotropen Glutamaterezeptor 4 der Gruppe III (mGluR4) abhängt, womit die Funktion dieses Rezeptors aufgeklärt ist. Frühere Arbeiten mit einem anderen mGluR4-Verstärker, PHCCC, ließen erwarten, dass der mGluR4-Agonismus einen hemmenden Effekt auf die NSC-Proliferation und einen fördernden Einfluss auf das Auswachsen der Neuriten habe.<sup>[182]</sup> So liefert die Identifizierung von P-Ser eine entwicklungsbiologische Verbindung zwischen einem endogenen Liganden und einem Rezeptor, der bekanntermaßen eine Rolle in der Neurogenese spielt. P-Ser steigert auch die Neurogenese in humanen, von ES-Zellen abgeleiteten neuronalen Vorläuferzellen und zeigt damit einen konvergenten Signalweg der Neurogenese in Menschen und Ratten auf.<sup>[181]</sup>

## 8. Chemische Kontrolle zellulärer Plastizität: Entdifferenzierung und Reprogrammierung

Während der Entwicklung von Säugern werden unspezialisierte Stammzellen durch epigenetische Modifikationen programmiert. Die Spezifizierung der Entwicklungslinie geht allerdings auf Kosten des Entwicklungspotenzials. Ist eine Zelle einmal spezialisiert, verliert sie irreversibel die Fähigkeit, andere Zelltypen des Körpers zu bilden (Abbildung 1). Dies steht im Gegensatz zum regenerativen Potenzial bei anderen Lebewesen außerhalb der Säugergattung. Beispielsweise können die Zellen einer verletzten Salamanderextremität dedifferenzieren; sie bilden ein multipotentes Blastem und regenerieren eine verlorene Gliedmaße vollständig, einschließlich Knochen, Blutgefäße und Nerven.<sup>[183]</sup> Viele der frühen Arbeiten über regenerative Medizin galten der Aufklärung der Mechanismen, die die Dedifferenzierung in Fischen und Amphibien steuern, in der Hoffnung, solche Mechanismen auf Säuger übertragen zu können.<sup>[184]</sup>

Die jüngeren Arbeiten zur zellulären Plastizität bei Säugern befassen sich vornehmlich mit exogenen Maßnahmen zur Ausweitung des Zellentwicklungspotenzials. Im Allgemeinen werden zwei Methoden angewendet: pharmakologische Intervention und/oder genetische Modifikation. Bei letzterer werden Stammzellfaktoren in somatischen Zellen exprimiert,<sup>[102b]</sup> während bei ersterer somatische Zellen von außen durch pharmakologische Störung von Signalwegen und/oder der epigenetischen Architektur dazu gebracht werden, sich wie Stammzellen zu verhalten.<sup>[185]</sup>

Neben der Dedifferenzierung zurück zu einem multipotenten Status gibt es inzwischen eine Reihe von Methoden, um Säugerzellen den ganzen Weg zurück zum pluripotenten Zustand umzuprogrammieren. Dies wurde zuerst an Schafen gezeigt, indem ein differenziertes Genom in eine entkernte Eizelle verpflanzt wurde. Der Prozess wird als Transfer eines somatischen Zellkerns (SCNT, somatic cell-nuclear transfer) oder auch als Klonen bezeichnet.<sup>[186]</sup> Inzwischen wurden auch einfachere und besser durchzuführende Techniken für die Reprogrammierung von Säugerzellen entwickelt, etwa die Fusion zwischen somatischen Zellen und ES-Zellen,<sup>[187]</sup> eine umgebungsinduzierte Reprogrammierung von Keimzellen<sup>[188]</sup> und eine retrovirale Übertragung definierter Transkriptionsfaktor-Cocktails.<sup>[16,189]</sup> Die Entwicklung dieser alternativen Reprogrammierungsverfahren haben rasche Fortschritte auf diesem Feld ermöglicht.

Die Entdeckung zellulärer Plastizität in Säugern eröffnet die Möglichkeit, eigene gesunde, reichlich vorhandene und leicht zugängliche adulte Zellen zu verwenden, um verschiedenartige funktionale Zelltypen zu erzeugen. Solche Zellen könnten dann eingesetzt werden, um geschädigte Gewebe und Organe zu reparieren und gleichzeitig viele der Hindernisse zu umgehen, die mit allogenen Stammzellen bei klinischen Anwendungen verbunden sind. Die Reprogrammierungstechniken ermöglichen auch die Herstellung krankheitsspezifischer zellulärer Modelle, an denen man verschiedene genetische Erkrankungen in einer Gewebekultur untersuchen kann oder nach Wirkstoffen suchen kann, die die Krankheit beeinflussen.<sup>[18]</sup> Daher gibt es erhebliches Interesse daran, diese komplexen Vorgänge zu verstehen und sie

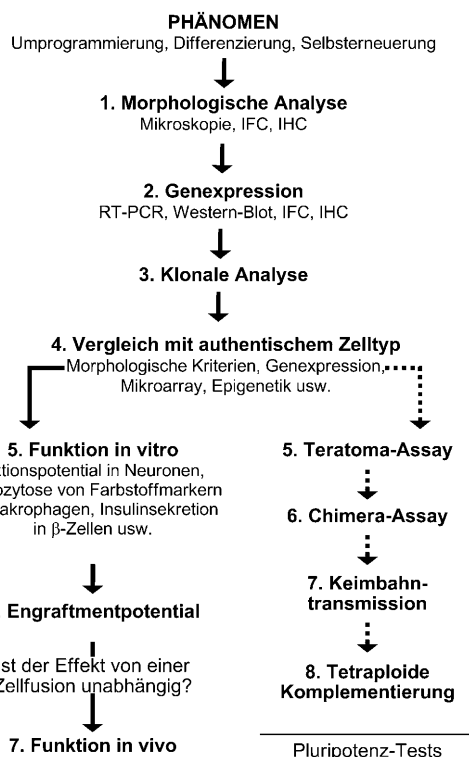
letztlich für regenerative Therapien zu kontrollieren. Im Folgenden diskutieren wir die chemischen Ansätze, mit denen ein Wechsel der Entwicklungslinie gesteuert und eine Reprogrammierung zum pluripotenten Zustand vorgenommen werden kann.

### 8.1. Methoden zur Etablierung zellulärer Plastizität

Mit dem Ausdruck „zelluläre Plastizität“ beschreibt man die Fähigkeit eines Zelltyps, sich in eine andere Zelle außerhalb der eigenen Entwicklungslinie umzuwandeln. Beispiele sind die Dedifferenzierung einer reifen Zelle in einen ursprünglicheren Zustand, die Transdifferenzierung von Keimblättern in einen anderen Typ und die vollständige epigenetische Revision, die während der Reprogrammierung stattfindet. In gleichem Maße, wie wir ein verbessertes Verständnis der epigenetischen Prozesse erlangt haben, die die Spezifikation der Entwicklungslinien bestimmen, stehen uns heute ausgereifte Techniken zur Prüfung von Zellidentitäten zur Verfügung. Wir können nun die Methylierungsmuster der DNA bestimmen, die Modifikationen der Histone charakterisieren und Genexpressionsprofile mit ausgezeichneter Präzision bestimmen. Außerdem haben uns die Fortschritte bei der Zell- und Gewebetransplantation, der Erzeugung von transgenen ES-Zellen und der Verfolgung von Entwicklungslinien stringente Möglichkeiten an die Hand gegeben, um Herkunft und Entwicklungspotenzial einer Zelle zu bestimmen.

Traditionell wurde die Differenzierungskapazität einer Zelle anhand der Expression von Zelloberflächenmarkern und/oder der Morphologie im Verlauf der In-vitro-Differenzierung charakterisiert. Dies ist zwar ein entscheidender erster Schritt für die Erfassung des Entwicklungspotenzials, es ist aber der am wenigsten stringente Test für eine Zelle in Kultur und kann Ursache für In-vitro-Artefakte sein. So kann z. B. das Wachstum und/oder die Differenzierung in vitro eine stressinduzierte Abweichung in der Genexpression verursachen, wenn die Kulturbedingungen suboptimal sind (wenn z. B. ein Fibroblast in serumfreiem Medium oder unter chemischem Stress kultiviert wird).<sup>[190]</sup> Stress kann auch Änderungen am Zytoskelett filamentöser Proteine (z. B. Nestin und GFAP) hervorrufen, die oft als Marker einer bestimmten Entwicklungslinie benutzt werden. Dadurch kann ein Zelltyp einen anderen nachahmen: morphologisch, durch aberrante Genexpression oder indem die Zelle Eigenschaften der ursprünglichen Zellen und der de-/transdifferenzierten Zelle besitzt („Mosaikzellen“). Weitere Irrtümer können durch die Kontamination von multipotenten Zellen in primären Isolaten auftreten. Insgesamt kann jedes dieser Artefakte zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen.<sup>[191]</sup>

Solche Artefakte können allerdings meist vermieden werden, indem man mehrere Zelltyp-spezifische Marker in den de-/transdifferenzierten Zellen analysiert, entweder durch klonale Analyse des Differenzierungspotenzials oder durch Vergleich von Expressionsprofil und Morphologie der entstehenden Zellen mit authentischen Kontrollen (Abbildung 9). Wenn die de-/transdifferenzierten Zellen diesen Kriterien entsprechen, können stringenter Test angewendet



**Abbildung 9.** Flussdiagramm für die Analyse des Entwicklungspotenzials und/oder der Entwicklungsrichtung von Zellen. Strategien, die nur für pluripotente Zellen verwendet werden, sind rechts unter den gestrichelten Pfeilen gezeigt.

werden, etwa eine funktionelle Überprüfung der differenzierten Zellen (z. B. Aktionspotenziale in Neuronen oder Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen). Außerdem kann das Anwachspotenzial nach Transplantation und die Fähigkeit zum normalen Ersatz von Geweben oder Organen getestet werden (obwohl auch von Artefakten in Verbindung mit Zellfusionen berichtet wurde).<sup>[192]</sup>

Ogleich diese Methoden für Zellen jeglichen Entwicklungspotenzials eingesetzt werden können, werden sie am häufigsten verwendet, um Multipotenz oder Identität einer Entwicklungslinie zu zeigen. Zum Nachweis von Pluripotenzt sind zusätzliche Analysen erforderlich (Abbildung 9): 1) Test auf die Bildung von Tumoren, die alle primären Keimblätter repräsentierende Zelltypen exprimieren (Keimzelltumore oder Teratome); 2) Injektion von Zellen in einen sich entwickelnden Blastozysten, wonach der entstehende Organismus aus Wirt- und Donorzellen besteht (Chimäre); 3) Test auf Transmission in die Keimbahn der Folgegenerationen.<sup>[7a]</sup> Der stringenteste aller Tests für das Entwicklungspotenzial ist die Injektion von Zellen in tetraploide Blastozysten; der entstehende Organismus wird dann ausschließlich aus den Donorzellen gebildet (tetraploide Embryo-Komplementation).<sup>[17]</sup>

Im folgenden Abschnitt stellen wir eine Reihe von Verbindungen vor, die das Entwicklungspotenzial von Zellen beeinflussen (Tabelle 4). Für einen umfassenderen Überblick über die Methoden zum Test zellulärer Plastizität einschließlich Fehlerquellen und möglicher Fehlinterpretationen



**Tabelle 4:** Auswahl niedermolekularer Modulatoren der Zellplastizität.

Verbindung	Zielstruktur Funktion
	<b>L-Ascorbinsäure</b> Steigert die Effizienz der direkten Reprogrammierung
	<b>Bay K8644 (BayK)</b> <i>Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom L-Typ</i> Ersetzt BIX zusammen mit Sox2 und c-Myc bei der direkten Reprogrammierung
	<b>Kenpaullone</b> <i>unbekannt</i> Ersetzt Klf4 bei der direkten Reprogrammierung
	<b>RepSox</b> <i>Typ I-Rezeptor (ALKs 4, 5, 7)</i> Ersetzt Sox2 und c-Myc bei der direkten Reprogrammierung
	<b>5-Aza-Cytidin (5-AzaC)</b> <i>DNMTs</i> Steigert die Effizienz der direkten Reprogrammierung
	<b>BIX 01294 (BIX)</b> <i>G9a</i> Ersetzt mit BayK zusammen Sox2 und c-Myc bei der direkten Reprogrammierung
	<b>Myoseverin</b> <i>Mikrotubuli</i> Revertiert terminal differenzierte Myotuben in Myoblasten
	<b>Valproinsäure (VPA)</b> <i>HDACs</i> Steigert die Effizienz der direkten Reprogrammierung $\pm$ c-Myc

verweisen wir auf eine Reihe von Aufsätzen, die unterschiedliche Aspekte dieser Thematik behandeln.<sup>[7a,185,193]</sup>

## 8.2. Dedifferenzierung von Zellen in andere Entwicklungslinien

### 8.2.1. Mäuse-Myoblasten

Bei der Bildung der Skelettmuskeln stoppen die proliferierenden Myoblasten ihre Zellteilung und verschmelzen zu vielkernigen Myotuben. Neue In-vitro-Studien lassen erwarten, dass man terminal differenzierte murine Myotuben durch die ektopische Expression von Msx1<sup>[194]</sup> oder durch Zusatz von Extrakten regenerierender Molch-Gliedmaßen zur Dedifferenzierung in mesenchymale Vorläuferzellen induzieren kann.<sup>[195]</sup> Um niedermolekulare Verbindungen zu finden, die das Zellschicksal terminal differenzierter Myotuben umkehren können, entwickelten wir einen Test, der auf der Deaggregation vielkerniger Myotuben in individuelle Myoblasten beruht. Auf diese Weise identifizierten wir die Verbindung Myoseverin, die die Spaltung vielkerniger Myotuben in myoblastenähnliche Zellen induziert; letztere können proliferieren und erneut Myotuben bilden.<sup>[196]</sup> Durch Affinitätschromatographie von Zellextrakten und die Untersuchung von Zytoskelettproteinen fanden wir, dass Myoseverin an Tubulin bindet und das hochgeordnete Zytoskelett der Mikrotubuli innerhalb der Myotuben desintegriert. Die Trennung der Mikrotubuli induzierte dann die Reversion der terminal differenzierten Myotuben zu ihren Vorläufern, die ihrerseits wieder auf Wachstums- und Differenzierungssignale reagierten. Wenn auch die Effekte von Myoseverin wahrscheinlich von der Remodellierung des Zytoskeletts herrühren und die entstehenden Zellen noch immer unipotent sind, zeigt dieses Experiment dennoch im Prinzip, dass terminal differenzierte Zellstadien durch eine niedermolekulare Substanz verändert werden können.

Um kleine Moleküle zu finden, die die Dedifferenzierung von Myoblasten in multipotente Vorläuferzellen induzieren, wurde ein neues Screening entworfen, bei dem murine C2C12-Myoblasten mit den entsprechenden Verbindungen behandelt und dann unter Osteogenese-induzierenden Bedingungen (die nur mesenchymale Vorläuferzellen beeinflussen) ausplattiert und auf ihre Fähigkeit zur Differenzierung zu Osteoplasten getestet wurden. Wir fanden ein 2,6-disubstituiertes Purin, Reversin, das die terminale Myotubenbildung aus Myoblasten hemmt.<sup>[197]</sup> Stattdessen differenzieren die Reversin-behandelten Myoblasten zu Osteoblasten oder Adipozyten, wenn sie geeigneten Differenzierungsbedingungen ausgesetzt werden (Abbildung 8). Wichtig ist, dass der Dedifferenzierungseffekt mit Reversin eher induktiv als selektiv ist. Das bedeutet: 1) Zellen, die als Einzelzellklone vermehrt und mit Reversin behandelt wurden, zeigen multipotentes Differenzierungspotenzial; 2) eine Transdifferenzierung von Myoblasten direkt in Osteoblasten oder Adipozyten wurde unter den Bedingungen für die Induktion von Osteogenese oder Adipogenese nicht beobachtet; 3) in Abwesenheit von Adipogenese- oder Osteogenese-induzierendem Medium hatte eine fortdauernde Behandlung mit Reversin alleine keine adipogene oder osteogene Wirkung; und 4) bei den verwendeten Reversinkonzentrationen wurde kein signifikantes Absterben von Zellen beobachtet (was bedeutet, dass Reversin nicht einfach dadurch Vorläuferzellen anreichert, dass es selektiv Myoblasten abtötet).

Reversin wurde als Dedifferenzierungsagens in verschiedenen Anwendungsbereichen eingesetzt. So verwendeten Anastasia et al. Reversin, um primäre murine und humane Hautfibroblasten mit hoher Häufigkeit *in vitro* und *in vivo* in Myogen-kompetente Zellen zu transformieren.<sup>[198]</sup> Außerdem konnten die behandelten Fibroblasten unter geeigneten Bedingungen in Osteoblasten umgewandelt werden. Auf ähnliche Weise zeigten Saraiya et al., dass auch knorpelbildende Zellen aus Rattenwirbelsäulen mit Reversin dedifferenziert werden können.<sup>[199]</sup> Behandelte Zellen wurden wieder mit multipotentem mesenchymalem Potenzial ausgestattet und konnten unter für die Abstammungslinie geeigneten Bedingungen in Osteoblasten, Adipozyten oder zurück in Knorpel differenzieren. Allerdings zeigen die dedifferenzierten Zellen ein deutlich erhöhtes Potenzial für die Differenzierung in chondrozytische Zellen. Die dedifferenzierende Aktivität von Reversin greift jedoch nicht bei allen Abstammungslinien. In manchen Zelltypen wirkt Reversin als wirksamer Differenzierungsinduktor. So fördert Reversin die Differenzierung in einer Reihe von Tumorzelllinien.<sup>[200]</sup> In einer anderen Untersuchung fanden Kim et al., dass die Behandlung der 3T3L1-Präadipozytenlinie mit Reversin unter adipogenen Differenzierungsbedingungen eine synergistische Verstärkung der Adipozyten-Differenzierung bewirkt.<sup>[201]</sup>

Nachfolgende Arbeiten unserer Gruppe ergaben, dass Reversin in verschiedenen Zelltypen wirksam ist, etwa in 3T3E1-Osteoblasten (behandelte Zellen zeigten adipogenes Potenzial) und in humanen primären Skelettmyoblasten (behandelte Zellen zeigten osteogenes und adipogenes Potenzial).<sup>[39]</sup> Mit affinitätsbasierten Verfahren identifizierten wir als zelluläre Targets von Reversin die Mitogen-aktivierte, extrazellulär regulierte Kinase (MEK1) und die schwere Kette des nichtmuskulären Myosin II (NMII). cDNA-Überexpression gekoppelt mit siRNA und niedermolekularen Inhibitoren von MEK1 und NMII ergaben, dass die Inhibition beider Targets für die Aktivität von Reversin notwendig ist. Mit einer Reihe von stadienspezifischen Hemmstoffen des Zellzyklus fanden wir heraus, dass die Effekte von Reversin auf den Zellzyklus (Reversin induziert eine Akkumulation von Zellen in der G2M-Phase) auch Folge der Dedifferenzierungsaktivität sein könnten. Cortese und Mitarbeiter hatten zuvor nachgewiesen, dass Reversin die Zellzyklus-regulierenden Aurorakinasen hemmt.<sup>[200b]</sup> Aufgrund dieser Beobachtung verwendeten sie modifizierte Inhibitoren der Aurorakinase (VX-680 und Hesperadin) bei C2C12-Zellen und sahen, dass diese Verbindungen wie Reversin in der Lage sind, die Zellen zurück in den multipotenten Zustand zu dedifferenzieren.<sup>[202]</sup> Wichtig war der Befund, dass C2C12-Zellen, die Kinaseinhibitor-resistente Aurorakinase-B-Mutanten exprimieren, nicht auf die dedifferenzierende Aktivität von Reversin reagierten. Insgesamt stützen diese Ergebnisse ein Modell, demzufolge epigenetische Veränderungen aufgrund der Hemmung der Aurorakinase eine Remodellierung von Chromatin vermitteln, welche ihrerseits den multipotenten Zustand wiederherstellt. Damit nähert sich diese Untersuchung weitgehend dem Mechanismus an, der ursprünglich vorgeschlagen wurde. Durch die Blockade von NMII induziert Reversin die Zellakkumulation in der G2M-Phase des Zellzyklus und moduliert

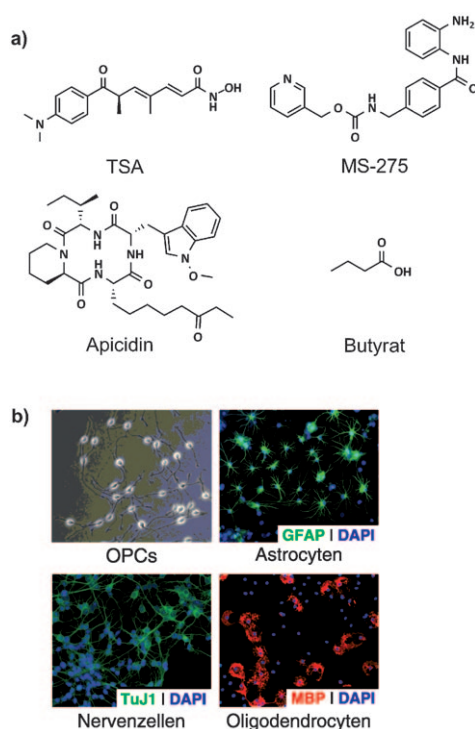
gleichzeitig die Acetylierung von Histon H3, indem es die MEK-abhängigen Signale unterdrückt.<sup>[39]</sup>

### 8.2.2. Vorläuferzellen für Oligodendrozyten

OPCs sind unipotente Vorläuferzellen, aus denen sich Oligodendrozyten entwickeln, also die Zellen, die die Axone einhüllen und die schnelle Signalübertragung im Gehirn ermöglichen. OPCs machen etwa 5–8 % der Gesamtzellen des adulten Gehirns aus und überdauern die Lebensdauer eines erwachsenen Organismus. Sie sind auch stark beweglich und reagieren auf demyelinisierende Verletzungen.<sup>[173]</sup> Daher stellen OPCs eine attraktive endogene Quelle für Zellen dar, die sich zur Reparatur des Zentralnervensystems dedifferenzieren lassen sollten.

OPCs, die aus ihrer Nische entfernt und *in vitro* kultiviert werden, werden bipotent und können sich außer zu Oligodendrozyten auch zu Typ-2-Astrozyten entwickeln.<sup>[162,203]</sup> Sehr interessant ist, dass OPCs nach Inkubation mit BMP2 und Vermehrung in NSC-Wachstumsmedium (mit bFGF) in die neuronale Abstammungslinie wechseln können.<sup>[204]</sup> Die mechanistischen Details, die mit der Plastizität der OPCs verbunden sind, sind noch nicht aufgeklärt. Um diesen Prozess besser zu verstehen, haben wir ein Screening aufgesetzt, um chemische Modulatoren des OPC-Potenzials zu finden. Dazu wurden primäre Ratten-OPCs mit einem Konstrukt Sox2-Promotor/GFP-Reporter transfiziert. Sox2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in einem frühen Stadium der Gehirnentwicklung exprimiert wird und essenziell für die Aufrechterhaltung des multipotenten Zustandes von NSCs ist.<sup>[205]</sup> Außerdem wird Sox2 in NSCs stark exprimiert, nicht aber in Vorläuferzellen wie OPSs,<sup>[204b,206]</sup> die innerhalb ihrer Abstammungslinie bleiben. Daher wurde angenommen, dass eine Erhöhung der Multipotenz von OPCs eine Sox2-Expression benötigt, in Übereinstimmung mit dem schon erwähnten Befund, dass die epigenetische Reaktivierung von Sox2 essenziell für die BMP2-induzierte Umwandlung von OPSc in neuronale Stammzell-ähnliche Zellen ist (NSCLs).<sup>[204b]</sup>

Substanzbibliotheken wurden durchmustert, um Aktivatoren der Sox2-Expression in OPCs zu finden.<sup>[207]</sup> Die Hits wurden in einem Sekundärtest analysiert, um zu bestimmen, ob sie OPCs in einen Neurogenese-kompetenten Zustand dedifferenzieren können. Die vier Verbindungen, die dieses Kriterium erfüllten (Butyrat, TSA, MS-275 und Apicidin; Abbildung 10a), sind alle bekannte HDAC-Inhibitoren. Eine klonale Analyse ergab, dass mit HDAC-Inhibitoren behandelte OPCs ein viel höheres Potenzial für die Neuronenbildung besaßen als die DMSO-behandelten Kontrollen. Die Experimente zeigen, dass die Hemmung der HDAC-Aktivität das Entwicklungspotenzial von OPCs auf die neuronale Abstammungslinie ausweiten kann. Anhand spezifischer Marker für die Abstammungslinien der Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten wiesen wir anschließend nach, dass die dedifferenzierten OPC-Klone tatsächlich multipotent waren (Abbildung 10b). Parallel dazu berichteten Liu et al., dass mit HDAC-Inhibitoren behandelte OPCs erneut multipotent werden und zeigten außerdem, dass sich solche Zellen in Wirtorganismen ansiedeln können und *in vivo* funktionale



**Abbildung 10.** Reprogrammierung von OPCs. a) Klassen von HDAC-Inhibitoren, die OPCs reprogrammieren können (Hydroxaminsäuren, TSA; Benzamide, MS-275; cyclische Tetrapeptide, Apicidin; kurzkettige Fettsäuren, Butyrat). b) Die Hemmung der HDAC-Aktivität ergibt OPCs mit tripotentem Differenzierungspotenzial. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [207]; Copyright 2007, National Academy of Science, USA.

Neurone bilden.<sup>[208]</sup> Bezüglich des Mechanismus fanden wir, dass Sox2 während der OPC-Reprogrammierung epigenetisch reaktiviert wird und dass diese Reaktivierung für die Reprogrammierung der OPCs notwendig ist (gezeigt durch gezielten siRNA-Einsatz), aber nicht hinreichend. Außerdem ergab eine genomweite Transkriptionsprofilierung, dass mit HDACs behandelte OPCs schnell verschiedene molekulare Charakteristika von NSCs annehmen, während gleichzeitig eine große Gruppe von Genen, die für die Oligodendrozyten-Abstammungslinie spezifisch sind, stummgeschaltet wird.

Die Beobachtung, dass die Hemmung der HDAC das Entwicklungspotential expandieren kann, scheint in starkem Widerspruch zu der Tatsache zu stehen, dass HDAC-Inhibitoren routinemäßig als Therapeutika zur Differenzierung ursprünglicher Tumorzellen verwendet werden.<sup>[209]</sup> Breslow, Marks und Mitarbeiter beschrieben die Rolle der HDAC-Hemmung in transformierten Zellen vor mehr als 30 Jahren, als sie dem Befund nachgingen, dass 2 % DMSO einen Wachstumsstopp und terminale Differenzierung von Erythro-Leukämiezellen in Kultur induzieren.<sup>[210]</sup> Klar ist, dass HDACs eine unterschiedliche, kontextabhängige Rolle bei der Spezifikation der neuronalen Entwicklungslinie spielen (siehe auch die Diskussion in Abschnitt 7.3.2): Während bei niedriger HDAC-Aktivität die Neurogenese auf Kosten der Glia-Differenzierung abläuft, kann bei hoher HDAC-Aktivität die terminale Glia-Differenzierung fortschreiten. In

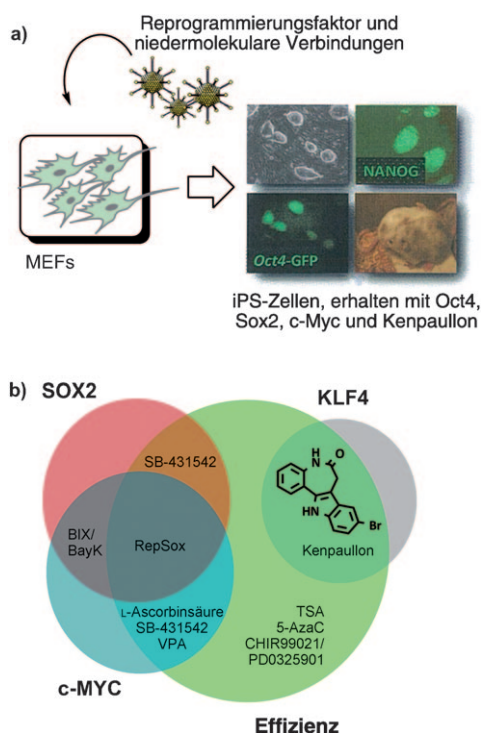
Übereinstimmung damit wurde beobachtet, dass HDAC-Inhibitoren die Neurogenese in NSCs,<sup>[169]</sup> das Auswachsen der Dendriten und die Synapsenbildung im Mäusegehirn<sup>[172]</sup> fördern, andererseits aber die terminale Bildung der Oligodendrozyten<sup>[167]</sup> blockieren und die Myelinierung<sup>[211]</sup> beeinträchtigen. Unsere Studien erweitern das Gesamtbild und zeigen, dass die HDAC-Aktivität nicht nur für die Spezifizierung glialer Entwicklungslinien zuständig ist, sondern auch für die Aufrechterhaltung der OPS-Linie. Dabei kann die globale Histonacetylierung, die durch die HDAC-Inhibition induziert wird, die Abstammungslinie der OPCs durchbrechen, sodass auch die neuronale Abstammungslinie in das Differenzierungspotenzial einbezogen wird (Abbildung 10b).<sup>[207,208]</sup>

### 8.3. Reprogrammierung zum pluripotenten Zustand

Der Nachweis somatischer Zellkerne in Säugern hat die Möglichkeit aufgezeigt, Zellbanken patientenspezifischer nt-ES-Zelllinien (nt: Kerntransfer, nuclear transfer) als Quelle von Zellen, Geweben und Organen zu generieren, die zum Ersatz alters- oder krankheitsbedingter Verluste dienen können.<sup>[212]</sup> SCNTs wurden allerdings noch nicht mit humanen Zellen reproduziert, vor allem weil humane Oozyten schwer zu gewinnen sind. Dieser Nachteil hat die Entwicklung anderer Techniken angeregt, um adulte Zellen in den pluripotenten Zustand zu reprogrammieren.<sup>[16,187–189,213]</sup> Von diesen Techniken hat die direkte Reprogrammierung somatischer Zellen mit Transkriptionsfaktor-Cocktails neuerliches Interesse für den Aufbau patientenspezifischer pluripotenter Zellbanken gefunden, weil damit zum einen soziopolitische Fragen rund um die Verwendung humaner ES- und nt-ES-Zellen umgangen werden und man zum anderen eine verlässliche Methode für mechanistische Untersuchungen dieses Vorgangs erhält. Des Weiteren können krankheitsspezifische pluripotente humane Zelllinien für Untersuchungen von Krankheitsentwicklung und -fortschritt leicht durch Reprogrammierung erzeugt werden.<sup>[18]</sup>

Die direkte Reprogrammierung somatischer Zellen zur Pluripotenz wurde 2006 von Takahashi und Yamanaka demonstriert, die adulte Mäusefibroblasten in iPS-Zellen umwandelten, indem sie die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc überexprimierten (Abbildung 11 a).<sup>[16b]</sup> In der kurzen Zeit seit der Veröffentlichung haben viele Arbeitsgruppen dieses Protokoll auf etliche andere Säugerarten übertragen, vor allem auch auf den Menschen.<sup>[16a,189,214]</sup> Trotz des enormen Anwendungspotenzials der iPS-Zellen gibt es aber verschiedene Einschränkungen dieses Prozesses, die ihren Einsatz in klinischen Anwendungen verhindern. Vor allem die virenvermittelte Übertragung der Reprogrammierungsfaktoren bringt nichtakzeptable Risiken einer permanenten transgenen Integration in das Genom mit sich. Die daraus resultierenden Genveränderungen haben das Potenzial, Transformationsereignisse in den abgeleiteten Zellpopulationen auszulösen.<sup>[215]</sup> Außerdem hat jeder der primären Reprogrammierungsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc) eine potenzielle onkogene Aktivität in spezifischen zellulären Kontexten.<sup>[216]</sup> Die direkte Reprogrammierung ist außerdem ein langsamer und ineffizienter Prozess (0.001–3 % der Zellen





**Abbildung 11.** Reprogrammierung muriner Fibroblasten. a) Die ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und c-Myc zusammen mit Kenpaulon kann MEFs zu iPS-Zellen reprogrammieren. Mit Kenpaulon induzierte iPS-Zellen weisen Merkmale pluripotenter ES-Zellen auf, darunter festgefügte Kolonien und die Expression von ES-Zellmarkern endogener Loci (wie Oct4 und Nanog), und sie vermögen zur Entwicklung von Mäusen beizutragen, wenn sie in Mausembryos injiziert werden (Chimären). Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [233]; Copyright 2009, National Academy of Science, USA. b) Niedermolekulare Verbindungen, die die Effizienz der direkten Reprogrammierung steigern (grüner Kreis) oder den Zusatz der genannten Transkriptionsfaktoren für die direkte Reprogrammierung muriner Fibroblasten zu iPS-Zellen überflüssig machen. Verbindungen, die Sox2, Klf4 und/oder c-Myc ersetzen, sind in dem roten, grauen bzw. blauen Kreis aufgeführt. Ausgewählte chemische Strukturen sind in Tabelle 1 und 4 zusammengestellt.

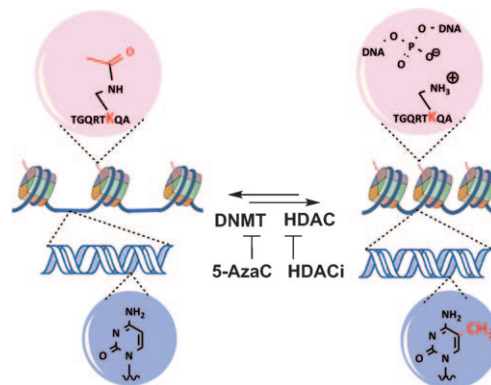
werden reprogrammiert), was die mechanistische Analyse der zugrunde liegenden Biologie erschwert.<sup>[7a,217]</sup>

Etliche Verbesserungen des Originalprotokolls haben jedoch auch zu wichtigen Fortschritten geführt. Beispielsweise wurde die Zahl der für die Reprogrammierung benötigten Faktoren auf drei verringert (Oct8, Sox2 und Klf4; ohne c-Myc).<sup>[217]</sup> Andere Strategien, um Reprogrammierungsfaktoren einzusparen, machten sich die endogene Expression von Transkriptionsfaktoren in bestimmten Zelltypen zunutze, da diese dann nicht (wie Sox2) ektopisch exprimiert werden müssen.<sup>[50,218]</sup> Später wurden iPS-Zellen auch mithilfe exidierbarer Vektoren,<sup>[219]</sup> nicht-integrierender Vektoren<sup>[220]</sup> und durch transiente Transfektion<sup>[221]</sup> erzeugt. Das klinische Potenzial von iPS-Zellen wurde durch neuere Arbeiten erweitert, die zeigten, dass humane periphere Blutzellen reprogrammiert werden können, wodurch Gewebebiopsien überflüssig werden könnten.<sup>[222]</sup> Obwohl diese Methoden einige der Einschränkungen infolge der Gendisruption und Gegenwart von Proviren im Genom von iPS-Zellen gelöst

haben, bleiben sie entweder ineffizient oder ermöglichen wenig Einblick in die mechanistischen Details der epigenomischen Reprogrammierung. Niedermolekulare Verbindungen bieten eine wirkungsvolle Alternative zu genetischen Reprogrammierungsverfahren. Insbesondere scheint es, dass niedermolekulare Verbindungen anstelle oder in Kombination mit genetisch übermittelten Transkriptionsfaktoren Zellen reprogrammieren können (Tabelle 4).

### 8.3.1. Direkte Reprogrammierung mit bekannten Modulatoren von Zielstrukturen und Signalwegen

Die Forschungsergebnisse zur Klonierung von Säugetieren deuten darauf hin, dass die Reorganisation der Chromatinarchitektur ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt während der Reprogrammierung eines somatischen Genoms ist.<sup>[223]</sup> Damit übereinstimmend ist, dass niedermolekulare Verbindungen, die die Chromatinstruktur beeinflussen (also DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und/oder HDAC-Inhibitoren; Abbildung 12), die Effizienz von SCNTs verbessern.<sup>[224]</sup> Die Entfernung epigenetischer Markierungen ist ebenfalls eine Barriere in der direkten Reprogrammierung. Behandelt man z. B. MEFs mit 5-AzaC, einem niedermolekularen Inhibitor der DNA-Methyltransferase, erleichtert dies die 4-Faktor-Reprogrammierung während eines kurzen Zeitfensters, in dem die Methylierungen entfernt sind.<sup>[225]</sup> HDAC-Inhibitoren und Histonmethyltransferase-Inhibitoren erhöhen ebenfalls die Effizienz der Reprogrammierung (Abbildung 11 b).<sup>[226]</sup> Insbesondere der HDAC-Inhibitor VPA steigert die Effizienz der 3-Faktor-Reprogrammierung (ohne c-Myc) drastisch in murinen und humanen Zellen und ermöglicht eine 2-Faktor-Reprogrammierung von humanen Fibroblasten (mit Oct4 und Sox2; ohne Klf4 und c-Myc).<sup>[226a,b]</sup>



**Abbildung 12.** Epigenetische Modifikationen. Links: offene Chromatinstruktur, die eine aktive Genexpression ermöglicht. Rechts: geschlossene Chromatinstruktur, in der die Genexpression reprimiert ist. Histon-Acetyltransferasen (HATs) öffnen die Chromatinstruktur, indem sie Acetylgruppen auf Lysinreste der Histonproteine übertragen. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) kondensieren die Chromatinstruktur, indem sie die DNA methylieren und die Histonproteine deacetylieren. Niedermolekulare Inhibitoren (HDACi und DNMTi) können in diese Prozesse eingreifen und damit die Chromatinkondensation und die Genstummenschaltung verhindern. Chemische Strukturen epigenetisch modifizierender Moleküle sind in Abbildung 10 (HDACi) und Tabelle 4 (HDACi und DNMTi) abgebildet.

Molekular definierte Bedingungen, die Maus-ES-Zellen im pluripotenten Zustand halten,<sup>[49]</sup> haben ebenfalls einen starken Einfluss auf die Reprogrammierungseffizienz.<sup>[50]</sup> Speziell MEK/ERK- und GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren (PD0325901 bzw. CHIR99021) reduzieren den Zeitbedarf für die Reprogrammierung von MEFs und neuronalen Vorläuferzellen und erhöhen den Anteil an Zellen, die in iPS-Zellen übergehen (Abbildung 11 b). Diese Inhibitoren machen auch Sox2 und c-Myc bei der Reprogrammierung neuronaler Vorläuferzellen überflüssig. In neueren Studien wurde auch gezeigt, dass Zellalterung (sowohl spontan als auch Virus- oder Onkogen-induziert) ein Haupthindernis ist und hauptsächlich zu geringen Reprogrammierungseffizienzen beiträgt.<sup>[227]</sup> Teilweise beruht dies auf der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies.<sup>[228]</sup> Aufbauend auf diesem Befund fanden Esteban et al. heraus, dass L-Ascorbinsäure (Vitamin C) die Reprogrammierungseffizienz bei humanen und murinen Fibroblasten, die mit Oct4, Sox2 und Klf4 transduziert wurden, drastisch steigert (Abbildung 11 b).<sup>[229]</sup> Auffällig ist allerdings, dass diese Aktivität mit anderen Antioxidantien nicht wiederholt werden konnte, was nahelegt, dass die Aktivität von L-Ascorbinsäure unabhängig von seinen antioxidativen Eigenschaften ist.

### 8.3.2. Identifizierung und Charakterisierung neuer Modulatoren der direkten Reprogrammierung

Die Identifizierung neuer niedermolekularer Verbindungen, die Pluripotenz induzieren, sollte nützliche chemische Werkzeuge liefern, um die molekularen Mechanismen dieses Prozesses aufzuklären und zu untersuchen. Zu diesem Zweck haben wir und andere ungerichtete Hochdurchsatz-Screenings entwickelt, um Verbindungen zu suchen, die die reprogrammierenden Transkriptionsfaktoren funktional ersetzen können. Die Induktion von Pluripotenz in Fibroblasten durch die ektopische Expression von Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc erfordert mindestens 8–12 Tage und läuft mit niedrigerer Häufigkeit ab.<sup>[230]</sup> Die langsame Kinetik und die Ineffizienz der Reprogrammierung behindern die Entwicklung robuster Testsysteme, um große chemische Bibliotheken mit einem verlässlichen Messverfahren zu durchmustern, die in einem Mikrotiterplattenformat miniaturisiert ablaufen können. Um diese Beschränkungen zu überwinden, stützten wir uns auf die hohe Ansprechempfindlichkeit und die quantitative Auswertbarkeit der Luciferase; das Luciferase-Gen des Glühwürmchens wurde durch homologe Rekombination in den *Nanog*-Lokus von Maus-ES-Zellen inseriert. *Nanog* wurde ausgewählt, weil es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes spielt<sup>[231]</sup> und in somatischen Zellen vollständig inaktiviert ist. iPS-Zellen, die zur *Nanog*-Reaktivierung ausgewählt wurden, zeigen ein vollständiges Entwicklungspotenzial.<sup>[215,232]</sup> Aus der Knock-in-ES-Zelllinie wurde ein muriner *Nanog*-Luciferase(NL)-Stamm gezüchtet, von dem ein therapeutisch relevanter Zelltyp, die Hautfibroblasten, in großer Menge für ein Screening isoliert werden konnte.

Zunächst setzten wir dieses Screening zur Identifizierung nach Verbindungen ein, die Klf4 ersetzen können.<sup>[233]</sup> NL-MEFs wurden mit drei der Reprogrammierungsfaktoren

(Oct4, Sox2 und c-Myc) transduziert und gegen eine große, chemisch diverse Bibliothek niedermolekularer Verbindungen gescreent.<sup>[234]</sup> Hierbei wurde ein Molekül gefunden, Kenpaullon, das die Bildung von iPS-Zellkolonien erleichtert, die von ES-Zellen nach morphologischen Kriterien nicht zu unterscheiden waren und die pluripotenzassoziierte Marker von endogenen Loci exprimierten (Abbildung 11 a). Außerdem waren iPS-Zellen, die mit Kenpaullon erzeugt wurden, Keimbahn-kompetent. Kenpaullon ist ein submikromolarer Inhibitor von GSK-3 $\beta$ , CDK1/Cyclin B, CDK2/Cyclin A und CDK5/p35 und zeigt bei höheren Konzentrationen inhibitorische Aktivität gegenüber verschiedenen anderen Kinasen.<sup>[235]</sup> Die bekannten Inhibitoren dieser Kinasen waren allerdings nicht in der Lage, die Aktivität von Kenpaullon in NL- oder Kolonie-bildenden Testsystemen zu reproduzieren. Ähnlich zeigten Hanna et al. kürzlich, dass Maus-EpiSCs mit Kenpaullon zum Embryoblasten-ähnlichen Zustand reprogrammiert werden können und dass diese Aktivität mit spezifischen Hemmstoffen für GSK 3 $\beta$  nicht wiederholt werden konnte.<sup>[236]</sup> Insgesamt lassen diese Daten vermuten, dass die Aktivität von Kenpaullon nicht von seiner gut dokumentierten Aktivität als GSK-3 $\beta$ - oder Zellzyklus-Hemmstoff herrührt, sondern auf einem bislang noch unbekannten Mechanismus beruht. Inzwischen konnte nach Anwendung dieser Screeningplattform auf Oct4-, Klf4- und c-Myc-transduzierte NL-MEFs auch ein chemisches Komplement für Sox2 gefunden werden.<sup>[237]</sup>

Die Arbeitsgruppen um Eggen und Rubin entwickelten ebenfalls Screening-Ansätze, mit denen niedermolekulare Verbindungen als Ersatz für Sox2 gesucht wurden. Sie transduzierten *oct4*-GFP-Knock-in-MEFs mit Oct4, Klf4 und c-Myc (OKM), behandelten die Zellen mit einer Bibliothek aus 800 bekannten pharmakologischen Verbindungen und testeten auf Verbindungen, die Sox2 ersetzen; Auswertungsgrundlage war die ES-Zell-Morphologie und das Wiedererscheinen der *Oct4*-GFP-Expression. Es wurden drei Verbindungen identifiziert, die die Wirkung von Sox2 ersetzen konnten.<sup>[67a]</sup> Darunter waren zwei Inhibitoren des Rezeptors 1 für den transformierenden Wachstumsfaktor (TGFB $\beta$ 1; E-616452 und E-616452) und ein Inhibitor der Familie der Src-Kinasen (EI-275). Die Autoren zeigten, dass E-616452 (auch als RepSox bezeichnet) die Funktion von Sox2 oder von Sox2 und c-Myc gleichzeitig übernehmen kann (Abbildung 11 b). Mit RepSox behandelte und mit drei oder zwei Faktoren (OKM oder Oct4 und Klf4) transduzierte iPS-Zellen aus Mäusefibroblasten waren pluripotent. Des Weiteren wurde mithilfe anderer bekannter chemischer Inhibitoren des TGF $\beta$ -Signalweges sowie mit TGF $\beta$ -neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen, dass die Hemmung des TGF $\beta$ -Signalweges der operative Mechanismus für RepSox ist.

RepSox hat sich als sehr nützliches Werkzeug zur Untersuchung der direkten Reprogrammierung erwiesen, und seine Anwendung lässt verschiedene Vorteile niedermolekularer Verbindungen bei der mechanistischen Analyse dieses Vorgangs deutlich werden. Beispielsweise wirkt RepSox in einem definierten Zeitfenster. Die Anwendung von RepSox in einem beliebigen 24-stündigen Zeitfenster an den Tagen 7 bis 12 nach viraler OKM-Transduktion kann Sox2 funktionell ersetzen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es gelingen könnte,

Moleküle zu finden, die synergistisch in verschiedenen Stadien des Reprogrammierungsprozesses wirken.

Weiterhin erreicht RepSox beim Ersatz von Sox2 oder c-Myc eine Effizienz, die mit der der viralen Transduktion jedes der Faktoren vergleichbar ist. Dies zeigt, dass die Funktionsweise des chemischen Ersatzes mit den Reprogrammierungsfaktoren nicht perfekt übereinstimmen muss. Auch RepSox (wie Kenpaullon)<sup>[233]</sup> wirkt nicht, indem es die Transkription des zu ersetzenden Reprogrammierungsfaktors direkt aktiviert. Vielmehr fanden Ichida et al. überzeugende Hinweise, dass die pluripotenzinduzierende Funktion von RepSox durch die Aktivierung der Nanog-Genexpression vermittelt wird, wobei Nanog funktional RepSox oder Sox2 ersetzen kann.

Maherali und Hochedlinger fanden, dass die Unterbrechung des TGF $\beta$ -Signalweges die Reprogrammierungseffizienz erhöht und dass die Anwendung eines chemischen Inhibitors des TGF $\beta$ -Signalweges die Verwendung von exogenem Sox2 oder c-Myc vermeiden kann.<sup>[67b]</sup> Abweichend von den Untersuchungen von Ichida et al. wird hier allerdings vermutet, dass die Hemmung des TGF $\beta$ -Signals die Reprogrammierung von murinen Fibroblasten begünstigt, indem gerade in der Initiationsphase eine schnellere und effizientere Reprogrammierung ermöglicht wird. Vor allem fanden die Autoren heraus, dass die Effizienz der 4-Faktor-Reprogrammierung drastisch (> 10fach) durch die Hemmung von TGF $\beta$  mit SB-431542 gesteigert wird und dass der Inhibitor Sox2 am wirksamsten ersetzt, wenn er in den Tagen 0–3 nach der OKM-Transduktion zugegeben wird (Abbildung 11b). Trotz dieser geringfügigen Diskrepanzen zeigen die Ergebnisse der beiden Untersuchungsreihen, dass es prinzipiell gelingt, reprogrammierende Transgene durch niedermolekulare Verbindungen zu ersetzen, die einzelne zelluläre Wege (oder Prozesse) modulieren anstatt global die Chromatinstruktur zu verändern.

Für eine therapeutischen Anwendung pluripotenter humaner Zellen verbleiben allerdings noch beträchtliche Herausforderungen. So wurde der überwiegende Teil der oben beschriebenen Arbeiten an Mauszellen durchgeführt. Während sich einige der Befunde zwanglos auf den Menschen übertragen lassen,<sup>[226a,229]</sup> gelingt dies bei anderen nicht,<sup>[67a,226b,233]</sup> was zum Teil auf einzigartige Aspekte von Pluripotenz und Reprogrammierung bei humanen Zellen zurückgeht. Vor allem dauert die Reprogrammierung bei humanen Zellen länger (ca. 4 Wochen) und ist ineffizienter als bei der Maus (ca. 0.01%). Eine Verbesserung gelingt durch die Verwendung eines chemischen Cocktails aus Hemmstoffen der TGF $\beta$ - und MEK/ERK-Signalwege, der die Reprogrammierungseffizienz auf das etwa 200fache steigert und die benötigte Zeit halbiert.<sup>[238]</sup> Obwohl dies eine signifikante Verbesserung gegenüber früheren Verfahren bietet, stellt es uns auch vor ein interessantes Dilemma: TGF $\beta$ - und FGF-Signalwege spielen eine tragende Rolle bei der Erhaltung des pluripotenten Zustandes humaner Zellen,<sup>[13]</sup> weshalb Dauer und Zeitpunkt der chemischen Behandlung sorgfältig kontrolliert werden müssen, um die Reprogrammierungsaktivität dieser Verbindungen zu maximieren, während ihre differenzierungsinduzierenden Effekte auf neu entstehende pluripotente Zellen zu minimieren sind.

Ein anderes Problem, das die Anwendung humaner pluripotenter Zellen (d. h. ES und/oder iPS-Zellen) einschränkt, ist der Mangel an Techniken für die Langzeitkultivierung bei stabilem Karyotyp und von robusten Methoden, um ihre Differenzierung hin zu spezifischen Entwicklungslinien zu lenken. Fortschritte in dieser Hinsicht sind in den Abschnitten 6.2 und 6.3 für humane ES-Zellen beschrieben, und viele dieser Methoden werden gegenwärtig auch bei humanen iPS-Zellen angewendet. In einem bemerkenswerten Beispiel konnten Studer et al. zeigen, dass neuronale Abstammungslinien effizient in hoher Reinheit aus humanen iPS-Zellen differenziert werden können, wenn die TGF $\beta$ - und BMP-Signalwege (mit SB421532 und Noggin) gehemmt werden.<sup>[83]</sup>

## 9. Funktionale Proliferation reifer Zellen

Lange Zeit nahm man an, dass terminal differenzierte, post-mitotische Säugerzellen nur wenig oder kein regeneratives Potenzial mehr besitzen, da sie den Zellzyklus verlassen und bereits ihre finale spezialisierte Form und Funktion angenommen haben. Wenn es irgendwie gelänge, dieses verlorene regenerative Potenzial wiederherzustellen (d. h. die Fähigkeit zur Zellteilung und zum Ersatz von verletztem oder verlorenem Gewebe), so könnten sich Möglichkeiten zur Behandlung von Herzerkrankungen (Kardiomyozyten), Leberzirrhose (Hepatozyten), Diabetes mellitus, Typ 1 (pankreatische  $\beta$ -Zellen), multiple Sklerose (Oligodendrozyten) und ähnliche Krankheiten aufbauen. Ermutigend ist hierbei, dass es Fälle gibt, in denen Organe verlorenes Gewebe ohne Beteiligung von Stammzellen ausgleichen können. Die Zellen fast aller fötaler Organe besitzen regeneratives Potenzial in verschiedenem Ausmaß,<sup>[239]</sup> und auch manche adulte Zellen können (unter nichtpathologischen Bedingungen) noch proliferieren. Zum Beispiel vermögen sich Zellen der gesunden adulten Leber zu teilen, um beschädigtes Gewebe zu ersetzen,<sup>[240]</sup> und  $\beta$ -Zellen des Pankreas können während der Schwangerschaft expandieren, um spezielle Anforderungen an den Stoffwechsel auszugleichen.<sup>[241]</sup> Die Entwicklung von Methoden, die dieses proliferative Potenzial nutzen oder adulte Zellen reversibel zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimulieren, könnte neue therapeutische Ansätze bieten, die ohne den Einsatz von Stammzellen auskommen.

### 9.1. Target- und Signalweg-basierte Ansätze zur Proliferation von Kardiomyozyten

Herzischämie zeigt sich in einem fortschreitenden Verlust von Kardiomyozyten und ist eine der Haupttodesursachen in der industrialisierten Welt.<sup>[149b,242]</sup> Kardiomyozyten sind in ihrer Teilungsfähigkeit stark eingeschränkt, und infolgedessen ist die erste Reaktion des Säugerherzens auf eine Verletzung Narbenbildung, die eine Reparatur verhindert. Somit ruft der Verlust von Kardiomyozyten nach einer Schädigung, z. B. durch einen Herzinfarkt, im Allgemeinen eine kompensatorische Reaktion hervor, die nicht geeignet ist, die Funktion wiederherzustellen. Die Identifikation niedermolekularer Verbindungen, die die Proliferation von Kardio-



myozyten fördern, könnte daher neue Verfahren zur Behandlung von Herzerkrankungen bieten.

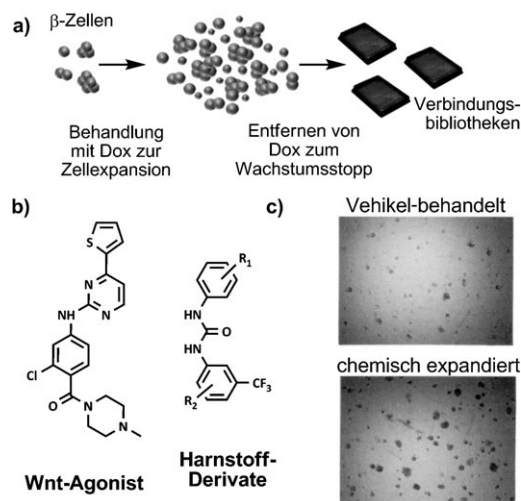
Aktuell konnte gezeigt werden, dass der p38-MAPK-Signalweg die Proliferation von Säuger-Kardiomyozyten durch die Regulation von für die Mitose erforderlichen Genen hemmt. Auf diesen Befund hin zeigten Engel et al., dass ein p38-MAPK-Inhibitor (SB203580) die DNA-Synthese und Mitose in neonatalen und adulten Kardiomyozyten erhöht.<sup>[239a]</sup> In einem anderen Fall fanden Keating und Mitarbeiter, dass der GSK-3 $\beta$ -Inhibitor BIO die Proliferation reifer adulter Kardiomyozyten fördert.<sup>[51a]</sup> Entsprechend dieser Funktion als GSK-3 $\beta$ -Inhibitor erhöhte eine Behandlung mit BIO die  $\beta$ -Catenin-Aktivität. Es liegt daher nahe, dass die Zunahme der Proliferationsfähigkeit zumindest teilweise auf die Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges zurückgeht. Zusammen zeigen diese Studien, dass niedermolekulare Verbindungen das proliferative Potenzial terminal differenzierter Zellen wiederherstellen können.

### 9.2. Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen, die die Proliferation von $\beta$ -Zellen einleiten

Diabetes Typ 1 entsteht infolge der Zerstörung der Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas durch Autoantikörper.<sup>[243]</sup> Die Folge ist, dass eine unzureichende Menge an Insulin sezerniert wird, um den normalen Glucosestoffwechsel aufrechtzuhalten. Daher ist die tägliche Zufuhr von exogenem Insulin notwendig, um die Glucose-Homöostase bei Diabetes Typ 1 aufrechtzuerhalten. Allerdings rekapituliert die Insulintherapie nicht die strikte Kontrolle der Blutglucose, wie sie von den endogenen  $\beta$ -Zellen ausgeübt wird, und als Konsequenz hieraus drohen Patienten organbedrohende Schäden. Eine Methode zur Wiederherstellung von funktionalen Inseln durch Regeneration endogener  $\beta$ -Zellen würde einen beträchtlichen Fortschritt gegenüber der konventionellen Insulintherapie bedeuten. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass die Population von  $\beta$ -Zellen dynamisch ist und expandieren kann, um auf spezielle Anforderungen des Stoffwechsels zu reagieren, z.B. während der Schwangerschaft oder bei gestresstem Pankreas (etwa nach einer partiellen Pankreatektomie).<sup>[241,244]</sup> Die selektive Induktion der  $\beta$ -Zell-Regeneration durch externe Stimuli könnte somit einen alternativen Ansatz zu gegenwärtigen Behandlungsmethoden (Insulingabe und/oder Inseltransplantation) darstellen. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass  $\beta$ -Zellen als Reaktion auf Incretine und andere Hormone wie das Glucagon-artige Peptid-1 (GLP-1),<sup>[245]</sup> den GLP-1-Rezeptor-Agonisten Exendin-4<sup>[246]</sup> und den Hepatozyten-Wachstumsfaktor in Tiermodellen expandieren.

Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe und anderer, Moleküle zu identifizieren, die primäre  $\beta$ -Zellen zur Proliferation anregen, erbrachten unbefriedigende Ergebnisse. Gründe hierfür sind unter anderem die begrenzte Verfügbarkeit humaner  $\beta$ -Zellen, Schwierigkeiten bei der Gewinnung großer Zellzahlen aus Nagern und Schwankungen in der Zellproliferation je nach Donor. Um diesbezüglich eine Verbesserung zu erzielen, verwendeten wir eine reversibel immortalisierte murine  $\beta$ -Zelllinie, die homogene funktionale

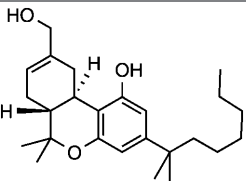
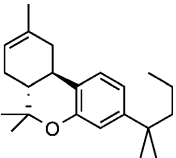
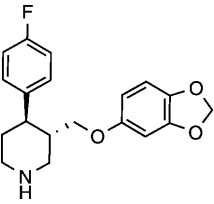
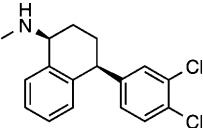
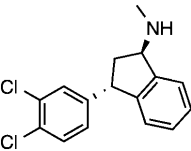
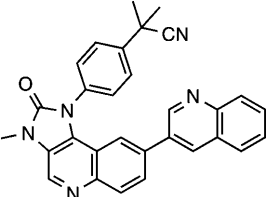
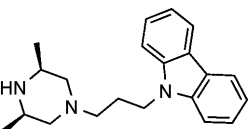
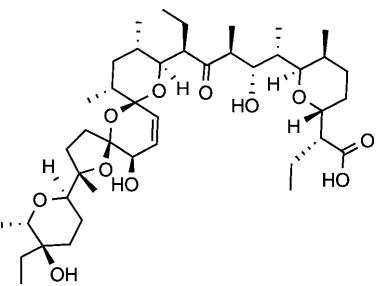
$\beta$ -Zellen in großen Mengen für zellbasiertes Screening verfügbar macht. Die murine  $\beta$ -Zelllinie wurde reversibel immortalisiert, indem das große T-Antigen (TAG) des SV40-Virus unter der Steuerung des Tetracyclin(Tet)-On-Systems eingefügt wurde. Die in der Form genetisch manipulierten  $\beta$ -Zellen proliferierten bei der Induktion von TAG durch Doxycyclin (Dox, ein Tet-Analogon) und arretierten bei Entzug von Tet (Abbildung 13 a).<sup>[247]</sup> Obwohl das System kein



**Abbildung 13.** Expansion von  $\beta$ -Zellen: a) Screeningplattform zur Identifikation von Verbindungen, die  $\beta$ -Zellen zur Proliferation anregen. b) Verbindungen, die  $\beta$ -Zellen expandieren. c) Dissoziierte Inseln der Ratte, die 4 Tage mit den Verbindungen in (b) behandelt wurden, expandieren klonal und behalten den Phänotyp der  $\beta$ -Zellen.

echtes Abbild ruhender  $\beta$ -Zellen in vivo ist, ermöglichte es uns die Identifizierung einfacher niedermolekularer Verbindungen, die die reversible Proliferation von wachstumsblockierten murinen  $\beta$ -Zellen induzieren.<sup>[51c]</sup> Unter diesen Verbindungen befanden sich eine Reihe von GSK-3 $\beta$ -Inhibitoren (Wnt-Agonisten; Abbildung 13b) – was einen aktuellen Befund stützt, demzufolge die Inhibition von GSK-3 $\beta$  die Replikation von Ratten-Inselzellen stimuliert und toxische Effekte infolge hoher Glucose- und Palmitatkonzentrationen mildert<sup>[51b]</sup> – sowie eine Gruppe von Dihydropyridinen, die reversibel die  $\beta$ -Zell-Replikation induzieren, indem sie Calciumkanäle vom L-Typ aktivieren. Ein erweitertes Screening führte zur Identifikation einer neuen Klasse von Diarylharnstoffen (Abbildung 13b), die in murinen  $\beta$ -Zellen wirkungsvoller und effektiver sind als frühere Verbindungen und signifikante proliferative Aktivität in humanen Inselzellen zeigen.<sup>[248]</sup> Darüber hinaus lassen sich die expandierten Inselzellen auf das C-Peptid (einen Marker für  $\beta$ -Zellen) anfärben und reagieren auf Glucose. Ein Analogon mit akzeptabler systemischer Aufnahme zeigte einen schützenden Einfluss in  $\beta$ -Zell-Stresstests in vitro und stellt den normalen Glucosespiegel wieder her, wenn es kurz nach einer STZ-Behandlung in einem Rattenmodell des Typ-1-Diabetes verabreicht wurde. Das Derivat zeigte auch einen reversibel proliferativen Einfluss auf pigmentierte Epithelzellen der Retina (RPEs). Die expandierten Zellen behalten offenbar

**Tabelle 5:** Ausgewählte niedermolekulare Modulatoren für die Entwicklungsrichtung der CSC.

Verbindung	Zielstruktur Funktion
	<b>HU-210</b> <i>CB<sub>1</sub>R</i> und <i>CB<sub>2</sub>R</i> Hemmt das Wachstum von GBM-CSCs
	<b>JWH-133</b> <i>CB<sub>2</sub>R</i> Hemmt das Wachstum von GBM-CSCs
	<b>Paroxetin</b> <i>Monoamin-Transporter</i> Eliminiert selektiv GBM-CSCs
	<b>Sertralin</b> <i>Serotonin-Transporter</i> Eliminiert selektiv GBM-CSCs
	<b>Indatralin</b> <i>Monoamin-Transporter</i> Eliminiert selektiv GBM-CSCs
	<b>NVP-BE235</b> <i>PI3K</i> und <i>mTOR</i> Hemmt das Wachstum von Prostatakrebs-CSCs
	<b>Rimcazol</b> <i>Sigma-Rezeptor</i> und <i>Dopamin-Transporter</i> Eliminiert selektiv GBM-CSCs
	<b>Salinomycin</b> unbekannt Greift selektiv Brustkrebs-CSCs an

ihren RPE-Charakter *in vitro* und *in vivo* bei. Aktuelle und kommende Forschungsbemühungen zielen darauf ab, mithilfe dieser identifizierten Verbindungen Wirkmechanismen aufzuklären und die Aktivitäten im Rattenmodell von Typ-1-

Diabetes und altersbedingter makularer Degeneration weiter zu erforschen. Eine Herausforderung für die In-vivo-Applikation dieser Verbindungen wird sein, eine spezifische Zellpopulation selektiv zur Proliferation anzuregen. Eine erste Anwendung dieser Verbindungen wird wahrscheinlich die Ex-vivo-Expansion von Donorzellen für eine Transplantation sein. Man muss außerdem darauf achten, dass die Aktivität der proliferierenden Moleküle reversibel bleibt und keine onkogene Transformation vermittelt.

## 10. Chemische Kontrolle von Krebsstammzellen

Tumoren bestehen aus einer heterogenen Mischung verschiedener Arten differenzierter und undifferenzierter Zellen. Die Tatsache, dass man Tumorzellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien antrifft (z. B. bei akuter myeloischer Leukämie), spricht für ein hierarchisches Modell.<sup>[4a,b]</sup> An der Spitze der Hierarchie stehen die am wenigsten differenzierten Zellen, die viele Eigenschaften von Stammzellen aufweisen, unter anderem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung. Aus diesem Grund werden diese Zellen für gewöhnlich als Tumorstammzellen (cancer stem cells, CSCs) bezeichnet. Einige der stammzelltypischen Merkmale der CSCs machen sie gegen Therapien resistenter: lange Lebensdauer, relativ viele Zellen im Ruhestadium, Resistenz gegen Wirkstoffe und Toxine durch Expression von Multiwirkstoffresistenztransportern, Fähigkeit zur aktiven DNA-Reparatur, Resistenz gegen Apoptose. Deswegen scheinen manche Tumoren eine Population wirkstoffresistenter multipotenter Zellen aufzuweisen, die eine Chemotherapie überleben können.<sup>[249]</sup> Da die meisten gebräuchlichen Chemotherapiepläne auf nichtselektiven Zytotoxinen beruhen, die schnell teilende Zellen angreifen, ist es denkbar, dass ruhende CSCs eine Behandlung überleben und für Tumorrezidive verantwortlich sind.

Die Hypothese, dass CSCs die tumorerhaltende Population ausmachen, bietet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung therapeutischer Strategien jenseits der konventionellen Verabreichung antiproliferativer Wirkstoffe.<sup>[4a]</sup> Mögliche Ansätze zur Ausrottung von CSCs sind: 1) Hemmung von CSC-spezifischen Überlebensmechanismen, 2) Hemmung der Selbsterneuerung von CSCs und 3) Differenzierung von CSC in Zelltypen, die anfälliger gegen Chemotherapiemaßnahmen sind. Ohne Frage werden ein detailliertes Verständnis der biologischen Eigenschaften von CSCs sowie die Entwicklung von Techniken, die gezielt auf die speziellen Merkmale von CSCs abzielen, spezifische therapeutische Methoden gegen CSCs hervorbringen. Im folgenden Abschnitt diskutieren wir Verbindungen, die zur Kontrolle von CSCs eingesetzt werden (Tabelle 5).

### 10.1. Hemmung von Überlebensmechanismen von CSCs

Ungerichtete zellbasierte Screeningverfahren nach Substanzen, die spezifisch gegen CSCs gerichtet sind, werden durch das seltene Vorkommen dieser Zellen innerhalb von Tumoren und ihre relativ geringe Stabilität in Kultur einge-

schränkt. Zur Lösung ersteren Problems führten Gupta et al. eine Methode ein, mit der sich große Mengen von Brustkrebszellen mit CSC-Merkmalen gewinnen lassen.<sup>[250]</sup> Die Induktion eines epithelial-mesenchymalen Übergangs (EMT) in normalen oder neoplastischen epithelialen Zellpopulationen aus Brustgewebe führt zur Anreicherung von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften.<sup>[251]</sup> Die Autoren induzierten einen EMT in normalen Brustkrebszellen, indem sie die E-Cadherin-Expression mit einer shRNA ausschalteten. Die Zellen wurden anschließend in einem parallelen Hochdurchsatz-Screening einer chemischen Bibliothek gegen Brustepithelzellen und Brust-CSCs verwendet, um Verbindungen aufzuspüren, die selektiv toxisch gegen Brust-CSCs sind. Etwa 10 % der Verbindungen in der Bibliothek verringerten die Lebensfähigkeit der Brust-CSCs. Während die überwiegende Zahl dieser Gruppe (98 %) auch die Lebensfähigkeit der Brustepithelzellen verringerte, erwiesen sich einige Verbindungen – Etoposid, Salinomycin, Nigericin und Abamectin – als selektiv toxisch gegen CSCs (mit einem IC<sub>50</sub>-Wert, der für CSCs 7- bis 10fach niedriger lag als für die Kontrollzellen). Wichtig war, dass diese vier Verbindungen auch bevorzugt Zellen abtöteten, die einen Twist-induzierten EMT durchlaufen haben, was bedeutet, dass ihre Selektivität wohl unabhängig vom Mechanismus der EMT-Induktion ist. Eine In-vivo-Analyse ergab außerdem, dass die Behandlung mit Salinomycin die Fähigkeit der Brust-CSCs zur Metastasenbildung und zum Tumorwachstum minderte. Die Experimente deuten darauf hin, dass Methoden zur spezifischen Abtötung von CSCs mittels Verbindungen, die spezifische Stadien der Tumorzeldifferenzierung angreifen, einen Weg zur Entwicklung von Antitumorthérapien ebnet.

### 10.2. Angriff auf Signalwege der CSC-Selbsterneuerung

Die Fähigkeit, spezifisch an CSCs anzugreifen und gleichzeitig normale Stammzellen zu schonen, ist ein ganz entscheidender Punkt für die Entwicklung und den Erfolg einer entsprechenden therapeutischen Strategie. Hier gilt es insbesondere, unsere Kenntnisse über Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Krebs- und normalen Stammzellen zu verbessern. Eine Eigenschaft, die CSCs und normale Stammzellen gemeinsam haben, ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung.<sup>[252]</sup> Für Signalwege wie PI3K/Akt,<sup>[74]</sup> Wnt/ $\beta$ -Catenin,<sup>[253]</sup> Notch<sup>[254]</sup> und Hh<sup>[255]</sup> wurde festgestellt, dass sie in humanen Tumoren gegenüber normalen Stammzellen verändert waren.<sup>[256]</sup> Mehr und mehr Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Signalwege in normalen Zellen anders ablaufen als in Krebszellen und dass man dieses unterschiedliche Verhalten nutzen kann.

PTEN ist ein Tumorsuppressor und ein Modulator mehrerer wichtiger Signalwege, die in vielen Tumortypen deletiert oder inaktiviert sind.<sup>[257]</sup> Er kontrolliert die Signalgebung über den PI3K-Akt-FoxO-Weg, der verschiedene stromabwärts liegende Ziele (z.B. mTOR) anstößt und löst diverse zelluläre Antworten aus, die an der Proliferation, dem Überleben und dem Wachstum von Zellen beteiligt sind. So konnte vor kurzem nachgewiesen werden, dass der PTEN-PI3K/Akt-Signalweg für die Aufrechterhaltung der CSC-

Selbsterneuerung bei mehreren Krebsarten zuständig ist.<sup>[74,258]</sup> Durch Analyse der Genexpressionsmuster in Prostata-CSCs und der Restmasse des Tumors fanden wir, dass CSCs bevorzugt über den PI3K/Akt-Weg aktiviert werden. Tatsächlich wurde das tumorigene Potenzial der Prostatazellen durch Aktivierung des PI3K-Signalweges (durch Knockdown von PTEN oder FoxO3a) in einem murinen Xenograftmodell spürbar erhöht.<sup>[74]</sup> In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen steht, dass die Hemmung der PI3K-Aktivität durch einen dualen PI3K/mTOR-Hemmstoff (NVP-BeZ235) zu einer Wachstumshemmung von Prostata-CSCs in vitro und in einem Maus-Xenograftmodell führt. Außerdem ist die Kombination von NVP-BeZ235, das gegen Vorläuferpopulationen des Prostata-Tumors gerichtet ist, mit dem Chemotherapeutikum Taxotere, das die Hauptmasse der Tumorzellen angreift, wirksamer bei der Bekämpfung von Prostatakrebs als jedes Mittel für sich. Insgesamt weisen die Daten stark darauf hin, dass der PTEN-PI3K/Akt-Signalweg entscheidend für die Erhaltung der Prostata-CSCs ist und dass ein Angriff auf die PI3K-Signalgebung die Behandlung von Prostatakrebs unterstützt, indem er die Erneuerung der Prostata-CSCs verhindert.

Niedermolekulare Modulatoren wurden auch verwendet, um Unterschiede der Notch-Signalgebung zwischen normalen und Krebsstammzellen aufzudecken. Die Blockade des Notch-Signals mit einem  $\gamma$ -Secretase-Hemmer (GSI-18) unterdrückte das Potenzial von Medulloblastomzellen, in vivo Tumoren zu etablieren, wobei der Verlust der Fähigkeit zur Tumorbildung wahrscheinlich durch die Verarmung an CSCs zustandekommt.<sup>[259]</sup> Tatsächlich waren die Notch-Signale in den CSCs erhöht, was auf einen möglichen Mechanismus für ihre gesteigerte Empfindlichkeit gegen eine Hemmung dieses Signalweges hindeutet. Medulloblastom-CSCs scheinen ohnehin selektiv empfindlich gegen Substanzen zu sein, die den Notch-Signalweg hemmen.

### 10.3. Angriff auf Signalwege der CSC-Differenzierung

#### 10.3.1. Differenzierung von CSCs mit bekannten Modulatoren von Zielstrukturen und Signalwegen

CSCs haben wie normale Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung zu Zellen der Tumormasse. Um also einen bestimmten CSC-Vorrat aufrechtzuerhalten, brauchen die CSCs die Fähigkeit, Tochterzellen mit dem gleichen Entwicklungspotenzial zu bilden. Wenn alle Zellen aus dem CSC-Vorrat differenzieren, wird dieser irgendwann aufgebraucht sein. In der Tat wurde diese Idee – die Induktion der Tumorzeldifferenzierung – bei mehreren Krebsarten erfolgreich umgesetzt. So werden HDAC-Inhibitoren und Vitamin-D-Analoga routinemäßig eingesetzt, um bei verschiedenen Blutkrebsarten, die durch naive Zellen erhalten werden, die Differenzierung zu vermitteln.<sup>[209,260]</sup> Akute promyelozytische Leukämiezellen, die oft ein Fusionsprotein aus dem promyelozytischen Leukämie-Gen und dem Retinsäurerezeptor  $\alpha$  exprimieren,<sup>[261]</sup> können mit Retinsäure schnell differenziert werden.<sup>[262]</sup> Auch die Anwendung des Hh-Antagonisten Cyclopamin in Medulloblastom-Mausmodellen blockiert wirkungsvoll die Proliferation und

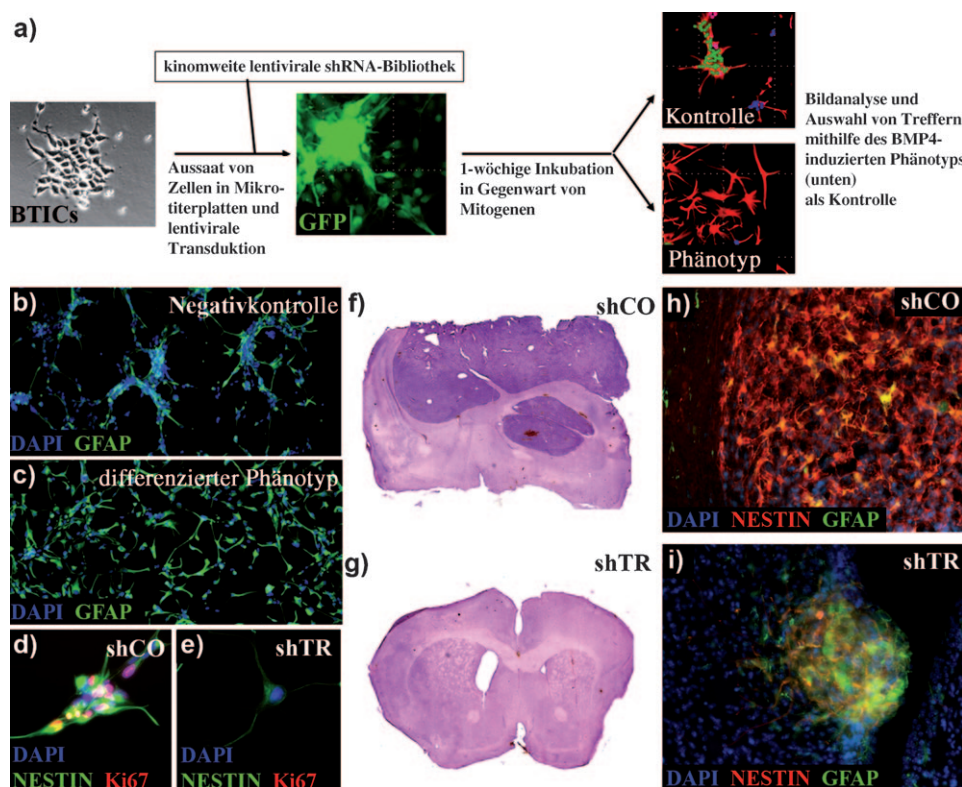


induziert Veränderungen in der Genexpression, die mit der Initiation neuronaler Differenzierung konsistent sind.<sup>[62a]</sup>

Glioblastoma multiforme (GBM), eine sehr aggressive und tödliche Form von Hirnkrebs beim Menschen, kann ebenfalls durch CSCs befördert werden. Ähnlich wie normale NSCs können sich Glioblastom-CSCs selbst erneuern, sind multipotent und haben die Fähigkeit, auf Entwicklungsreize zu reagieren.<sup>[263]</sup> Zum Beispiel können BMPs – die die Differenzierung von adulten NSCs zu Astroglia-Zellen vermitteln<sup>[264]</sup> – auch die Proliferation von GBM-CSCs vermindern und die Differenzierung steigern.<sup>[265]</sup> Die In-vivo-Applikation von BMP4 blockiert Tumorwachstum und Sterblichkeit bei allen Mäusen, denen intrazerebral humane GBM-Zellen eingepflanzt wurden. Die Signalgebung durch Endocannabinoid ist ein anderer Weg, der die Zellproliferation und -differenzierung in normalen NSCs reguliert.<sup>[266]</sup> Unterbricht man diesen Signalweg mit den Cannabinoid-Agonisten HU-210 und JWH-133, erhöht sich die Differenzierung primärer humaner GBM-CSCs zu Gliazellen, was sich anhand der steigenden Zahl von S-100 $\beta$ - und GFAP-exprimierenden Zellen verfolgen lässt.<sup>[267]</sup> Außerdem verringert die Gabe von Cannabinoid die Effizienz, mit der GBM-CSCs eine Gliomabildung in vivo initiieren. Auch der TGF $\beta$ -Signalweg spielt diverse Rollen bei NSCs<sup>[68a]</sup> und wurde in jüngster Zeit von zwei Arbeitsgruppen als ein Faktor identifiziert, der Stammzeileigenschaften in GBM-CSCs vermittelt. Ikushima et al. berichteten, dass die Hemmung des TGF $\beta$ -Signalweges durch SB-431542 die Fähigkeit von GBM-CSCs zur Differenzierung und somit Tumorbildung drastisch verringert. Dazu passt, dass mit SB-431542 behandelte GBM-CSCs bei intrakranialer Transplantation weniger letal waren.<sup>[68b]</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden durch Penuelas et al. beschrieben, die fanden, dass TGF $\beta$  die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in GBM-CSCs verstärkt. Die Autoren vermuten jedoch, dass dies durch die SMAD-abhängige Induktion von LIF und die nachfolgende Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges geschieht.<sup>[68c]</sup>

### 10.3.2. Identifizierung und Charakterisierung neuer Modulatoren der CSC-Differenzierung

Die Identifizierung von CSCs in GBM hat eine Möglichkeit für die Entwicklung von Therapien aufgezeigt, die spezifisch an der krankheitsauslösenden und -tragenden Zellpopulation ansetzen. Man konnte mit solchen Techniken vorläufige Erfolge im Tiermodell erzielen, allerdings beruhen die Ansätze auf der Störung von Signalwegen, die in normalen Stammzellen aktiv sind (z.B. TGF $\beta$ - oder BMP-Signalwege). Aufgrund dieser mangelnden Selektivität für die krankheitsauslösenden Zellen sind toxische Nebenwirkungen zu befürchten. Um dieses Problem anzugehen, entwarfen wir ein ungerichtetes Screening zur Identifizierung neuer Zielstrukturen, die spezifisch die CSC-Funktion beeinträchtigen, nicht aber gesunde Gehirnstammzellen (Abbildung 14a).<sup>[37]</sup> Wie bereits erwähnt, machen CSCs nur einen Bruchteil des Tumors aus. Um genügend Zellen für ein Screening zu erhalten, entwickelten wir Kulturbedingungen, mit denen es gelingt, primäre humane GBM-Tumoren aus GBM-CSCs als adhärenzte Kulturen zu erzeugen. Das Verfahren ergab eine



**Abbildung 14.** TRRAP ist ein Regulator der GBM-CSC-Entwicklung. a) Prinzip der shRNA-basierte Screeningstrategie zur Differenzierung von GBM-CSCs. b,c) Vergleich von unbehandelten (b) und differenzierten GBM-CSCs (c) in 384er Mikrotiterplatten; offenkundige und robuste Unterschiede im Phänotyp sind zu erkennen. d,e) GBM-CSCs, die mit lentiviraler Kontroll-shRNA (shCo) transduziert wurden, bildeten proliferierende Kolonien (d), während GBM-CSCs, die einer Differenzierung unterworfen wurden (z. B. durch Ausschalten des Adapterproteins TRRAP; shTR), einen Zerfall der Kolonien und ein stärkeres immunpositives Signal für GFAP zeigten (e). f) Kontroll-Xenografttumore zeigten starkes Wachstum und waren immunpositiv für den Stammzell-Marker Nestin (h). g) Die Tumorlast in TRRAP-defizienten Läsionen war drastisch reduziert. i) Die Tumoren waren außerdem klein und erschienen stärker differenziert, wie durch einen Nestin-negativen, GFAP-positiven Phänotyp angezeigt wurde. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [37]; Copyright 2010, Elsevier.



Selektion von Mitogen-reaktiven CSCs, die in ausreichender Menge für ein Screening expandiert werden konnten.<sup>[37,263b]</sup> Bei den auf diese Weise gewonnenen Zellen sind die Merkmale fehlender Differenzierung (z.B. Nestin-Expression, hoher Grad an proliferativer Kapazität; Abbildung 14b und d) und die Fähigkeit, auf Entwicklungsreize zu reagieren (z.B. BMP-induzierte Differenzierung zu Astroglia-Zellen; Abbildung 14c), aufrechterhalten. Des Weiteren können sie in Mäusen effizient intrakranielle Xenograft-Tumoren bilden (Abbildung 14f). Wichtig ist, dass diese Tumoren histologisch in hohem Maße die Charakteristika von Hirntumoren menschlicher Patienten aufweisen.<sup>[37]</sup>

Die Zellen wurden mit einer Kinom-gerichteten lentiviralen shRNA-Bibliothek transduziert, um Kinasen zu finden, die die Differenzierung der GBM-CSCs steuern. Diese sollten dann als Zielstruktur für niedermolekulare Inhibitoren dienen. Um das Ausmaß potentieller Screening-Artefakte zu minimieren, wurden mithilfe BMP4-behandelter Positivkontrollen mehrere Parameter festgelegt, um die Differenzierung von GBM-CSCs quantitativ zu fassen; dazu gehören die Gesamtzellzahl (um die potentielle Zytotoxizität zu verfolgen), die Koloniezahl und die durchschnittliche Zellzahl pro Kolonie (GBM-CSCs können Kolonien aus individuellen Zellen bilden, während differenzierten astrozytenähnlichen Krebszellen das Potenzial zur Selbsterneuerung fehlt, sodass sie eher als Einzelzellen vorkommen; Abbildung 14b–e). Interessanterweise waren nur etwa 10% der Hits über mehrere patientenspezifische GBM-CSC-Linien reproduzierbar. Das differenzierte Verhalten ist wahrscheinlich auf die genetische Heterogenität zwischen den CSC-Linien zurückzuführen, und nur diese gemeinsamen Hits wurden weiter charakterisiert. Der markanteste Differenzierungsphänotyp wurde durch Ausschalten des Transkriptions-/Transformationsdomänen-assoziierten Proteins (TRRAP) erzielt (TRRAP ist ein großes Protein mit zahlreichen Domänen und gehört zur Familie der PI3K-verwandten Proteine). Die Ausschaltung von TRRAP unterdrückt drastisch die Fähigkeit zur Tumorbildung bei mehreren verschiedenen GBM-CSC-Linien in vivo (Abbildung 14f–i).<sup>[37]</sup> Die Studie zeigt, dass mit ungerichteten Screening-Ansätzen differenzierungs-basierte CSC-spezifische Tumortargets identifiziert werden können, an denen sich dann die Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe orientieren kann.

In neueren Studien verwendeten wir und andere einen ähnlichen Ansatz zur Suche nach niedermolekularen Substanzen, die entweder selektiv toxisch gegen GBM-CSCs sind oder deren Differenzierung induzieren. Beispielsweise nutzten wir eine differenzierungs-basierte Promotor-Reporter-Strategie zur schnellen Durchmusterung von niedermolekularen Verbindungen in GBM-CSC-Linien. Leitstrukturen, die reproduzierbar das Reporter-Gen aktivierten, wurden wie oben beschrieben mittels Bildauswertung überprüft. Parallel dazu wurden Moleküle, die im Primärscreening toxisch waren, mit primären humanen Astrozyten und von humanen ES-Zellen abgeleiteten NPCs gegengeprüft. Zusammen führten beide Strategien zu einer Reihe neuer Verbindungen, die selektiv GBM-CSCs beeinflussen. Laufende Arbeiten zielen darauf ab, die relevanten biologischen Zielstrukturen

zu identifizieren und ihre Effekte und Selektivität in vitro und in vivo zu untersuchen.<sup>[268]</sup>

Pollard et al. verwendeten ähnliche Strategien zur Erzeugung und Expansion von GBM-CSC-Linien,<sup>[263b]</sup> die anschließend gegen eine Bibliothek aus 450 bekannten Wirkstoffen für verschiedenartigste klinische Indikationen gescreent wurden. Von den 23 Wirkstoffen, die alle GBM-CSC-Linien abtöteten, modulieren sieben den Monoamin-Signalweg. Von diesen zeigten zwei Monoaminaufnahme-Inhibitoren (Indatralin und Paroxetin) keine Wirkung auf Fibroblasten; ein Dopamin-Modulator des Transporter/Sigma-Rezeptors (Rimcazol) und ein Serotonin-spezifischer Wiederaufnahme-Inhibitor (Sertraline) töteten alle Tumorlinien und fötalen NS-Zellen ab, hatten aber keinen Einfluss auf Fibroblasten. Die Ergebnisse dieser Studie erweitern vorhergehende Befunde, die angedeutet hatten, dass Hirn-CSCs akut auf eine Modulation der Monoamin-Signalgebung und insbesondere des Serotonin-Signalwegs reagieren.<sup>[159]</sup>

## 11. Schlussbemerkungen und Ausblick

Zellbasierte Screeningansätze für niedermolekulare Verbindungen werden bereits seit Jahrzehnten für die Wirkstoffsuche und in der Zellbiologie verwendet. Der Wert solcher Ansätze für die Stammzellforschung tritt aber jetzt erst zum Vorschein. Chemische Ansätze werden immer häufiger in der Stammzellbiologie verwendet, weil niedermolekulare Substanzen Eigenschaften haben, die sie besonders geeignet machen, um die komplexen Signalwege zu regulieren, die Selbsterneuerung, Pluripotenz und Differenzierungsstatus steuern. Solche synthetischen Moleküle lassen sich in der Tat leicht einsetzen, um 1) das Schicksal von Stammzellen zu regulieren, 2) auf Abstammungslinien festgelegte Zellen in den multipotenten oder pluripotenten Status zu reversionieren, 3) therapeutisch erwünschte, reife Zelltypen zu expandieren und 4) Tumorchierarchien und die Rolle von Zellen mit Stammzeleigenschaften bei Krebs zu untersuchen. Diese Moleküle ermöglichen neue Einsichten in die komplexen Mechanismen, die das Entwicklungspotenzial bestimmen, und sie haben bereits erste Anwendungen im therapeutischen Kontext gefunden. Die erzielten Erfolge sind dabei in großem Ausmaß einer produktiven Zusammenarbeit zwischen Chemikern und Biologen vor allem in akademischen Arbeitsgruppen und weniger seitens der Pharmaforschung zu verdanken.

Ohne Frage gibt es noch viele aufregende Themen, die es zu verfolgen gilt: Satellitenzellen bei Muskeldystrophien, Kardiomyozyten bei Herzerkrankungen oder gar HSCs für gentechnisch erzeugtes Retortenblut („Blood Pharming“). Auch sind noch zahlreiche Herausforderungen zu bewältigen, z.B. was die Rolle der Fibrose bei der Bestimmung der Zellschicksals betrifft. Klar ist, dass unser Verständnis von Stammzellen und der komplexen Prozesse, die ihre Entwicklung bestimmen, durch die Anwendung chemischer Prinzipien und niedermolekularer Substanzen als Werkzeuge immer weiter vertieft wird. Letztlich wird die Verschmelzung dieser beiden Disziplinen die Einführung regenerativer

Maßnahmen als therapeutische Routineverfahren zur Behandlung vielfältiger Krankheiten beschleunigen.

Wir danken allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, deren Forschung in diesem Aufsatz beschrieben wurde. Diese Arbeit wurde unterstützt durch ein Promotionsstipendium der National Science Foundation (für C.A.L.), durch Postdoc-Stipendien des Canadian Institute for Health (für L.L.L.), der EMBO und AACR (für H.W.) sowie durch Fördermittel des Skaggs Institute of Chemical Biology am Scripps Research Institute (für P.G.S.), des California Institute for Regenerative Medicine (für P.G.S. und A.E.B.) und der Juvenile Diabetes Research Foundation (für P.G.S.). Besonderer Dank gilt Mike Bollong, Brad Charette, Dr. Charles Cho, Dr. Kristen Johnson, Kit Nazor, Dr. Matt Tremblay und Dr. Xu Wu für aufschlussreiche Diskussionen und hilfreiche Anmerkungen.

Eingegangen am 13. Juli 2010

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] C. E. Murry, G. Keller, *Cell* **2008**, 132, 661.
- [2] S. Ding, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 833.
- [3] S. J. Morrison, J. Kimble, *Nature* **2006**, 441, 1068.
- [4] a) B. B. Zhou, H. Zhang, M. Damelin, K. G. Geles, J. C. Grindley, P. B. Dirks, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 806; b) T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman, *Nature* **2001**, 414, 105; c) M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, M. F. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3983; d) D. Bonnet, J. E. Dick, *Nat. Med.* **1997**, 3, 730; e) S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, P. B. Dirks, *Nature* **2004**, 432, 396.
- [5] a) B. E. Bernstein, A. Meissner, E. S. Lander, *Cell* **2007**, 128, 669; b) T. Kouzarides, *Cell* **2007**, 128, 693; c) M. A. Surani, K. Hayashi, P. Hajkova, *Cell* **2007**, 128, 747.
- [6] a) E. Meshorer, T. Misteli, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 540; b) R. Schneider, R. Grosschedl, *Genes Dev.* **2007**, 21, 3027.
- [7] a) R. Jaenisch, R. Young, *Cell* **2008**, 132, 567; b) I. Klimanskaya, N. Rosenthal, R. Lanza, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, 7, 131; c) S. Yamanaka, *Cell Stem Cell* **2007**, 1, 39; d) J. Rossant, *Cell* **2008**, 132, 527.
- [8] M. D. West, R. G. Sargent, J. Long, C. Brown, J. S. Chu, S. Kessler, N. Derugin, J. Sampathkumar, C. Burrows, H. Vaziri, R. Williams, K. B. Chapman, D. Larocca, J. F. Loring, J. Murai, *Regener. Med.* **2008**, 3, 287.
- [9] G. Keller, *Genes Dev.* **2005**, 19, 1129.
- [10] a) M. J. Evans, M. H. Kaufman, *Nature* **1981**, 292, 154; b) G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 7634.
- [11] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, *Science* **1998**, 282, 1145.
- [12] H. Niwa, T. Burdon, I. Chambers, A. Smith, *Genes Dev.* **1998**, 12, 2048.
- [13] a) D. James, A. J. Levine, D. Besser, A. Hemmati-Brivanlou, *Development* **2005**, 132, 1273; b) L. Vallier, M. Alexander, R. A. Pedersen, *J. Cell Sci.* **2005**, 118, 4495.
- [14] P. P. O'Rourke, M. Abelman, K. G. Heffernan, *Cell Stem Cell* **2008**, 2, 307.
- [15] a) P. J. Tesar, J. G. Chenoweth, F. A. Brook, T. J. Davies, E. P. Evans, D. L. Mack, R. L. Gardner, R. D. G. McKay, *Nature* **2007**, 448, 196; b) I. G. M. Brons, L. E. Smithers, M. W. B. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S. M. Chuva de Sousa Lopes, S. K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R. A. Pedersen, L. Vallier, *Nature* **2007**, 448, 191.
- [16] a) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell* **2007**, 131, 861; b) K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, 126, 663.
- [17] M. J. Boland, J. L. Hazen, K. L. Nazor, A. R. Rodriguez, W. Gifford, G. Martin, S. Kupriyanov, K. K. Baldwin, *Nature* **2009**, 461, 91.
- [18] a) I. H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M. W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger, G. Q. Daley, *Cell* **2008**, 134, 877; b) E. Kiskinis, K. Eggan, *J. Clin. Invest.* **2010**, 120, 51.
- [19] I. L. Weissman, *Science* **2000**, 287, 1442.
- [20] C. Zhao, W. Deng, F. H. Gage, *Cell* **2008**, 132, 645.
- [21] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D. R. Marshak, *Science* **1999**, 284, 143.
- [22] A. J. Wagers, I. M. Conboy, *Cell* **2005**, 122, 659.
- [23] R. Pardal, M. F. Clarke, S. J. Morrison, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 895.
- [24] A. Sachinidis, I. Sotiriadou, B. Seelig, A. Berkessel, J. Hescheler, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2008**, 11, 70.
- [25] a) N. Thorne, D. S. Auld, J. Inglese, *Curr Opin Chem. Biol.* **2010**, 14, 315; b) S. Zhu, H. Wurdak, P. G. Schultz, *Future Med. Chem.* **2010**, 2, 965.
- [26] a) P. J. Bushway, M. Mercola, *Methods Enzymol.* **2006**, 414, 300; b) C. Lipinski, A. Hopkins, *Nature* **2004**, 432, 855; c) B. R. Stockwell, *Nature* **2004**, 432, 846.
- [27] a) H. E. Blackwell, L. Perez, R. A. Stavenger, J. A. Tallarico, E. Cope Eatough, M. A. Foley, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1167; b) P. A. Clemons, A. N. Koehler, B. K. Wagner, T. G. Sprigings, D. R. Spring, R. W. King, S. L. Schreiber, M. A. Foley, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1183; c) P. Arya, R. Joseph, D. T. Chou, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 145.
- [28] a) B. A. Bunin, M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 4708; b) P. Ertl, S. Jelfs, J. Muhlbacher, A. Schuffenhauer, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4568.
- [29] S. Ding, N. S. Gray, X. Wu, Q. Ding, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1594.
- [30] R. Gonzalez, L. L. Jennings, M. Knuth, A. P. Orth, H. E. Klock, W. Ou, J. Feuerhelm, M. V. Hull, E. Koesema, Y. Wang, J. Zhang, C. Wu, C. Y. Cho, A. I. Su, S. Batalov, H. Chen, K. Johnson, B. Laffitte, D. G. Nguyen, E. Y. Snyder, P. G. Schultz, J. L. Harris, S. A. Lesley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 3552.
- [31] H. Lin, E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, D. Hollenbaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S. K. Doberstein, L. T. Williams, *Science* **2008**, 320, 807.
- [32] X. S. Zheng, T. F. Chan, H. H. Zhou, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 609.
- [33] X. Wu, J. Walker, J. Zhang, S. Ding, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1229.
- [34] X. Wu, S. Ding, Q. Ding, N. S. Gray, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14520.
- [35] S. Sinha, J. K. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 29.
- [36] A. E. Boitano, J. Wang, R. Romeo, L. C. Bouchez, A. E. Parker, S. E. Sutton, J. R. Walker, C. A. Flaveny, G. H. Perdew, M. S. Denison, P. G. Schultz, M. P. Cooke, *Science* **2010**, 329, 1345.
- [37] H. Wurdak, S. Zhu, A. Romero, M. Lorgier, J. Watson, C. Y. Chiang, J. Zhang, V. S. Natsu, L. L. Lairson, J. R. Walker, C. M. Trussell, G. R. Harsh, H. Vogel, B. Felding-Habermann, A. P. Orth, L. J. Miraglia, D. R. Rines, S. L. Skirboll, P. G. Schultz, *Cell Stem Cell* **2010**, 6, 37.

- [38] S. Chen, J. T. Do, Q. Zhang, S. Yao, F. Yan, E. C. Peters, H. R. Scholer, P. G. Schultz, S. Ding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17266.
- [39] S. Chen, S. Takanashi, Q. Zhang, W. Xiong, S. Zhu, E. C. Peters, S. Ding, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10482.
- [40] S. Ding, T. Y. Wu, A. Brinker, E. C. Peters, W. Hur, N. S. Gray, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7632.
- [41] S. Zhu, H. Wurdak, J. Wang, C. A. Lyssiotis, E. C. Peters, C. Y. Cho, X. Wu, P. G. Schultz, *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 416.
- [42] J. R. Colca, G. G. Harrigan, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, *7*, 699.
- [43] S. Zhu, K. T. Mc Henry, W. S. Lane, G. Fenteany, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 981.
- [44] J. S. Melnick, J. Janes, S. Kim, J. Y. Chang, D. G. Sipes, D. Gunderson, L. James, J. T. Matzen, M. E. Garcia, T. L. Hood, R. Beigi, G. Xia, R. A. Harig, H. Asatryan, S. F. Yan, Y. Zhou, X. J. Gu, A. Saadat, V. Zhou, F. J. King, C. M. Shaw, A. I. Su, R. Downs, N. S. Gray, P. G. Schultz, M. Warmuth, J. S. Caldwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3153.
- [45] A. J. Firestone, J. K. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *5*, 15.
- [46] a) R. T. Moon, B. Bowerman, M. Boutros, N. Perrimon, *Science* **2002**, *296*, 1644; b) K. Willert, J. D. Brown, E. Danenberg, A. W. Duncan, I. L. Weissman, T. Reya, J. R. Yates III, R. Nusse, *Nature* **2003**, *423*, 448; c) A. J. Zhu, F. M. Watt, *Development* **1999**, *126*, 2285; d) A. J. Zhu, I. Haase, F. M. Watt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6728.
- [47] a) L. Meijer, M. Flajole, P. Greengard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 471; b) B. W. Doble, J. R. Woodgett, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1175.
- [48] N. Sato, L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, A. H. Bivranlou, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 55.
- [49] Q. L. Ying, J. Wray, J. Nichols, L. Battle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen, A. Smith, *Nature* **2008**, *453*, 519.
- [50] J. Silva, O. Barrandon, J. Nichols, J. Kawaguchi, T. W. Theunissen, A. Smith, *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e253.
- [51] a) A. S. Tseng, F. B. Engel, M. T. Keating, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 957; b) R. Musmann, M. Geese, F. Harder, S. Kegel, U. Andag, A. Lomow, U. Burk, D. Onichtchouk, C. Dohrmann, M. Austen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12030; c) W. Wang, J. R. Walker, X. Wang, M. S. Tremblay, J. W. Lee, X. Wu, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 1427.
- [52] J. Liu, X. Wu, B. Mitchell, C. Kintner, S. Ding, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2023; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1987.
- [53] Q. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, N. D. Camp, N. Nishiya, E. C. Peters, M. H. Ginsberg, X. Jian, P. A. Randazzo, P. G. Schultz, R. T. Moon, S. Ding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7444.
- [54] B. Chen, M. E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C. W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N. S. Williams, M. G. Roth, J. F. Amatruda, C. Chen, L. Lum, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 100.
- [55] S. M. Huang, Y. M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G. A. Michaud, O. Charlat, E. Willellette, Y. Zhang, S. Wiessner, M. Hild, X. Shi, C. J. Wilson, C. Mickanin, V. Myer, A. Fazal, R. Tomlinson, F. Serluca, W. Shao, H. Cheng, M. Shultz, C. Rau, M. Schirle, J. Schlegel, S. Ghidelli, S. Fawell, C. Lu, D. Curtis, M. W. Kirschner, C. Lengauer, P. M. Finan, J. A. Tallarico, T. Bouwmeester, J. A. Porter, A. Bauer, F. Cong, *Nature* **2009**, *461*, 614.
- [56] M. Lepourcelet, Y. N. Chen, D. S. France, H. Wang, P. Crews, F. Petersen, C. Bruseo, A. W. Wood, R. A. Shivdasani, *Cancer Cell* **2004**, *5*, 91.
- [57] K. Sukhdeo, M. Mani, Y. Zhang, J. Dutta, H. Yasui, M. D. Rooney, D. E. Carrasco, M. Zheng, H. He, Y. T. Tai, C. Mitsiades, K. C. Anderson, D. R. Carrasco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7516.
- [58] P. W. Ingham, A. P. McMahon, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 3059.
- [59] a) M. Frank-Kamenetsky, X. M. Zhang, S. Bottega, O. Guicherit, H. Wichterle, H. Dudek, D. Bumcrot, F. Y. Wang, S. Jones, J. Shulok, L. L. Rubin, J. A. Porter, *J. Biol.* **2002**, *1*, 10; b) J. K. Chen, J. Taipale, K. E. Young, T. Maiti, P. A. Beachy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14071.
- [60] a) J. K. Chen, J. Taipale, M. K. Cooper, P. A. Beachy, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2743; b) P. Heretsch, L. Tzagkaroulaki, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3492; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3418.
- [61] a) S. Ahn, A. L. Joyner, *Nature* **2005**, *437*, 894; b) X. J. Li, B. Y. Hu, S. A. Jones, Y. S. Zhang, T. Lavaute, Z. W. Du, S. C. Zhang, *Stem Cells* **2008**, *26*, 886; c) H. Wichterle, I. Lieberam, J. A. Porter, T. M. Jessell, *Cell* **2002**, *110*, 385.
- [62] a) D. M. Berman, S. S. Karhadkar, A. R. Hallahan, J. I. Pritchard, C. G. Eberhart, D. N. Watkins, J. K. Chen, M. K. Cooper, J. Taipale, J. M. Olson, P. A. Beachy, *Science* **2002**, *297*, 1559; b) N. Gaspard, T. Bouschet, A. Herpoel, G. Naeije, J. van den Amele, P. Vanderhaeghen, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1454.
- [63] J. Lee, X. Wu, M. Pasca di Magliano, E. C. Peters, Y. Wang, J. Hong, M. Hebrok, S. Ding, C. Y. Cho, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1916.
- [64] B. Z. Stanton, L. F. Peng, N. Maloof, K. Nakai, X. Wang, J. L. Duffner, K. M. Taveras, J. M. Hyman, S. W. Lee, A. N. Koehler, J. K. Chen, J. L. Fox, A. Mandinova, S. L. Schreiber, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 154.
- [65] M. Y. Wu, C. S. Hill, *Dev. Cell* **2009**, *16*, 329.
- [66] a) G. J. Inman, F. J. Nicolas, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. J. Laping, C. S. Hill, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 65; b) P. B. Yu, C. C. Hong, C. Sachidanandan, J. L. Babbitt, D. Y. Deng, S. A. Hoyng, H. Y. Lin, K. D. Bloch, R. T. Peterson, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 33.
- [67] a) J. K. Ichida, J. Blanchard, K. Lam, E. Y. Son, J. E. Chung, D. Egli, K. M. Loh, A. C. Carter, F. P. Di Giorgio, K. Koszka, D. Huangfu, H. Akutsu, D. R. Liu, L. L. Rubin, K. Eggan, *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 491; b) N. Maherali, K. Hochedlinger, *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 1718.
- [68] a) N. Golestaneh, B. Mishra, *Oncogene* **2005**, *24*, 5722; b) H. Ikushima, T. Todo, Y. Ino, M. Takahashi, K. Miyazawa, K. Miyazono, *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 504; c) S. Peñuelas, J. Anido, R. M. Prieto-Sanchez, G. Folch, I. Barba, I. Cuartas, D. Garcia-Dorado, M. A. Poca, J. Sahuquillo, J. Baselga, J. Seoane, *Cancer Cell* **2009**, *15*, 315.
- [69] J. Hao, M. A. Daleo, C. K. Murphy, P. B. Yu, J. N. Ho, J. Hu, R. T. Peterson, A. K. Hatzopoulos, C. C. Hong, *PLoS One* **2008**, *3*, e2904.
- [70] D. S. Kim, J. S. Lee, J. W. Leem, Y. J. Huh, J. Y. Kim, H. S. Kim, I. H. Park, G. Q. Daley, D. Y. Hwang, D. W. Kim, *Stem Cell Rev.* **2010**, *6*, 270.
- [71] A. Beenken, M. Mohammadi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 235.
- [72] a) S. R. Braam, C. Denning, E. Matsa, L. E. Young, R. Passier, C. L. Mummery, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1435; b) A. Alvarez-Buylla, D. A. Lim, *Neuron* **2004**, *41*, 683.
- [73] a) S. C. Bendall, M. H. Stewart, P. Menendez, D. George, K. Vijayaragavan, T. Werbowetski-Ogilvie, V. Ramos-Mejia, A. Rouleau, J. Yang, M. Bosse, G. Lajoie, M. Bhatia, *Nature* **2007**, *448*, 1015; b) M. Buehr, S. Meek, K. Blair, J. Yang, J. Ure, J. Silva, R. McLay, J. Hall, Q. L. Ying, A. Smith, *Cell* **2008**, *135*, 1287; c) P. Li, C. Tong, R. Mehrian-Shai, L. Jia, N. Wu, Y. Yan, R. E. Maxson, E. N. Schulze, H. Song, C. L. Hsieh, M. F. Pera, Q. L. Ying, *Cell* **2008**, *135*, 1299.
- [74] A. Dubrowska, S. Kim, R. J. Salamone, J. R. Walker, S. M. Maira, C. Garcia-Echeverria, P. G. Schultz, V. A. Reddy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 268.
- [75] a) G. M. Keller, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, *7*, 862; b) T. Burdon, A. Smith, P. Savatier, *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 432.



- [76] T. Burdon, C. Stracey, I. Chambers, J. Nichols, A. Smith, *Dev. Biol.* **1999**, *210*, 30.
- [77] X. Qi, T. G. Li, J. Hao, J. Hu, J. Wang, H. Simmons, S. Miura, Y. Mishina, G. Q. Zhao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6027.
- [78] Q. L. Ying, J. Nichols, I. Chambers, A. Smith, *Cell* **2003**, *115*, 281.
- [79] N. R. Paling, H. Wheadon, H. K. Bone, M. J. Welham, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48063.
- [80] H. Umehara, T. Kimura, S. Ohtsuka, T. Nakamura, K. Kitajima, M. Ikawa, M. Okabe, H. Niwa, T. Nakano, *Stem Cells* **2007**, *25*, 2705.
- [81] P. Cartwright, C. McLean, A. Sheppard, D. Rivett, K. Jones, S. Dalton, *Development* **2005**, *132*, 885.
- [82] H. K. Bone, T. Damiano, S. Bartlett, A. Perry, J. Letchford, Y. S. Ripoll, A. S. Nelson, M. J. Welham, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 15.
- [83] S. M. Chambers, C. A. Fasano, E. P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain, L. Studer, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 275.
- [84] a) D. Duval, M. Malaise, B. Reinhardt, C. Kedinger, H. Boeuf, *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 331; b) D. K. Singla, D. J. Schneider, M. M. LeWinter, B. E. Sobel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *345*, 789; c) T. Kunath, M. K. Saba-El-Leil, M. Almo-usaillekh, J. Wray, S. Meloche, A. Smith, *Development* **2007**, *134*, 2895; d) M. P. Stavridis, J. S. Lunn, B. J. Collins, K. G. Storey, *Development* **2007**, *134*, 2889.
- [85] a) C. Anneren, C. A. Cowan, D. A. Melton, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 31590; b) M. A. Meyn III, S. J. Schreiner, T. P. Dumitrescu, G. J. Nau, T. E. Smithgall, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 1320; c) M. A. Meyn III, T. E. Smithgall, *Sci. Signaling* **2009**, *2*, ra64.
- [86] S. Lowell, A. Benchoua, B. Heavey, A. G. Smith, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e121.
- [87] Q. L. Ying, M. Stavridis, D. Griffiths, M. Li, A. Smith, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 183.
- [88] W. Yang, W. Wei, C. Shi, J. Zhu, W. Ying, Y. Shen, X. Ye, L. Fang, S. Duo, J. Che, H. Shen, S. Ding, H. Deng, *Stem Cells* **2009**, *27*, 383.
- [89] T. Miyabayashi, J. L. Teo, M. Yamamoto, M. McMillan, C. Nguyen, M. Kahn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5668.
- [90] a) D. A. Loebl, C. M. Watson, R. A. De Young, P. P. Tam, *Dev. Biol.* **2003**, *264*, 1; b) A. G. Smith, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, *17*, 435.
- [91] J. S. Odorico, D. S. Kaufman, J. A. Thomson, *Stem Cells* **2001**, *19*, 193.
- [92] T. Nakano, H. Kodama, T. Honjo, *Science* **1994**, *265*, 1098.
- [93] S. I. Nishikawa, S. Nishikawa, M. Hirashima, N. Matsuyoshi, H. Kodama, *Development* **1998**, *125*, 1747.
- [94] A. R. Muotri, F. H. Gage, *Nature* **2006**, *441*, 1087.
- [95] O. Lindvall, Z. Kokaia, A. Martinez-Serrano, *Nat. Med.* **2004**, *10*, S42.
- [96] a) H. Ikeda, F. Osakada, K. Watanabe, K. Mizuseki, T. Haraguchi, H. Miyoshi, D. Kamiya, Y. Honda, N. Sasai, N. Yoshimura, M. Takahashi, Y. Sasai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11331; b) K. Watanabe, D. Kamiya, A. Nishiyama, T. Katayama, S. Nozaki, H. Kawasaki, Y. Watanabe, K. Mizuseki, Y. Sasai, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 288; c) F. Osakada, H. Ikeda, Y. Sasai, M. Takahashi, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 811.
- [97] a) S. H. Lee, N. Lumelsky, L. Studer, J. M. Auerbach, R. D. McKay, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 675; b) T. Barberi, P. Klinevny, N. Y. Calingasan, H. Lee, H. Kawamata, K. Loonam, A. L. Perrier, J. Bruses, M. E. Rubio, N. Topf, V. Tabar, N. L. Harrison, M. F. Beal, M. A. Moore, L. Studer, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1200; c) M. Bibel, J. Richter, E. Lacroix, Y. A. Barde, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1034; d) M. Eiraku, K. Watanabe, M. Matsuo-Takasaki, M. Kawada, S. Yonemura, M. Matsumura, T. Wataya, A. Nishiyama, K. Muguruma, Y. Sasai, *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 519.
- [98] G. Castelo-Branco, N. Rawal, E. Arenas, *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 5731.
- [99] W. Y. Kim, X. Wang, Y. Wu, B. W. Doble, S. Patel, J. R. Woodgett, W. D. Snider, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 1390.
- [100] D. Daneman, *Lancet* **2006**, *367*, 847.
- [101] a) M. A. Naftanel, D. M. Harlan, *PLoS Med.* **2004**, *1*, e58; quiz e75; b) A. M. Shapiro, J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbitt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, R. V. Rajotte, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 230.
- [102] a) Q. Zhou, D. A. Melton, *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 382; b) T. Graf, T. Enver, *Nature* **2009**, *462*, 587.
- [103] M. Borowiak, D. A. Melton, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 727.
- [104] M. Yasunaga, S. Tada, S. Torikai-Nishikawa, Y. Nakano, M. Okada, L. M. Jakt, S. Nishikawa, T. Chiba, T. Era, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1542.
- [105] a) A. M. Singh, S. Dalton, *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 141; b) S. Herold, B. Herkert, M. Eilers, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 441.
- [106] M. Borowiak, R. Maehr, S. Chen, A. E. Chen, W. Tang, J. L. Fox, S. L. Schreiber, D. A. Melton, *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 348.
- [107] a) A. Behfar, L. V. Zingman, D. M. Hodgson, J. M. Rauzier, G. C. Kane, A. Terzic, M. Puceat, *FASEB J.* **2002**, *16*, 1558; b) T. Kawai, T. Takahashi, M. Esaki, H. Ushikoshi, S. Nagano, H. Fujiwara, K. Kosai, *Circ. J.* **2004**, *68*, 691.
- [108] S. Yuasa, Y. Itabashi, U. Koshimizu, T. Tanaka, K. Sugimura, M. Kinoshita, F. Hattori, S. Fukami, T. Shimazaki, S. Ogawa, H. Okano, K. Fukuda, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 607.
- [109] P. Dell'Era, R. Ronca, L. Coco, S. Nicoli, M. Metra, M. Presta, *Circ. Res.* **2003**, *93*, 414.
- [110] H. Terami, K. Hidaka, T. Katsumata, A. Iio, T. Morisaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 968.
- [111] A. M. Wobus, G. Kaomei, J. Shan, M. C. Wellner, J. Rohwedel, G. Ji, B. Fleischmann, H. A. Katus, J. Hescheler, W. M. Franz, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 1525.
- [112] T. Takahashi, B. Lord, P. C. Schulze, R. M. Fryer, S. S. Sarang, S. R. Gullans, R. T. Lee, *Circulation* **2003**, *107*, 1912.
- [113] X. Wu, S. Ding, Q. Ding, N. S. Gray, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1590.
- [114] a) D. Hakuno, T. Takahashi, J. Lammerding, R. T. Lee, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39534; b) C. Ventura, E. Zinellu, E. Maninchedda, M. Maioli, *Circ. Res.* **2003**, *92*, 623; c) A. Berkessel, B. Seelig, S. Schwengberg, J. Hescheler, A. Sachinidis, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 208; d) A. Sachinidis, S. Schwengberg, R. Hippler-Altenburg, D. Mariappan, N. Kamisetti, B. Seelig, A. Berkessel, J. Hescheler, *Cell. Physiol. Biochem.* **2006**, *18*, 303.
- [115] a) J. T. Dimos, K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, G. Saphier, R. Leibell, R. Golland, H. Wichterle, C. E. Henderson, K. Eggan, *Science* **2008**, *321*, 1218; b) G. Lee, E. P. Papapetrou, H. Kim, S. M. Chambers, M. J. Tomishima, C. A. Fasano, Y. M. Ganat, J. Menon, F. Shimizu, A. Viale, V. Tabar, M. Sadelain, L. Studer, *Nature* **2009**, *461*, 402; c) R. P. Cervera, M. Stojkovic, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 310.
- [116] L. Ahrlund-Richter, M. De Luca, D. R. Marshak, M. Munsie, A. Veiga, M. Rao, *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 20.
- [117] a) A. Urbach, M. Schuldiner, N. Benvenisty, *Stem Cells* **2004**, *22*, 635; b) T. P. Zwaka, J. A. Thomson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 319; c) S. Irion, H. Luche, P. Gadue, H. J. Fehling, M. Kennedy, G. Keller, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1477; d) D. Hockemeyer, F. Soldner, C. Beard, Q. Gao, M. Mitalipova, R. C. DeKever, G. E. Katibah, R. Amora, E. A. Boydston, B. Zeitler, X. Meng, J. C. Miller, L. Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urnov, R. Jaenisch, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 851.
- [118] C. P. Austin, J. F. Battey, A. Bradley, M. Bucan, M. Capecchi, F. S. Collins, W. F. Dove, G. Duyk, S. Dymecki, J. T. Eppig, F. B. Grieder, N. Heintz, G. Hicks, T. R. Insel, A. Joyner, B. H.



- Koller, K. C. Lloyd, T. Magnuson, M. W. Moore, A. Nagy, J. D. Pollock, A. D. Roses, A. T. Sands, B. Seed, W. C. Skarnes, J. Snoddy, P. Soriano, D. J. Stewart, F. Stewart, B. Stillman, H. Varmus, L. Varticovski, I. M. Verma, T. F. Vogt, H. von Melchner, J. Witkowski, R. P. Woychik, W. Wurst, G. D. Yancopoulos, S. G. Young, B. Zambrowicz, *Nat. Genet.* **2004**, 36, 921.
- [119] N. J. Laping, E. Grygielko, A. Mathur, S. Butter, J. Bomberger, C. Tweed, W. Martin, J. Fornwald, R. Lehr, J. Harling, L. Gaster, J. F. Callahan, B. A. Olson, *Mol. Pharmacol.* **2002**, 62, 58.
- [120] a) M. Amit, C. Shariki, V. Margulets, J. Itskovitz-Eldor, *Biol. Reprod.* **2004**, 70, 837; b) G. M. Beattie, A. D. Lopez, N. Bucay, A. Hinton, M. T. Firpo, C. C. King, A. Hayek, *Stem Cells* **2005**, 23, 489; c) C. A. Cowan, I. Klimanskaya, J. McMahon, J. Atienza, J. Witmyer, J. P. Zucker, S. Wang, C. C. Morton, A. P. McMahon, D. Powers, D. A. Melton, *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 1353; d) J. Lu, R. Hou, C. J. Booth, S. H. Yang, M. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 5688; e) T. E. Ludwig, M. E. Levenstein, J. M. Jones, W. T. Berggren, E. R. Mitchen, J. L. Frane, L. J. Crandall, C. A. Daigh, K. R. Conard, M. S. Piekarczyk, R. A. Llanas, J. A. Thomson, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 185; f) A. Pébay, R. C. Wong, S. M. Pitson, E. J. Wolvetang, G. S. Peh, A. Filipczyk, K. L. Koh, I. Tellis, L. T. Nguyen, M. F. Pera, *Stem Cells* **2005**, 23, 1541; g) A. D. Pyle, L. F. Lock, P. J. Donovan, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 344; h) B. E. Reubinoff, M. F. Pera, C. Y. Fong, A. Trounson, A. Bongso, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 399; i) N. Strelchenko, O. Verlinsky, V. Kukharenko, Y. Verlinsky, *Reprod. Biomed. Online* **2004**, 9, 623; j) L. Wang, T. C. Schulz, E. S. Sherrer, D. S. Dauphin, S. Shin, A. M. Nelson, C. B. Ware, M. Zhan, C. Z. Song, X. Chen, S. N. Brimble, A. McLean, M. J. Galeano, E. W. Uhl, K. A. D'Amour, J. D. Chesnut, M. S. Rao, C. A. Blau, A. J. Robins, *Blood* **2007**, 110, 4111.
- [121] a) G. Wang, H. Zhang, Y. Zhao, J. Li, J. Cai, P. Wang, S. Meng, J. Feng, C. Miao, M. Ding, D. Li, H. Deng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 330, 934; b) C. Xu, E. Rosler, J. Jiang, J. S. Lebkowski, J. D. Gold, C. O'Sullivan, K. Delavan-Boorsma, M. Mok, A. Bronstein, M. K. Carpenter, *Stem Cells* **2005**, 23, 315.
- [122] R. Gonzalez, J. W. Lee, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [123] P. S. Woll, J. K. Morris, M. S. Painschab, R. K. Marcus, A. D. Kohn, T. L. Biechele, R. T. Moon, D. S. Kaufman, *Blood* **2008**, 111, 122.
- [124] L. Cai, Z. Ye, B. Y. Zhou, P. Mali, C. Zhou, L. Cheng, *Cell Res.* **2007**, 17, 62.
- [125] C. B. Ware, L. Wang, B. H. Mecham, L. Shen, A. M. Nelson, M. Bar, D. A. Lamba, D. S. Dauphin, B. Buckingham, B. Askari, R. Lim, M. Tewari, S. M. Gartler, J. P. Issa, P. Pavlidis, Z. Duan, C. A. Blau, *Cell Stem Cell* **2009**, 4, 359.
- [126] T. Barberi, M. Bradbury, Z. Dincer, G. Panagiotakos, N. D. Succi, L. Studer, *Nat. Med.* **2007**, 13, 642.
- [127] C. Xiong, C. Q. Xie, L. Zhang, J. Zhang, K. Xu, M. Fu, W. E. Thompson, L. J. Yang, Y. E. Chen, *Stem Cells Dev.* **2005**, 14, 671.
- [128] A. B. McLean, K. A. D'Amour, K. L. Jones, M. Krishnamoorthy, M. J. Kulik, D. M. Reynolds, A. M. Sheppard, H. Liu, Y. Xu, E. E. Baetge, S. Dalton, *Stem Cells* **2007**, 25, 29.
- [129] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, Y. Sasai, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 681.
- [130] S. C. Desbordes, D. G. Placantonakis, A. Ciro, N. D. Succi, G. Lee, H. Djaballah, L. Studer, *Cell Stem Cell* **2008**, 2, 602.
- [131] S. Chen, M. Borowiak, J. L. Fox, R. Maehr, K. Osafune, L. Davidow, K. Lam, L. F. Peng, S. L. Schreiber, L. L. Rubin, D. Melton, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 258.
- [132] a) G. J. Spangrude, S. Heimfeld, I. L. Weissman, *Science* **1988**, 241, 58; b) J. A. Shizuru, R. S. Negrin, I. L. Weissman, *Annu. Rev. Med.* **2005**, 56, 509.
- [133] C. C. Hofmeister, J. Zhang, K. L. Knight, P. Le, P. J. Stiff, *Bone Marrow Transplant.* **2007**, 39, 11.
- [134] J. E. Wagner, *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2009**, 22, 551.
- [135] J. C. Young, S. Wu, G. Hansteen, C. Du, L. Sambucetti, S. Remiszewski, A. M. O'Farrell, B. Hill, C. Lavau, L. J. Murray, *Cytotherapy* **2004**, 6, 328.
- [136] H. Araki, N. Mahmud, M. Milhem, R. Nunez, M. Xu, C. A. Beam, R. Hoffman, *Exp. Hematol.* **2006**, 34, 140.
- [137] M. Yang, K. Li, P. C. Ng, C. K. Chuen, T. K. Lau, Y. S. Cheng, Y. S. Liu, C. K. Li, P. M. Yuen, A. E. James, S. M. Lee, T. F. Fok, *Stem Cells* **2007**, 25, 1800.
- [138] a) T. Peled, E. Landau, J. Mandel, E. Glukhman, N. R. Goudsmid, A. Nagler, E. Fibach, *Exp. Hematol.* **2004**, 32, 547; b) T. Peled, E. Landau, E. Prus, A. J. Treves, A. Nagler, E. Fibach, *Br. J. Haematol.* **2002**, 116, 655; c) B. Bae, S. S. Percival, *J. Nutr.* **1993**, 123, 997; d) C. Steinkuhler, O. Sapor, M. T. Carri, W. Nagel, L. Marcocci, M. R. Ciriolo, U. Weser, G. Rotilio, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 24580; e) X. T. Gregg, V. Reddy, J. T. Prchal, *Blood* **2002**, 100, 1493.
- [139] T. Peled, J. Mandel, R. N. Goudsmid, C. Landor, N. Hasson, D. Harati, M. Austin, A. Hasson, E. Fibach, E. J. Shpall, A. Nagler, *Cytotherapy* **2004**, 6, 344.
- [140] a) L. J. Murray, J. C. Young, L. J. Osborne, K. M. Luens, R. Scollay, B. L. Hill, *Exp. Hematol.* **1999**, 27, 1019; b) J. C. Young, K. Lin, G. Hansteen, M. Travis, L. J. Murray, L. Jaing, R. Scollay, B. L. Hill, *Exp. Hematol.* **1999**, 27, 994.
- [141] T. E. North, W. Goessling, C. R. Walkley, C. Lengerke, K. R. Kopani, A. M. Lord, G. J. Weber, T. V. Bowman, I. H. Jang, T. Grosser, G. A. Fitzgerald, G. Q. Daley, S. H. Orkin, L. I. Zon, *Nature* **2007**, 447, 1007.
- [142] a) F. Bertolini, M. Battaglia, P. Pedrazzoli, G. A. Da Prada, A. Lanza, D. Soligo, L. Caneva, B. Sarina, S. Murphy, T. Thomas, G. R. della Cuna, *Blood* **1997**, 89, 2679; b) R. L. Paquette, S. T. Dergham, E. Karpf, H. J. Wang, D. J. Slamon, L. Souza, J. A. Glaspy, *Blood* **2000**, 96, 2385.
- [143] P. Stiff, B. Chen, W. Franklin, D. Oldenberg, E. Hsi, R. Bayer, E. Shpall, J. Douville, R. Mandalam, D. Malhotra, T. Muller, R. D. Armstrong, A. Smith, *Blood* **2000**, 95, 2169.
- [144] a) N. Debili, F. Wendling, A. Katz, J. Guichard, J. Breton-Gorius, P. Hunt, W. Vainchenker, *Blood* **1995**, 86, 2516; b) R. Guerriero, U. Testa, M. Gabbianelli, G. Mattia, E. Montesoro, G. Macioce, A. Pace, B. Ziegler, H. J. Hassan, C. Peschle, *Blood* **1995**, 86, 3725.
- [145] A. E. Boitano, P. G. Schultz, M. P. Cooke, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [146] A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, N. N. Kulagina, *Exp. Hematol.* **1976**, 4, 267.
- [147] a) N. K. Satija, G. U. Gurudutta, S. Sharma, F. Afrin, P. Gupta, Y. K. Verma, V. K. Singh, R. P. Tripathi, *Stem Cells Dev.* **2007**, 16, 7; b) Y. Takashima, T. Era, K. Nakao, S. Kondo, M. Kasuga, A. G. Smith, S. Nishikawa, *Cell* **2007**, 129, 1377.
- [148] B. J. Jones, S. J. McTaggart, *Exp. Hematol.* **2008**, 36, 733.
- [149] a) E. M. Horwitz, D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz, M. K. Brenner, *Nat. Med.* **1999**, 5, 309; b) M. A. Laflamme, C. E. Murry, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 845; c) K. Sakurada, F. M. McDonald, F. Shimada, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 5802; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5718.
- [150] J. E. Dennis, A. I. Caplan in *Stem Cells Handbook* (Hrsg.: S. Sell), Humana Press, Totowa, **2004**, S. 107.
- [151] S. M. Taylor, P. A. Jones, *Cell* **1979**, 17, 771.
- [152] a) N. Jaiswal, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, S. P. Bruder, *J. Cell. Biochem.* **1997**, 64, 295; b) A. E. Grigoriadis, J. N. Heersche, J. E. Aubin, *J. Cell Biol.* **1988**, 106, 2139; c) M. Styner, B.

- Sen, Z. Xie, N. Case, J. Rubin, *J. Cell Biochem.* **2010**, *111*, 1042; d) S. Zhou, M. S. LeBoff, J. Glowacki, *Endocrinology* **2010**, *151*, 14.
- [153] K. Johnson, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [154] a) F. H. Gage, *Science* **2000**, *287*, 1433; b) S. Temple, *Nature* **2001**, *414*, 112.
- [155] a) F. T. Merkle, Z. Mirzadeh, A. Alvarez-Buylla, *Science* **2007**, *317*, 381; b) J. Ray, F. H. Gage, *Mol. Cell. Neurosci.* **2006**, *31*, 560.
- [156] M. Götz, W. B. Huttner, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 777.
- [157] A. Androutsellis-Theotokis, R. R. Leker, F. Soldner, D. J. Hoepfner, R. Ravin, S. W. Poser, M. A. Rueger, S. K. Bae, R. Kittappa, R. D. McKay, *Nature* **2006**, *442*, 823.
- [158] S. Pan, X. Wu, J. Jiang, W. Gao, Y. Wan, D. Cheng, D. Han, J. Liu, N. P. Englund, Y. Wang, S. Peukert, K. Miller-Moslin, J. Yuan, R. Guo, M. Matsumoto, A. Vattay, Y. Jiang, J. Tsao, F. Sun, A. C. Pferdekamper, S. Dodd, T. Tuntland, W. Maniara, J. F. Kelleher, Y. Yao, M. Warmuth, J. Williams, M. Dorsch, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 130.
- [159] P. Diamandis, J. Wildenhain, I. D. Clarke, A. G. Sacher, J. Graham, D. S. Bellows, E. K. Ling, R. J. Ward, L. G. Jamieson, M. Tyers, P. B. Dirks, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 268.
- [160] P. Diamandis, A. G. Sacher, M. Tyers, P. B. Dirks, *Med. Hypotheses* **2009**, *72*, 683.
- [161] M. Maden, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 755.
- [162] B. A. Barres, M. A. Lazar, M. C. Raff, *Development* **1994**, *120*, 1097.
- [163] T. D. Palmer, J. Takahashi, F. H. Gage, *Mol. Cell. Neurosci.* **1997**, *8*, 389.
- [164] L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, R. Hen, *Science* **2003**, *301*, 805.
- [165] A. Sahay, R. Hen, *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1110.
- [166] J. L. MacDonald, A. J. Roskams, *Prog. Neurobiol.* **2009**, *88*, 170.
- [167] S. Shen, J. Li, P. Casaccia-Bonnel, *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 577.
- [168] A. Liu, M. Muggironi, M. Marin-Husstege, P. Casaccia-Bonnel, *Glia* **2003**, *44*, 264.
- [169] J. Hsieh, K. Nakashima, T. Kuwabara, E. Mejia, F. H. Gage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16659.
- [170] J. W. Schneider, Z. Gao, S. Li, M. Farooqi, T. S. Tang, I. Bezprozvanny, D. E. Frantz, J. Hsieh, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 408.
- [171] Y. Hao, T. Creson, L. Zhang, P. Li, F. Du, P. Yuan, T. D. Gould, H. K. Manji, G. Chen, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 6590.
- [172] A. Fischer, F. Sananbenesi, X. Wang, M. Dobbin, L. H. Tsai, *Nature* **2007**, *447*, 178.
- [173] a) R. J. Franklin, C. Ffrench-Constant, *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 839; b) J. M. Levine, R. Reynolds, J. W. Fawcett, *Trends Neurosci.* **2001**, *24*, 39.
- [174] C. E. Buckley, A. Marguerie, A. G. Roach, P. Goldsmith, A. Fleming, W. K. Alderton, R. J. Franklin, *Neuropharmacology* **2010**, *59*, 149.
- [175] L. Joubert, I. Foucault, Y. Sagot, L. Bernasconi, F. Duval, C. Alliod, M. J. Frossard, R. Pescini Gobert, M. L. Curchod, C. Salvat, A. Nichols, S. Pouly, C. Rommel, A. Roach, R. Hooft van Huijsduijnen, *J. Neurosci. Res.* **2010**, *88*, 2546.
- [176] A. S. Baer, Y. A. Syed, S. U. Kang, D. Mitteregger, R. Vig, C. Ffrench-Constant, R. J. Franklin, F. Altmann, G. Lubec, M. R. Kotter, *Brain* **2009**, *132*, 465.
- [177] a) K. Makhlof, M. Comabella, J. Imitola, H. L. Weiner, S. J. Khoury, *J. Neuroimmunol.* **2001**, *117*, 156; b) NIAID, Treatment of Multiple Sclerosis With Copaxone and Albuterol; Clinical Trial #NCT00039988 **2002**.
- [178] M. Warashina, K. H. Min, T. Kuwabara, A. Huynh, F. H. Gage, P. G. Schultz, S. Ding, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 591.
- [179] H. Wurdak, S. Zhu, K. H. Min, L. Aimone, L. L. Lairson, J. Watson, G. Chopiuk, J. Demas, B. Charette, E. Weerapana, B. F. Cravatt, H. T. Cline, E. C. Peters, J. Zhang, J. R. Walker, C. Wu, J. Chang, T. Tuntland, C. Y. Cho, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16542.
- [180] a) M. Garriga-Canut, S. H. Orkin, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 23597; b) P. J. McKeveney, V. M. Hodges, R. N. Mullan, P. Maxwell, D. Simpson, A. Thompson, P. C. Winter, T. R. Lappin, A. P. Maxwell, *Br. J. Haematol.* **2001**, *112*, 1016; c) R. P. Piekorz, A. Hoffmeyer, C. D. Duntsch, C. McKay, H. Nakajima, V. Sexl, L. Snyder, J. Reh, J. N. Ihle, *EMBO J.* **2002**, *21*, 653; d) C. M. Sadek, M. Pelto-Huikko, M. Tujague, K. R. Steffensen, M. Wennerholm, J. A. Gustafsson, *Gene Expression Patterns* **2003**, *3*, 203.
- [181] J. P. Saxe, H. Wu, T. K. Kelly, M. E. Phelps, Y. E. Sun, H. I. Kornblum, J. Huang, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1019.
- [182] A. M. Canudas, V. Di Giorgi-Gerevini, L. Iacovelli, G. Nano, M. D'Onofrio, A. Arcella, F. Giangaspero, C. Busceti, L. Ricci-Vitiani, G. Battaglia, F. Nicoletti, D. Melchiorri, *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10343.
- [183] A. Kumar, J. W. Godwin, P. B. Gates, A. A. Garza-Garcia, J. P. Brookes, *Science* **2007**, *318*, 772.
- [184] K. D. Birnbaum, A. S. Alvarado, *Cell* **2008**, *132*, 697.
- [185] C. A. Lyssiotis, B. D. Charette, L. L. Lairson in *Emerging Technology Platforms in Stem Cells* (Hrsg.: U. Lakshminpathy, J. D. Chesnut, B. Thyagarajan), Wiley, New York, **2009**, S. 51.
- [186] I. Wilmut, A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, K. H. Campbell, *Nature* **1997**, *385*, 810.
- [187] a) M. Tada, Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, T. Tada, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1553; b) C. A. Cowan, J. Atienza, D. A. Melton, K. Eggan, *Science* **2005**, *309*, 1369.
- [188] a) K. Guan, K. Nayeria, L. S. Maier, S. Wagner, R. Dressel, J. H. Lee, J. Nolte, F. Wolf, M. Li, W. Engel, G. Hasenfuss, *Nature* **2006**, *440*, 1199; b) M. Kanatsu-Shinohara, K. Inoue, J. Lee, M. Yoshimoto, N. Ogonuki, H. Miki, S. Baba, T. Kato, Y. Kazuki, S. Toyokuni, M. Toyoshima, O. Niwa, M. Oshimura, T. Heike, T. Nakahata, F. Ishino, A. Ogura, T. Shinohara, *Cell* **2004**, *119*, 1001; c) K. Ko, N. Tapia, G. Wu, J. B. Kim, M. J. Bravo, P. Sasse, T. Glaser, D. Ruau, D. W. Han, B. Greber, K. Hausdorfer, V. Sebastiano, M. Stehling, B. K. Fleischmann, O. Brustle, M. Zenke, H. R. Scholer, *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 87.
- [189] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin II, J. A. Thomson, *Science* **2007**, *318*, 1917.
- [190] a) A. P. Croft, S. A. Przyborski, *Stem Cells* **2006**, *24*, 1841; b) B. Neuhuber, G. Gallo, L. Howard, L. Kostura, A. Mackay, I. Fischer, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *77*, 192.
- [191] P. Lu, A. Blesch, M. H. Tuszynski, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *77*, 174.
- [192] a) M. Alvarez-Dolado, R. Pardal, J. M. Garcia-Verdugo, J. R. Fike, H. O. Lee, K. Pfeffer, C. Lois, S. J. Morrison, A. Alvarez-Buylla, *Nature* **2003**, *425*, 968; b) J. M. Nygren, S. Jovinge, M. Breitbach, P. Sawen, W. Roll, J. Hescheler, J. Taneera, B. K. Fleischmann, S. E. Jacobsen, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 494; c) G. Vassilopoulos, P. R. Wang, D. W. Russell, *Nature* **2003**, *422*, 901; d) X. Wang, H. Willenbring, Y. Akkari, Y. Torimaru, M. Foster, M. Al-Dhalimy, E. Lagasse, M. Finegold, S. Olson, M. Grompe, *Nature* **2003**, *422*, 897.
- [193] a) D. G. Phinney, D. J. Prockop, *Stem Cells* **2007**, *25*, 2896; b) A. Rizzino, *Dev. Dyn.* **2007**, *236*, 3199; c) A. J. Wagers, I. L. Weissman, *Cell* **2004**, *116*, 639.
- [194] S. J. Odelberg, A. Kollhoff, M. T. Keating, *Cell* **2000**, *103*, 1099.
- [195] C. J. McGann, S. J. Odelberg, M. T. Keating, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13699.
- [196] G. R. Rosania, Y. T. Chang, O. Perez, D. Sutherland, H. Dong, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 304.

- [197] S. Chen, Q. Zhang, X. Wu, P. G. Schultz, S. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 410.
- [198] L. Anastasia, M. Sampaulesi, N. Papini, D. Oleari, G. Lamorte, C. Tringali, E. Monti, D. Galli, G. Tettamanti, G. Cossu, B. Venerando, *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 2042.
- [199] M. Saraiya, R. Nasser, Y. Zeng, S. Addya, R. K. Ponnappan, P. Fortina, D. G. Anderson, T. J. Albert, I. M. Shapiro, M. V. Risbud, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 1443.
- [200] a) T. C. Hsieh, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, J. M. Wu, *Int. J. Oncol.* **2007**, *31*, 1293; b) A. M. D'Alise, G. Amabile, M. Iovino, F. P. Di Giorgio, M. Bartiromo, F. Sessa, F. Villa, A. Musacchio, R. Cortese, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1140.
- [201] Y. K. Kim, H. Y. Choi, N. H. Kim, W. Lee, D. W. Seo, D. W. Kang, H. Y. Lee, J. W. Han, S. W. Park, S. N. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *358*, 553.
- [202] G. Amabile, A. M. D'Alise, M. Iovino, P. Jones, S. Santaguida, A. Musacchio, S. Taylor, R. Cortese, *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 321.
- [203] P. C. Mabie, M. F. Mehler, R. Marmur, A. Papavasiliou, Q. Song, J. A. Kessler, *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 4112.
- [204] a) T. Kondo, M. Raff, *Science* **2000**, *289*, 1754; b) T. Kondo, M. Raff, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2963.
- [205] V. Graham, J. Khudyakov, P. Ellis, L. Pevny, *Neuron* **2003**, *39*, 749.
- [206] K. A. D'Amour, F. H. Gage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11866.
- [207] C. A. Lyssiotis, J. Walker, C. Wu, T. Kondo, P. G. Schultz, X. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14982.
- [208] A. Liu, Y. R. Han, J. Li, D. Sun, M. Ouyang, M. R. Plummer, P. Casaccia-Bonnel, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 7339.
- [209] W. K. Kelly, P. A. Marks, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2005**, *2*, 150.
- [210] a) P. A. Marks, R. Breslow, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 84; b) M. Tanaka, J. Levy, M. Terada, R. Breslow, R. A. Rifkind, P. A. Marks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 1003.
- [211] S. Shen, J. Sandoval, V. A. Swiss, J. Li, J. Dupree, R. J. Franklin, P. Casaccia-Bonnel, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 1024.
- [212] X. Yang, S. L. Smith, X. C. Tian, H. A. Lewin, J. P. Renard, T. Wakayama, *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 295.
- [213] a) S. Conrad, M. Renninger, J. Hennenlotter, T. Wiesner, L. Just, M. Bonin, W. Aicher, H. J. Buhning, U. Mattheus, A. Mack, H. J. Wagner, S. Minger, M. Matzkies, M. Reppel, J. Hescheler, K. D. Sievert, A. Stenzl, T. Skutella, *Nature* **2008**, *456*, 344; b) N. Kossack, J. Meneses, S. Shefi, H. N. Nguyen, S. Chavez, C. Nicholas, J. Gromoll, P. J. Turek, R. A. Reijo-Pera, *Stem Cells* **2009**, *27*, 138.
- [214] I. H. Park, R. Zhao, J. A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T. A. Ince, P. H. Lerou, M. W. Lensch, G. Q. Daley, *Nature* **2008**, *451*, 141.
- [215] K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, *Nature* **2007**, *448*, 313.
- [216] a) A. J. Bass, H. Watanabe, C. H. Mermel, S. Yu, S. Perner, R. G. Verhaak, S. Y. Kim, L. Wardwell, P. Tamayo, I. Gat-Viks, A. H. Ramos, M. S. Woo, B. A. Weir, G. Getz, R. Beroukhim, M. O'Kelly, A. Dutt, O. Rozenblatt-Rosen, P. Dziunycz, J. Komisarof, L. R. Chirieac, C. J. Lafargue, V. Scheble, T. Wilbertz, C. Ma, S. Rao, H. Nakagawa, D. B. Stairs, L. Lin, T. J. Giordano, P. Wagner, J. D. Minna, A. F. Gazdar, C. Q. Zhu, M. S. Brose, I. Ceconello, U. R. Jr, S. K. Marie, O. Dahl, R. A. Shivdasani, M. S. Tsao, M. A. Rubin, K. K. Wong, A. Regev, W. C. Hahn, D. G. Beer, A. K. Rustgi, M. Meyerson, *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1238; b) S. Gidekel, G. Pizov, Y. Bergman, E. Pikarsky, *Cancer Cell* **2003**, *4*, 361; c) K. Hochedlinger, Y. Yamada, C. Beard, R. Jaenisch, *Cell* **2005**, *121*, 465; d) K. W. Foster, Z. Liu, C. D. Nail, X. Li, T. J. Fitzgerald, S. K. Bailey, A. R. Frost, I. D. Loro, T. M. Townes, A. J. Paterson, J. E. Kudlow, S. M. Lobo-Ruppert, J. M. Ruppert, *Oncogene* **2005**, *24*, 1491; e) S. Adhikary, M. Eilers, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 635.
- [217] a) M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochiduki, N. Takizawa, S. Yamanaka, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 101; b) M. Wernig, A. Meissner, J. P. Cassady, R. Jaenisch, *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 10.
- [218] J. B. Kim, B. Greber, M. J. Arauzo-Bravo, J. Meyer, K. I. Park, H. Zaehres, H. R. Scholer, *Nature* **2009**, *461*, 649.
- [219] a) K. Kaji, K. Norrby, A. Paca, M. Mileikovsky, P. Mohseni, K. Woltjen, *Nature* **2009**, *458*, 771; b) F. Soldner, D. Hockemeyer, C. Beard, Q. Gao, G. W. Bell, E. G. Cook, G. Hargus, A. Blak, O. Cooper, M. Mitalipova, O. Isacson, R. Jaenisch, *Cell* **2009**, *136*, 964; c) K. Woltjen, I. P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hamalainen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H. K. Sung, A. Nagy, *Nature* **2009**, *458*, 766.
- [220] a) M. Stadtfeld, M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir, K. Hochedlinger, *Science* **2008**, *322*, 945; b) J. Yu, K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, Slukvin II, J. A. Thomson, *Science* **2009**, *324*, 797.
- [221] K. Okita, M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka, S. Yamanaka, *Science* **2008**, *322*, 949.
- [222] a) J. Staerk, M. M. Dawlaty, Q. Gao, D. Maetzel, J. Hanna, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Jaenisch, *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 20; b) T. Seki, S. Yuasa, M. Oda, T. Egashira, K. Yae, D. Kusumoto, H. Nakata, S. Tohyama, H. Hashimoto, M. Kodaira, Y. Okada, H. Seimiya, N. Fusaki, M. Hasegawa, K. Fukuda, *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 11; c) Y. H. Loh, O. Hartung, H. Li, C. Guo, J. M. Sahalie, P. D. Manos, A. Urbach, G. C. Heffner, M. Grskovic, F. Vigneault, M. W. Lensch, I. H. Park, S. Agarwal, G. M. Church, J. J. Collins, S. Irlon, G. Q. Daley, *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 15.
- [223] K. Hochedlinger, R. Jaenisch, *Nature* **2006**, *441*, 1061.
- [224] a) R. Bluelloch, Z. Wang, A. Meissner, S. Pollard, A. Smith, R. Jaenisch, *Stem Cells* **2006**, *24*, 2007; b) S. Kishigami, E. Mizutani, H. Ohta, T. Hikichi, N. V. Thuan, S. Wakayama, H. T. Bui, T. Wakayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *340*, 183; c) A. Rybouchkin, Y. Kato, Y. Tsunoda, *Biol. Reprod.* **2006**, *74*, 1083.
- [225] a) T. S. Mikkelsen, J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, E. S. Lander, A. Meissner, *Nature* **2008**, *454*, 49; b) M. Wernig, C. J. Lengner, J. Hanna, M. A. Lodato, E. Steine, R. Foreman, J. Staerk, S. Markoulaki, R. Jaenisch, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 916.
- [226] a) D. Huangfu, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, A. E. Chen, D. A. Melton, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 795; b) D. Huangfu, K. Osafune, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, S. Chen, W. Muhlestein, D. A. Melton, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1269; c) Y. Shi, J. T. Do, C. Despons, H. S. Hahm, H. R. Scholer, S. Ding, *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 525.
- [227] H. Hong, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, O. Kanagawa, M. Nakagawa, K. Okita, S. Yamanaka, *Nature* **2009**, *460*, 1132.
- [228] S. Parrinello, E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov, J. Campisi, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 741.
- [229] M. A. Esteban, T. Wang, B. Qin, Y. Yang, D. Qin, J. Cai, W. Li, Z. Weng, J. Chen, S. Ni, K. Chen, Y. Li, X. Liu, J. Xu, S. Zhang, F. Li, W. He, K. Labuda, Y. Song, A. Peterbauer, S. Wolbank, H. Redl, M. Zhong, D. Cai, L. Zeng, D. Pei, *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 71.
- [230] T. Brambrink, R. Foreman, G. G. Welstead, C. J. Lengner, M. Wernig, H. Suh, R. Jaenisch, *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 151.
- [231] a) I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, A. Smith, *Cell* **2003**, *113*, 643; b) K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka, *Cell* **2003**, *113*, 631.
- [232] a) N. Maherali, R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath, K. Hochedlinger, *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 55; b) M. Wernig, A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K.



- Hochedlinger, B. E. Bernstein, R. Jaenisch, *Nature* **2007**, *448*, 318.
- [233] C. A. Lyssiotis, R. K. Foreman, J. Staerk, M. Garcia, D. Mathur, S. Markoulaki, J. Hanna, L. L. Lairson, B. D. Charette, L. C. Bouchez, M. Bollong, C. Kunick, A. Brinker, C. Y. Cho, P. G. Schultz, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8912.
- [234] D. Plouffe, A. Brinker, C. McNamara, K. Henson, N. Kato, K. Kuhen, A. Nagle, F. Adrian, J. T. Matzen, P. Anderson, T. G. Nam, N. S. Gray, A. Chatterjee, J. Janes, S. F. Yan, R. Trager, J. S. Caldwell, P. G. Schultz, Y. Zhou, E. A. Winzeler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9059.
- [235] a) M. Knockaert, K. Wieking, S. Schmitt, M. Leost, K. M. Grant, J. C. Mottram, C. Kunick, L. Meijer, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25493; b) D. W. Zaharevitz, R. Gussio, M. Leost, A. M. Senderowicz, T. Lahusen, C. Kunick, L. Meijer, E. A. Sausville, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2566.
- [236] J. Hanna, S. Markoulaki, M. Mitalipova, A. W. Cheng, J. P. Cassidy, J. Staerk, B. W. Carey, C. J. Lengner, R. Foreman, J. Love, Q. Gao, J. Kim, R. Jaenisch, *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 513.
- [237] J. Staerk, C. A. Lyssiotis, R. Jaenisch, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [238] T. Lin, R. Ambasadhan, X. Yuan, W. Li, S. Hilcove, R. Abujarour, X. Lin, H. S. Hahm, E. Hao, A. Hayek, S. Ding, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 805.
- [239] a) F. B. Engel, M. Schebesta, M. T. Duong, G. Lu, S. Ren, J. B. Madwed, H. Jiang, Y. Wang, M. T. Keating, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1175; b) M. Teta, S. Y. Long, L. M. Wartschow, M. M. Rankin, J. A. Kushner, *Diabetes* **2005**, *54*, 2557.
- [240] R. Taub, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 836.
- [241] J. A. Parsons, A. Bartke, R. L. Sorenson, *Endocrinology* **1995**, *136*, 2013.
- [242] W. Rosamond, K. Flegal, G. Friday, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lloyd-Jones, M. McDermott, J. Meigs, C. Moy, G. Nichol, C. J. O'Donnell, V. Roger, J. Rumsfeld, P. Sorlie, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, Y. Hong, *Circulation* **2007**, *115*, e69.
- [243] R. Gianani, G. S. Eisenbarth, *Immunol. Rev.* **2005**, *204*, 232.
- [244] a) Y. Dor, J. Brown, O. I. Martinez, D. A. Melton, *Nature* **2004**, *429*, 41; b) K. S. Zaret, M. Grompe, *Science* **2008**, *322*, 1490.
- [245] A. Edvell, P. Lindstrom, *Endocrinology* **1999**, *140*, 778.
- [246] G. Xu, D. A. Stoffers, J. F. Habener, S. Bonner-Weir, *Diabetes* **1999**, *48*, 2270.
- [247] S. Efrat, D. Fusco-DeMane, H. Lemberg, O. al Emran, X. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3576.
- [248] W. Shen, M. S. Tremblay, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [249] M. Dean, T. Fojo, S. Bates, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 275.
- [250] P. B. Gupta, T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg, E. S. Lander, *Cell* **2009**, *138*, 645.
- [251] S. A. Mani, W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang, R. A. Weinberg, *Cell* **2008**, *133*, 704.
- [252] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57.
- [253] M. Simon, V. L. Grandage, D. C. Linch, A. Khwaja, *Oncogene* **2005**, *24*, 2410.
- [254] A. P. Weng, A. A. Ferrando, W. Lee, J. P. t. Morris, L. B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S. C. Blacklow, A. T. Look, J. C. Aster, *Science* **2004**, *306*, 269.
- [255] J. Taipale, P. A. Beachy, *Nature* **2001**, *411*, 349.
- [256] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 789.
- [257] A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi, *Cell* **2000**, *100*, 387.
- [258] a) A. M. Bleau, D. Hambardzumyan, T. Ozawa, E. I. Fomchenko, J. T. Huse, C. W. Brennan, E. C. Holland, *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 226; b) H. Korkaya, A. Paulson, E. Charafe-Jauffret, C. Ginestier, M. Brown, J. Dutcher, S. G. Clouthier, M. S. Wicha, *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000121.
- [259] X. Fan, W. Matsui, L. Khaki, D. Stearns, J. Chun, Y. M. Li, C. G. Eberhart, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7445.
- [260] D. Nowak, D. Stewart, H. P. Koeffler, *Blood* **2009**, *113*, 3655.
- [261] H. de Thé, C. Chomienne, M. Lanotte, L. Degos, A. Dejean, *Nature* **1990**, *347*, 558.
- [262] R. P. Warrell, Jr., H. de The, Z. Y. Wang, L. Degos, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 177.
- [263] a) A. L. Vescovi, R. Galli, B. A. Reynolds, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 425; b) S. M. Pollard, K. Yoshikawa, I. D. Clarke, D. Danovi, S. Stricker, R. Russell, J. Bayani, R. Head, M. Lee, M. Bernstein, J. A. Squire, A. Smith, P. Dirks, *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 568; c) C. D. Stiles, D. H. Rowitch, *Neuron* **2008**, *58*, 832.
- [264] P. Rajan, D. M. Panchision, L. F. Newell, R. D. McKay, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 911.
- [265] S. G. Piccirillo, B. A. Reynolds, N. Zanetti, G. Lamorte, E. Binda, G. Broggi, H. Brem, A. Olivi, F. Dimeco, A. L. Vescovi, *Nature* **2006**, *444*, 761.
- [266] T. Aguado, J. Palazuelos, K. Monory, N. Stella, B. Cravatt, B. Lutz, G. Marsicano, Z. Kokaia, M. Guzman, I. Galve-Roperh, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 1551.
- [267] T. Aguado, A. Carracedo, B. Julien, G. Velasco, G. Milman, R. Mechoulam, L. Alvarez, M. Guzman, I. Galve-Roperh, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 6854.
- [268] L. L. Lairson, H. Wurdak, P. G. Schultz, unveröffentlichte Ergebnisse.