

I. Die Generierung von künstlichen Keimzellen: Medizinische Aspekte

Eva Mall, Stefan Schlatt

1. Hintergrund zur Entwicklung der menschlichen Keimbahn

Grundlage der menschlichen Fortpflanzung sind Eizellen und Samenzellen, die übergreifend als Keimzellen (oder auch Gameten) bezeichnet werden. Die menschliche Keimbahn erfasst als Begriff wiederum verschiedene Stadien von Keimzellen, die in der Entwicklung von weiblichen und männlichen Individuen auftreten und deren Funktion die Weitergabe der genetischen Information von einer Generation zur nächsten ist.

Die Entwicklung menschlicher Keimzellen beginnt etwa in der dritten Schwangerschaftswoche mit dem Herausbilden (dem sogenannten ›Differenzieren‹) der primordialen Keimzellen (*primordial germ cells*, PGC). Diese Differenzierung der Keimzellen erfolgt in der Wand des Dottersacks in der Grenzregion von Mesoderm und Endoderm außerhalb des frühen Embryos. Aus Mesoderm-Zellen bilden sich später die inneren Organe, aus Endoderm-Zellen bildet sich wiederum die innere Endothelschicht. Primordiale Keimzellen wurden zuerst in den 1940er Jahren anhand morphologischer Kriterien, d. h. ihrer äußeren Erscheinung, beschrieben: Sie sind größer als die sie umgebenden somatischen Zellen und besitzen einen gut sichtbaren Nucleolus (Kernkörperchen des Zellkerns). Bis heute wurden zahlreiche Markergene und Markerproteine für primordiale Keimzellen beschrieben, mithilfe derer primordiale Keimzellen leicht detektiert werden können. Diese Zellen gelangen mittels aktiver und passiver Migration entlang des Hinterdarms des Embryos zur Keimbahnleiste. In dieser siedeln sie sich zwischen der vierten und sechsten Schwangerschaftswoche an. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Keimzellen noch sexuell undifferenziert. Das bedeutet, dass sich genetisch männ-

liche und weibliche Keimzellen bis hierhin nicht in Bezug auf ihre Morphologie oder Genexpression unterscheiden.

Nach Besiedlung der Keimbahnleiste beginnt etwa zu Beginn der siebten Schwangerschaftswoche die sexuelle Differenzierung der Gonaden, d. h. der Eierstöcke oder Hoden als derjenigen Organe, in denen sich Ei- bzw. Samenzellen herausbilden. Der gewöhnliche Verlauf (*default pathway*) der Gonadenentwicklung ist weiblich. Die männliche Gonadenentwicklung wird spezifisch induziert (ausgelöst) und verläuft wie folgt: Die Expression der Gene SRY und SOX9, die nur im Y-Chromosom des Mannes vorkommen, setzt eine Kaskade an Signalwegen und zellulären Differenzierungen in den somatischen Zellen der bis hierhin sexuell indifferenten Gonadenanlage in Gang. Diese Kaskade führt zunächst zur Bildung von Sertoli-Zellen (spezifische Epithelzellen in den Samenkanälchen des Hodens), welche durch Aggregation und Umlagerung Zellaggregate und anschließend Samenstränge ausbilden. Im Zusammenspiel mit weiteren somatischen Zellen werden kaskadenartig Prozesse initiiert, die eine Ausprägung der Gonade als Hoden zur Folge haben. Die in Samenkanälchen eingeschlossenen primordialen Keimzellen werden nun zu Gonozyten. Dies sind Keimzellen im Zentrum der immaturren Samenstränge, die zunächst eine weitgehende und langfristige Arretierung ihrer Entwicklung erfahren. Erst nach der Geburt entstehen testikuläre Stammzellen, die sogenannten Spermatogonien. Diese bilden eine Reservepopulation, aus der lebenslanger Nachschub für Vorläufer der Spermien rekrutiert werden kann. Im Kontrast zum Eierstock beginnt im Hoden die Spermatogenese, die Produktion von Spermien, und die meiotische Reifeteilung erst Jahre später im Anschluss an das Einsetzen der Pubertät.¹

Aufgrund der Abwesenheit der Gene SRY und SOX9 finden diese Prozesse in der Gonade der Frau nicht statt. Weibliche Keimzellen, die nach Erreichen der Gonadenanlage Oogonien genannt werden, vermehren sich bereits in der Gonadenanlage des frühen Embryos, wodurch mehrere Millionen Oogonien als große Klone entstehen. Diese vereinzeln und rekrutieren aus der Umgebung Zellen, die sich in Kontakt mit Oogonien zu Granulosazellen differenzieren. Die so entstandenen Primordialfollikel beginnen etwa in der zehnten Schwangerschaftswoche beim Menschen mit der meiotischen Teilung. Dieser Prozess wird in der Prophase unterbrochen, so dass ein

¹ Vgl. Sharma et al. 2019.

Pool von Primordialfollikeln entsteht, der unter physiologischen Bedingungen eine endliche Reserve von noch unreifen Eizellen darstellt. Fortgesetzt wird die Eizellreifung durch das Reaktivieren der Follikelreifung und das Initiieren der Meiose in der Eizelle erst in der Pubertät. Der Abschluss der Eizellreifung erfolgt erst mit der ersten Reifeteilung nach dem Eisprung und mit der zweiten Reifeteilung nach der Befruchtung.²

Frühe Stadien der Keimzellentwicklung sind *in vivo* im Menschen schwer zu untersuchen. Zugang zu Geweben in der Frühschwangerschaft ist aus ethischen und rechtlichen Gründen für systematische Forschung in Deutschland nicht möglich.³ Forschung an diesen Stadien wird daher in erster Linie an Tiermodellen (Fliege, Frosch, Zebrafisch, Nager) durchgeführt. Diese haben zwar viele Erkenntnisse zu grundlegenden Mechanismen ermöglicht, jedoch unterscheidet sich deren frühe Embryonalentwicklung signifikant von der menschlichen, wodurch viele Ergebnisse nur bedingt übertragbar sind. Primaten sind in ihrer Entwicklung dem Menschen deutlich näher, jedoch wird hier die Forschung aus anderen Gründen erschwert: Neben ethischen Bedenken haben Primaten eine lange Reproduktionszeit, eine geringe Anzahl von Nachkommen und genetische Manipulation ist bei ihnen nur schwer möglich, wodurch Untersuchungen deutlich zeitaufwändiger und teurer sind als an klassischen Modelltieren. Auch landwirtschaftliche Nutztiere wie Schweine und Rinder werden für das Untersuchen spezifischer Fragestellungen verwendet, die Ergebnisse derselben sind in ihrer Übertragbarkeit auf die menschliche Situation aber ebenfalls problematisch. Valide In-vitro-Modelle der menschlichen Keimbahnentwicklung werden daher dringend benötigt, um die grundlegenden Abläufe besser zu verstehen. Dies ist unter anderem wichtig, um krankhafte Veränderungen (Unfruchtbarkeit, embryonale Entwicklungsstörungen), die durch fehlerhafte Keimzellentwicklung entstehen, zu verstehen und gegebenenfalls therapeutische Interventionen zu entwickeln. Die Grundlage für valide In-vitro-Modelle bilden menschliche Stammzellen.

² Vgl. Leitch / Tang / Surani 2013.

³ Vgl. den Abschnitt 2.2 (»Stammzellgewinnung aus überzähligen Embryonen«) des zweiten Teils (Rechtliche Aspekte) des vorliegenden Sachstandsberichts.

2. Stammzellmodelle der Keimbahnentwicklung

Stammzellen sind definiert als Zellen, die sich einerseits im undifferenzierten Zustand vermehren können und andererseits in andere Zelltypen differenzieren können. Man unterscheidet je nach Potenz der Zellen zwischen uni-, multi-, pluri- oder totipotenten Stammzellen. Unipotente Stammzellen können sich in einen spezifischen Zelltyp differenzieren, multipotente Stammzellen können sich in verschiedene Linien, teils andere Stammzellen, teils direkt in somatische Zellen (wie zum Beispiel Haut- oder Muskelzellen) differenzieren. Uni- und multipotente Stammzellen finden sich in vielen Geweben des erwachsenen Körpers und werden daher auch als adulte Stammzellen zusammengefasst. Pluripotente Stammzellen können sich in alle Zelltypen des Körpers entwickeln, jedoch nicht in extra-embryonale Gewebe wie die embryonalen Anteile der Plazenta (Mutterkuchen) und des Amnions (Eihaut bei Wirbeltieren). Totipotente Zellen sind nur in der sehr frühen Embryonalentwicklung (von der befruchteten Eizelle bis zu den ersten Blastomerenstadien) zu finden. Diese können alle, sowohl embryonale als auch extraembryonale, Zelltypen bilden. Die Effizienz dazu nimmt aber bereits nach der ersten Teilung des Präimplantationsembryos (Zwei-Zell-Stadium) ab. In der normalen Entwicklung finden sich pluripotente Zellen nur in der inneren Zellmasse von Embryonen im Stadium der Blastozyste und in Keimzelltumoren, den sogenannten Teratomen.

In Gegenüberstellung mit diesen Arten von Stammzellen sind Keimzellen ein besonderer Zelltyp: Einerseits ist ihr Entwicklungspotenzial unipotent, da sie sich unter normalen *in vivo* Bedingungen nur in Gameten (Eizellen und Spermien) differenzieren. Andererseits haben primordiale Keimzellen ein Genexpressionsmuster, das nah an dem von pluripotenten Stammzellen liegt. Werden primordiale Keimzellen aus den Gonaden isoliert, können sie unter passenden Kulturbedingungen in pluripotente Zellen überführt werden, also in Zellen, die sich in alle Zelltypen des Körpers differenzieren können. Sie sind zudem der einzige Zelltyp, der mittels Zellkernverschmelzung bei der Befruchtung (also der Verschmelzung einer Eizelle mit einem Spermium) wieder eine totipotente Zelle bilden kann und dadurch die genetische Information an die nächste Generation weitergeben kann.

2.1 Pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen lassen sich *in vitro* (in der Kulturschale) unbegrenzt vermehren und sind in der Lage alle Zelltypen des Körpers, inklusive der Keimzellen, zu bilden. Bei kultivierten pluripotenten Stammzellen gibt es verschiedene Arten, die in erster Linie durch ihre Generierung unterschieden werden. Die ersten kultivierten pluripotenten Stammzellen wurden aus embryonalen Keimzelltumoren gewonnen (*embryonic cancer cells*, EC Zellen). Sie legten den Grundstock des Forschungszweiges, spielen aber heutzutage keine größere Rolle mehr. Der wichtigste Zelltyp sind embryonale Stammzellen (ES-Zellen). Sie werden aus der inneren Zellmasse eines Embryos gewonnen und sind bis heute am intensivsten charakterisiert worden. Da bei der Gewinnung dieser Stammzellen der Embryo zerstört wird, kann ihre Gewinnung als ethisch problematisch angesehen werden und wurde deshalb in einigen Ländern gesetzlich stark eingeschränkt. Das deutsche Embryonenschutzgesetz (ESchG) und Stammzellgesetz (StZG) erscheinen im internationalen Vergleich eher restriktiv angelegt: Forschung an befruchteten Embryonen und die Gewinnung von embryonalen Stammzellen sind in Deutschland verboten.⁴ Embryonale Stammzellen lassen sich auch nicht von den zu behandelnden Personen generieren, was für die Erforschung spezifischer klinischer Krankheitsbilder von Nachteil ist. Insbesondere bei komplexen genetischen Erkrankungen sind die Ursachen oft noch nicht verstanden und Stammzellen mit der entsprechenden Patient*innen-DNA wären hier hilfreich, um die Krankheit *in vitro* nachzustellen. Dieses Problem lässt sich umgehen, indem ES-Zellen durch nukleären Transfer gebildet werden. Dafür wird der Zellkern in einer gespendeten Eizelle durch den Zellkern einer somatischen Zelle eines anderen Menschen, zum Beispiel eines Patienten oder einer Patientin, ersetzt. Diese Eizelle kann dann über chemische Stimulation zur Teilung angeregt werden und bildet einen normalen, entwicklungsfähigen Präimplantationsembryo, der zur Gewinnung von ES-Zellen verwendet wird (nt-ES-Zellen). Diese Zellen haben dann die genetische Information der somatischen (Patient*innen-) Zelle einer zu behandelnden Person (dies wird auch als Klonen zu Forschungszwecken bezeichnet). Lediglich die mitochondriale DNA, also die genetische Information der

⁴ Vgl. Abschnitt 2 (»Allgemeiner regulatorischer Nachholbedarf mit Blick auf hiPS-Zellen?«) des zweiten Teils (Rechtliche Aspekte) des vorliegenden Sachstandsberichts.

Mitochondrien (die Kraftwerke der Zelle), kommt von der gespendeten Eizelle und stimmt nicht mit der der Patient*innen-DNA überein.⁵ Ethisch sind nt-ES-Zellen ähnlich problematisch wie ES-Zellen, da auch hier Präimplantationsembryonen eingesetzt und zerstört werden.

Die ethische Problematik wurde durch die Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) umgangen.⁶ Ein später mit dem Nobelpreis geehrtes japanisches Forschungsteam hat herausgefunden, dass sich jede Körperzelle durch die Überexpression von nur vier Transkriptionsfaktoren (Proteine, welche die Expression anderer Gene anregen) in einen pluripotenten Zustand reprogrammieren lässt.⁷ Neben dem offensichtlichen Vorteil, dass für diese Methode kein Embryo zerstört werden muss, ermöglicht dies außerdem eine flexible Generierung pluripotenter Zellen von Patient*innen, wodurch spezifische Modelle genetischer Erkrankungen generierbar sind. Von ihrer Genexpression her sind iPS-Zellen vergleichbar mit ES-Zellen, jedoch sind je nach Art der Re-Differenzierung und Ausgangszelle Unterschiede in der epigenetischen Regulierung detektierbar.

Epigenetik ist der Sammelterminus für alle Mechanismen, welche die Genexpression regulieren ohne den genetischen Code des Erbmaterials zu verwenden. Alle Zellen erhalten während der Differenzierung spezifische epigenetische Muster, die bei der Reprogrammierung zu iPS-Zellen teilweise nicht komplett entfernt werden, wodurch die anschließende Neu-Differenzierung der Zellen beeinträchtigt werden kann. Außerdem werden die für die Reprogrammierung notwendigen Transkriptionsfaktoren für gewöhnlich über Retroviren eingebracht, die diese in das Genom einbauen. Retroviren haben eine Tendenz, DNA in der Nähe von Proto-Onkogenen (Gene, deren Expression mit der Entwicklung von Krebs in Verbindung gebracht werden) zu integrieren, wodurch das Risiko besteht, dass sich die Zellen zu Krebszellen entwickeln. Um dies zu umgehen, werden vermehrt Vektoren (sogenannte Genfähren) verwendet, bei denen die Transkriptionsfaktoren nicht in die DNA eingebaut werden.⁸

⁵ Vgl. Lee / Kang 2019.

⁶ Vgl. Abschnitt 2 (»Einleitung«) des dritten Teils (Ethische Aspekte) des vorliegenden Sachstandsberichts.

⁷ Vgl. Takahashi et al. 2007.

⁸ Vgl. Hockemeyer / Jaenisch 2016.

In den letzten Jahren wurden andere Verfahren zur Herstellung von Zellen mit einer vermehrten Potenz *in vitro* beschrieben. Hier ist das Ziel Zellen zu generieren, deren Genexpression ähnlich ist wie im Zwei-Zell-Stadium, also nach der ersten Teilung der befruchteten Eizelle, so dass diese Zellen potentiell auch totipotente Eigenschaften haben.⁹ Diese Zellen ermöglichen wichtige Erkenntnisse für die Grundlagenforschung in Bezug auf die Eigenschaften totipotenter Zellen und der embryonalen Entwicklung, da sie sich auch in extra-embryonale Zellen entwickeln können. Jedoch spielen sie im Bereich der Keimzellforschung bisher eine untergeordnete Rolle.

Konventionell kultivierte humane pluripotente Stammzellen unterscheiden sich in mancher Hinsicht von pluripotenten Stammzellen aus der Maus, welche sich in einem sogenannten naiven Status befinden. Pluripotente Zellen der Maus besitzen ein Genexpressionsmuster und zellulären Entwicklungsstand, der nahe an den Zellen der inneren Zellmasse des Präimplantationsembryos liegt. Humane pluripotente Stammzellen entsprechen in ihrer Genexpression und den Signalkaskaden eher den Zellen des Postimplantationsembryos und werden als »primed« bezeichnet. Naive und *primed* pluripotente Zellen unterscheiden sich in ihrem Wachstum, den benötigten Wachstumsfaktoren und in ihrem Entwicklungspotential. Mehrere Publikationen haben in den letzten Jahren gezeigt, dass sich auch humane pluripotente Zellen über angepasste Kulturbedingungen zu einem noch stärker dem naiven Status entsprechenden Entwicklungsstand de-differenzieren lassen. Diese Zellen haben ein besseres Entwicklungspotential, sind aber unter Kulturbedingungen weniger stabil und neigen dazu, chromosomale Schäden anzuhäufen, wenn sie über einen längeren Zeitraum in diesen Medien kultiviert werden.¹⁰

Für die In-vitro-Gametogenese haben iPS-Zellen das größte Potential, relevante Ergebnisse für Patient*innen zu generieren und sind daher am weitesten verbreitet. Meist werden diese noch unter konventionellen Bedingungen kultiviert, die Verwendung angepasster Medien, um ihr Entwicklungspotential zu verbessern, wird aber vermehrt untersucht und wird vermutlich zukünftig mehr und mehr zum Standard werden.

⁹ Vgl. Riveiro / Brickmann 2020.

¹⁰ Vgl. De Los Angeles 2019.

2.2 Differenzierung pluripotenter Zellen zu primordialen Keimzellen

Pluripotente Stammzellen lassen sich mit verschiedenen Differenzierungsprotokollen zu Zellen entwickeln, die primordialen Keimzellen ähneln. Um die Effizienz zu erhöhen, werden die Zellen erst in einen plastischen Status gebracht, der die nächsten Schritte der Differenzierung vereinfacht. Dazu werden sie entweder für 48 Stunden in eine meso-endodermale Vorläuferzelle vordifferenziert oder über Zusätze im Kulturmedium in einen Status mit naiver pluripotenter Genexpression gebracht, also einem Muster der Genexpression, welches nahe an der Genexpression der inneren Zellmasse des frühen Präimplantationsembryos ist. Die so keimzellpermissiven Zellen werden dann mittels verschiedener Wachstumsfaktoren, wobei der wichtigste das sogenannte *bone morphogenic protein 4* (BMP4) ist, in Aggregaten zu frühen keimzellähnlichen Zellen (*primordial germ cell-like cells*, PGCLCs) differenziert. Diese Differenzierung dauert etwa vier bis acht Tage und die Zellen können mit einer Kombination von Oberflächenmarkern für weitere Analysen aus den Aggregaten isoliert werden. Die so generierten Zellen sind in ihrer Genexpression und ihren epigenetischen Mustern (Methylierung) sehr nah an den zu Beginn des Kapitels beschriebenen migrierenden, primordialen Keimzellen in dem sich entwickelnden Embryo (etwa 4.-6. Schwangerschaftswoche). Sie sind in diesem Zustand weder in die weibliche noch in die männliche Richtung determiniert.¹¹

Die Entwicklung dieser Differenzierungsprotokolle war ein wichtiger Fortschritt, um die frühe Keimzellentwicklung im Menschen zu untersuchen. Mit dieser Methode ließ sich zeigen, dass sich die Entwicklung in einigen wesentlichen Punkten von der Maus unterscheidet und in Bezug auf die Signalkaskaden in der frühen Spezifizierung andere Faktoren wichtig sind.¹² Es zeigte sich auch, dass die Entwicklung in anderen Modellorganismen, wie zum Beispiel in nicht-humanen Primaten oder Schweinen dem Menschen ähnlicher ist als die Entwicklung, die in Nagern zu beobachten ist.¹³ Diese primordialen keimzellähnlichen Zellen zeichnen sich durch die verbliebene Expression von Pluripotenzmarkern aus, die es ihnen ermög-

¹¹ Vgl. Irie et al. 2018.

¹² Vgl. Irie et al. 2015; Kojima et al. 2017.

¹³ Vgl. Kobayashi et al. 2017.

licht, sich relativ leicht mittels passender Kulturbedingungen in pluripotente Zellen zu wandeln und dabei auch die Fähigkeiten zurückzugewinnen, in verschiedene Zelltypen des Körpers zu differenzieren. Außerdem können diese Zellen über einen längeren Zeitraum vermehrt werden, was weitere Analysen dieser frühen Keimzell-Stadien ermöglicht.¹⁴ Allein sind diese Zellen jedoch nicht in der Lage, die weitere Gametogenese zu initiieren, da dafür (chemische und mechanische) Signale der umgebenden somatischen Gonadenzellen notwendig sind. Der nächste wichtige Schritt, um weitere Stadien der Gametogenese generieren zu können, besteht darin die somatische Nische nachzubilden, welche die verschiedenen relevanten Zelltypen der männlichen oder weiblichen Gonade enthält, notwendige Wachstumsfaktoren liefert sowie die korrekten dreidimensionalen Strukturen *in vitro* nachahmt.

2.3 In-vitro-Gametogenese

In der Maus ist es im Jahr 2012 erstmals gelungen, befruchtungsfähige Eizellen aus pluripotenten Stammzellen zu generieren. Hierzu wurden die Stammzellen zuerst in Richtung primordialer Keimzellen (PGCLCs) differenziert und dann mit fetalen Ovarzellen (in erster Linie Granulosa-Zellen) kultiviert. Die Keimzellen erfahren damit eine somatische Umgebung von unreifem Eierstockgewebe. Diese Co-Kultivierung induziert eine somatische Nische für die weitere, dann geschlechtsspezifische und hier weibliche Entwicklung der Keimzellen. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen wurde durch die Zugabe verschiedener, zeitlich abgestimmter Wachstumsfaktoren die weibliche Spezifizierung der Keimzellen induziert. Um die Genese von Eizellen (Oogenese) zu initiieren, wurden mittels der Co-Kultur Organoide (Zellaggregate, die die In-vivo-Organstruktur *in vitro* widerspiegeln) erzeugt, die anschließend unter die Haut von Mäusen transplantiert werden. Als transplanterter *Graft* durchlaufen die Gewebe eine Weiterentwicklung zum Ovar (Eierstock). Die Keimzellen durchlaufen ihre Entwicklung bis zu befruchtungsfähigen Eizellen. Die Organoid-Grafts werden über einwachsende Blutgefäße versorgt und konnten sich so zu funktionsfähigen Ovarien entwickeln. Die transplantierten Gewebe unterstützen die Follikelreifung und die

¹⁴ Vgl. Murase et al. 2020.

darin entstehenden Eizellen können dann nach Reifung entnommen und mittels In-vitro-Verfahren befruchtet und ausgetragen werden. Dies führte zur Gewinnung lebender und fertiler Mäuse.¹⁵ Das System wurde dann durch Anpassung der Kulturbedingungen so weiterentwickelt, dass der Transplantationsschritt entfallen konnte und alle Schritte in der Kulturschale stattfinden konnten.¹⁶ Auch für die männlichen Keimzellen wurde ein entsprechendes Kultursystem entwickelt, in dem *in vitro* spermatogoniale Stammzellen generiert wurden, die nach Transplantation in Maushoden die weitere Spermatogenese durchlaufen und in der Lage sind, fruchtbare Nachkommen zu zeugen.¹⁷

In den letzten Jahren gab es erste Berichte über die Generierung von Vorläuferzellen von Keimzellen (Oogonien und Spermatogonien) aus humanen pluripotenten Stammzellen.¹⁸ Ähnlich wie im Maussystem wurden pluripotente Zellen zuerst in Richtung primordialer Keimzellen differenziert und dann mit fetalen Ovar- beziehungsweise Hodenzellen der Maus co-kultiviert. In beiden Fällen konnte eine geschlechtstypische Genexpression detektiert werden und auch die epigenetischen Veränderungen waren ähnlich zu den in der Fetalentwicklung beobachteten Veränderungen. Inwieweit diese Zellen in der Lage sind, sich zu befruchtungsfähigen Keimzellen weiterzuentwickeln und ob vor allem die epigenetischen Anlagen korrekt über den kompletten Zyklus erhalten bleiben, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Ein limitierender Faktor diesbezüglich ist die Verwendung von somatischen Zellen aus der Maus. Auch wenn viele Mechanismen der Keimzellreifung zwischen den Spezies konserviert sind, gibt es einige bekannte, aber auch noch nicht untersuchte Unterschiede, die die vollständige Gametogenese behindern können. Durch Transplantationsversuche konnte gezeigt werden, dass Keimzellen von Primaten zwar prinzipiell im Maushoden überleben und auch die richtigen Nischen besetzen, sie jedoch keine vollständige Spermatogenese durchlaufen.¹⁹ Daher brauchen wir weitere Forschungsmodelle, in denen die Interaktion der Keimzellen mit somatischen Nischen untersucht werden kann. Dies lässt sich zum Beispiel durch die Co-Kultur

¹⁵ Vgl. Hayashi et al. 2012.

¹⁶ Vgl. Hikabe et al. 2016.

¹⁷ Vgl. Ishikura et al. 2016.

¹⁸ Vgl. Yamashiro et al. 2018; Yamashiro et al. 2020; Hwang et al. 2020.

¹⁹ Vgl. Sosa et al. 2018.

von humanen, *in vitro* generierten primordialen Keimzellen mit testikulären Zellen von Ratten in einem standardisierten Kultursystem untersuchen. In einem solchen System könnte eine Interaktion der Keimzellen mit dem somatischen Gewebe kontinuierlich beobachtet werden.²⁰

Um die Interspezies-Problematik zu umgehen, könnten Co-Kulturen mit humanem Gewebe eine Lösung sein. Es ist aber weder ethisch, rechtlich noch technisch möglich, ausreichend fetales Gewebe der passenden Entwicklungsstufe (etwa siebte Schwangerschaftswoche) für Forschungszwecke zu generieren, wodurch eine direkte Adaption der Mausversuche nicht möglich ist. Ethisch, rechtlich und technisch steht dem entgegen, dass diese Art von Gewebe aus humanen Embryonen gewonnen würde, die hierfür zerstört werden müssten. Da humane Embryonen i. d. R. einem besonderen Schutz unterliegen und hierfür weder in großer Zahl produziert noch für eine Weiterverwendung aus anderen Quellen zur Verfügung stehen, ist nur wenig Gewebe dieser Art für Forschungsvorhaben verfügbar.²¹ Eine Alternative ist die Verwendung von adultem Gewebe, was durch die Verwendung von Hoden, die bei geschlechtsanpassenden Operationen von Transfrauen entnommen werden, möglich ist. Diese dadurch gewonnenen somatischen Zellen können *in vitro* kultiviert werden und sind in der Lage, nach Vereinzelung wieder tubuläre Strukturen zu bilden.²² Jedoch unterscheiden sich adulte somatische Zellen von den fetalen Zellen in ihrem Reifegrad und der Signaltransduktion, also in der Weiterleitung von Signalen innerhalb einer Zelle und zwischen Zellen. Deshalb ist unklar, inwieweit sie in der Lage sind, die sehr frühen Stadien, die man bei der Stammzelldifferenzierung initial generiert, zu unterstützen.

Eine weitere Option besteht darin, nicht nur die Keimzellen, sondern auch die somatische Umgebung, welche die notwendigen biochemischen und mechanischen Signale für die geschlechtsspezifische Differenzierung zu Spermien und Eizellen ermöglicht, direkt aus pluripotenten Stammzellen zu differenzieren. Dadurch haben alle verwendeten Zellen denselben fetalen Reifungsgrad und können in der gemeinsamen Co-Kultur entsprechend der fetalen Entwicklung weiter differenziert werden. Verschiedene Zelltypen, die in einem

²⁰ Vgl. Mall et al. 2020.

²¹ Vgl. Abschnitt 2 (»Allgemeiner regulatorischer Nachholbedarf mit Blick auf hiPS-Zellen?«) des zweiten Teils (Rechtliche Aspekte) des vorliegenden Sachstandsberichts.

²² Vgl. Alves-Lopes / Stukenborg 2018; Mincheva et al. 2018; Mincheva et al. 2020.

Gewebe benötigt werden, einzeln zu generieren und dann in Co-Kulturen zu komplexen Organoiden zusammenzuführen, hat sich in anderen Organsystemen schon als vielversprechender Ansatz bewährt.²³ Erste Publikationen beschreiben eine Differenzierung *in vitro* von Sertoli-ähnlichen Zellen.²⁴ Bisher gibt es jedoch keine Berichte über erfolgreiche Co-Kulturen mit humanen Keimzellen.

Testikuläre somatische Zellen können sich *in vitro* autark zu hodenähnlichen Strukturen zusammenfinden und verhalten sich ähnlich wie fetale Hodenzellen. Es wurden jedoch noch keine Kulturmethoden gefunden, die eine vollständige Spermatogenese *in vitro* ermöglichen. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass die Spermatogenese noch stärker von der somatischen Umgebung abhängt als die Oogenese und zusätzlich physiologisch zu einem späteren Entwicklungsstadium, nämlich erst in der Pubertät, stattfindet. Daher benötigen die somatischen Zellen einen stärkeren Reifungsgrad, der bisher noch nicht erlangt oder erhalten werden konnte. Insbesondere Sertoli-Zellen, die »nursing«-Zellen, welche Keimzellen mit wichtigen, entwicklungsangepassten Signalmolekülen und Nährstoffen versorgen, verändern schon nach kurzer Kulturzeit ihre Genexpression und erlangen in den bisherigen Verfahren nicht die notwendige Reife, um eine vollständige Spermatogenese zu initiieren. Es erscheint daher von größter Bedeutung geeignete Kulturbedingungen für die verschiedenen somatischen Zelltypen zu finden.

3. Potentielle Probleme der In-vitro-Gametogenese

Nach momentanem Stand der Forschung ist es möglich, Vorläufer von humanen Gameten, sowohl von Eizellen als auch von Spermien, aus pluripotenten Stammzellen zu generieren. Bisher ist es zwar noch nicht gelungen, befruchtungsfähige menschliche Gameten *in vitro* zu erzeugen, aber da dies im Mausmodell schon gelungen ist, ist es nur eine Frage der Zeit, dass auch diese Techniken für humane Zellen zur Verfügung stehen. Hierbei werden in erster Linie In-vitro-Co-Kulturen mit somatischen Zellen anderer Spezies angewandt, um die notwendige Spezifizierung einzuleiten. Außerdem werden humane Keimzellvorläufer (wie PGCLCs) in Gonaden von Mäusen transplan-

²³ Vgl. Monsanto et al. 2020.

²⁴ Vgl. Rodríguez Gutiérrez / Eid / Biason-Lauber 2018.

tiert, um die Gametogenese zu initiieren. Dies erfolgt insbesondere in Hoden, da diese leichter zugänglich sind als Ovarien. Die erfolgreiche Gametogenese wäre ein wichtiger Schritt für die Grundlagenforschung, da dies die humane Keimzellentwicklung besser zugänglich macht und damit auch die Erforschung der relevanten Schritte und assoziierter Erkrankungen ermöglicht. Dadurch lassen sich frühe Probleme, die zur Unfruchtbarkeit führen können, besser untersuchen. Insbesondere das Sertoli-Cell-Only-Syndrom, also die vollständige Abwesenheit von Keimzellen im Hoden, liegt vermutlich in einer Störung der frühen Gametogenese begründet und ließe sich mit diesen Methoden weiter erforschen. Auch präpubertäre Krebspatienten, die zum Zeitpunkt der Behandlung noch keine Spermatogenese haben, bekämen mit diesen Methoden die Option auf eine spätere biologische Vaterschaft. Die Vorläuferzellen von Spermien, die mittels Kryokonservierung eingelagert werden (da eine Krebstherapie die Fruchtbarkeit langfristig stören kann), könnten dann zu einem späteren Zeitpunkt mit den in der Grundlagenforschung entwickelten Kultur- oder Transplantationsmethoden die Fruchtbarkeit wiederherstellen. Die In-vitro-Gametogenese eröffnet theoretisch auch die Möglichkeit, Unfruchtbarkeit mittels Zelltherapie zu behandeln. Neben den rechtlichen und ethischen Fragen gibt es hier auch biologische Problematiken zu beachten.²⁵

Zuerst ist es wichtig, die volle Entwicklungsfähigkeit der Zellen genau zu überprüfen. Die Differenzierung *in vitro* verläuft deutlich schneller als dies im Menschen normalerweise der Fall ist. Es bleibt daher zu beweisen, dass die generierten Zellen funktionell tatsächlich ihrem Gegenpart *in vivo* entsprechen und die ähnliche Genexpression nicht ein Artefakt *in vitro* ist. Im Tiermodell kann dieser Aspekt durch die Generierung von fruchtbarem und gesundem Nachwuchs überprüft werden. Eine Anwendung am Menschen ist jedoch sowohl aufgrund der ethisch-rechtlichen Problematik als auch auf Grund des sehr langen Reproduktionszyklus noch nicht möglich und sinnvoll. Es ist aber durchaus denkbar, dass nach weiterer präklinischer Forschung und dann möglicher Risikoabwägung eine Verwendung von *in vitro* erzeugten Gameten sinnvoll wird.

Ein wichtiges Merkmal von Keimzellen ist ihr epigenetisches Muster. Während ihrer Entwicklung erneuern sie fast vollständig ihre

²⁵ Vgl. zu den erstgenannten den zweiten und dritten Teil (Rechtliche Aspekte, Ethische Aspekte) des vorliegenden Sachstandsberichts.

Methylierungsmuster, was ein hoch komplexer und streng regulierter Vorgang ist. Ob dieser Prozess *in vitro* korrekt abläuft, muss noch gezeigt werden. Außerdem kann die Kultivierung der pluripotenten Stammzellen auch einen Einfluss auf die Methylierung haben. Insbesondere Kulturmedien, die die Kultivierung der Zellen in einen naiven, Keimzell-permissiven Status bringt, führen zu einer vermehrten Demethylierung des Genoms, die nicht dem physiologischen Muster entspricht. Dies hat zusätzlich den Effekt, dass das Genom instabiler wird und die Zellen chromosomale Schäden anhäufen können. Unabhängig von der Methylierung kann eine längere In-vitro-Kultur zur Anhäufung von Mutationen im Genom führen. Daher ist eine rigorose Qualitätskontrolle auf genetischer und epigenetischer Ebene sowohl bei den Ausgangszellen als auch bei generierten Gameten unabdingbar.

Im Hinblick auf die natürliche Selektion von Keimzellen gibt es nur sehr wenige Daten. Spermatogoniale Stammzellen reagieren hochsensibel auf Noxen. Noxen sind Stoffe oder Umstände, die eine schädigende Wirkung ausüben. Die Prozesse der Selektion von auf DNA-Ebene geschädigten Keimzellen sind weitgehend unverstanden. Allerdings führt diese hohe Selektion auf der Stufe der Vorläuferzellen dazu, dass nach Bestrahlung oder Chemotherapie nur sehr geringe Mutationsraten in Spermien (und erzeugten Nachkommen) zu beobachten sind. Eine biologische Vaterschaft ohne erhöhtes Risiko genetisch bedingter Fehlbildungen ist nach einer spontanen Erholung der Spermatogenese in Männern (z. B. nach Chemo- oder Strahlungs-therapien) nur möglich, weil diese natürlichen Selektionsmechanismen in den Stammzellen existieren und nur solche Klone differenzieren, die wenige oder keine Schäden aufweisen.²⁶ Diese Mechanismen besser zu verstehen wäre eine wichtige Aufgabe der zukünftigen Forschung an Keimzellen. Weiterhin sicher zu stellen, dass diese Kontroll- und Selektionsmechanismen auch bei *in vitro* generierten Keimzellen funktionieren, erscheint eine Voraussetzung für die Anwendung der In-vitro-Gametogenese, wenn damit gesunde Menschen entstehen sollen.²⁷

²⁶ Vgl. Sharma et al. 2019.

²⁷ Vgl. Abschnitt 4 (»Forschungsethische Aspekte«) des dritten Teils (Ethische Aspekte) des vorliegenden Sachstandsberichts.

Die Entwicklung von einfachen Tools zur Genomeditierung, wie zum Beispiel dem CRISPR/Cas System,²⁸ haben die Hoffnung geweckt, genetische Erkrankungen heilen zu können. In Kombination mit In-vitro-Gametogenese eröffnet sich die Option, diese in den nachfolgenden Generationen zu eradizieren, indem krankheitsverursachende Mutationen vorher editiert werden und dadurch nicht an die nächste Generation vererbt werden können. Aber so groß die Möglichkeiten dieser Technologie sind, so groß sind auch die Risiken. Potentielle unerwartete Effekte aus der Editierung oder unentdeckte Off-target-Mutationen könnten potentiell erst in späteren Generationen entdeckt werden und dabei im Zweifel größeren Schaden anrichten als die behandelte Mutation. Daher sind Genomeditierungen, die die Keimbahn betreffen, Qualitätskontrollen und tiefgehende Untersuchungen der potentiellen Effekte von noch größerer Bedeutung als bei Anwendungen, die eine lebensverlängernde Behandlung einer individuellen Person betreffen. Daher muss die Forschung sowohl für die In-vitro-Gametogenese als auch für transgenerationale Genomeditierung valide Methoden entwickeln, die eine reelle Risikoabschätzung ermöglichen.

Zum momentanen Zeitpunkt ist die In-vitro-Gametogenese in erster Linie ein wichtiges Tool für die Grundlagenforschung: Zum einen, da es noch viele ungelöste technische Probleme mit der vollständigen Differenzierung von Keimzellen gibt, und zum anderen, da es auch einige ethische und rechtliche Bedenken zum Einsatz von *in vitro* generierten Keimzellen in der klinischen Forschung gibt. Bei einigen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel dem Sertoli-Cell-Only-Syndrom oder bei Unfruchtbarkeit durch Chemotherapien in der Kindheit, könnten die In-vitro-Gametogenese eine biologische Elternschaft ermöglichen. Wie jedoch schon im vorherigen Abschnitt zur Genomeditierung ausgeführt, ist eine rigorose Qualitätskontrolle von allergrößter Relevanz, da jeder Eingriff in Keimbahnzellen auch nachfolgende Generationen betrifft. Hier ist es nicht nur wichtig biologische oder medizinische Nebenwirkungen der direkten Behandlung auszuschließen oder zu minimieren. Auch Effekte, die erst in späteren Generationen auftreten können, müssen mit größter Sicherheit verhindert werden können. Methoden, dies mit Testungen *in vitro* sicherzustellen, müssen erst im Tiermodell entwickelt und getestet

²⁸ Vgl. Charpentier / Doudna 2019.

werden, bevor über einen Einsatz beim Menschen ernsthaft nachgedacht werden kann.

4. Fazit

Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung ist die Generierung von frühen menschlichen Keimzell-Vorläufern möglich und die weitere Reifung zu Spermien und Eizellen in greifbarer Nähe. Die größten Hürden bestehen momentan darin, die Rolle der somatischen Nische in ausreichendem Maße zu verstehen, um die Reifungsschritte entsprechend steuern zu können und die resultierenden Keimzellen qualitativ beurteilen zu können.

Hier ist auch die Entwicklung genereller Qualitätskriterien von höchstmöglicher Relevanz, die labor- und länderübergreifend anerkannt sein müssen. Länderübergreifend werden verbindliche ethisch-rechtliche Regularien benötigt, die einerseits die Forschung in diesem höchst relevanten Feld erlauben, andererseits den Missbrauch verhindern. Hier gilt es insbesondere zu verhindern, dass Anwendungen zu früh Eingang in die Klinik finden, bevor mögliche Risiken ausreichend untersucht wurden.

Literaturverzeichnis

- Alves-Lopes, J. P. P. / Stukenborg, J.-B. B. (2018): Testicular organoids: a new model to study the testicular microenvironment in vitro? In: Human reproduction update 24, 176–191. DOI 10.1093/humupd/dmx036
- Charpentier, E. / Doudna, J. A. (2013): Biotechnology. Rewriting a genome. In: Nature 495 (7439), 50–51. DOI 10.1038/495050a
- De Los Angeles, A. (2019): The pluripotency continuum and interspecies chimeras. In: Current protocols in stem cell biology 50, e87. DOI 10.1002/cpsc.87
- Hayashi, K. / Ogushi, S. / Kurimoto, K. / Shimamoto, S. / Ohta, H. / Saitou, M. (2012): Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. In: Science 338 (6109), 971–975. DOI 10.1126/science.1226889
- Hikabe, O. / Hamazaki, N. / Nagamatsu, G. / Obata, Y. / Hirao, Y. / Hamada, N. / Shimamoto, S. / Imamura, T. / Nakashima, K. / Saitou, M. / Hayashi, K. (2016): Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. In: Nature 539 (7628), 299–303. DOI 10.1038/nature20104

- Hockemeyer, D. / Jaenisch, R. (2016): Induced pluripotent stem cells meet genome editing. In: *Cell stem cell* 18 (5), 573–586. DOI 10.1016/j.stem.2016.04.013
- Hwang, Y. S. / Suzuki, S. / Seita, Y. / Ito, J. / Sakata, Y. / Aso, H. / Sato, K. / Hermann, B. P. / Sasaki, K. (2020): Reconstitution of prospermatogonial specification in vitro from human induced pluripotent stem cells. In: *Nature Communications* 11 (1), 5656. DOI 10.1038/s41467-020-19350-3
- Irie, N. / Sybirna, A. / Surani, M. A. (2018): What can stem cell models tell us about human germ cell biology? In: *Current topics in developmental biology* 129, 25–65. DOI 10.1016/bs.ctdb.2018.02.010
- Irie, N. / Weinberger, L. / Tang, W. / Kobayashi, T. / Viukov, S. / Manor, Y. S. / Dietmann, S. / Hanna, J. H. / Surani, A. M. (2015): SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. In: *Cell* 160 (1–2), 253–268. DOI 10.1016/j.cell.2014.12.013
- Ishikura, Y. / Yabuta, Y. / Ohta, H. / Hayashi, K. / Nakamura, T. / Okamoto, I. / Yamamoto, T. / Kurimoto, K. / Shirane, K. / Sasaki, H. / Saitou, M. (2016): In vitro derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells. In: *Cell Reports* 17 (10), 2789–2804. DOI 10.1016/j.celrep.2016.11.026
- Kobayashi, T. / Zhang, H. / Tang, W. W. C. / Irie, N. / Withey, S. / Klisch, D. / Sybirna, A. / Dietmann, S. / Contreras, D. A. / Webb, R. / Allegrucci, C. / Alberio, R. / Surani, A. M. (2017): Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. In: *Nature* 546 (7658), 416–420. DOI 10.1038/nature22812
- Kojima, Y. / Sasaki, K. / Yokobayashi, S. / Sakai, Y. / Nakamura, T. / Yabuta, Y. / Nakaki, F. / Nagaoka, S. / Woltjen, K. / Hotta, A. / Yamamoto, T. / Saitou, M. (2017): Evolutionarily distinctive transcriptional and signaling programs drive human germ cell lineage specification from pluripotent stem cells. In: *Cell Stem Cell* 21 (4), 517–532 e515. DOI 10.1016/j.stem.2017.09.005
- Lee, Y. / Kang, E. (2019): Stem cells and reproduction. In: *BMB Reports* 52, 482–489. DOI 10.5483/BMBRep.2019.52.8.141
- Leitch, H. G. / Tang, W. W. C. / Surani, A. M. (2013): Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals. In: *Current topics in developmental biology* 104, 149–187. DOI 10.1016/b978-0-12-416027-9.00005-x
- Mall, E. M. / Rotte, N. / Yoon, J. / Sandhowe-Klaverkamp, R. / Röpke, A. / Wistuba, J. / Hübner, K. / Schöler, H. R. / Schlatt, S. (2020): A novel xeno-organoid approach: exploring the crosstalk between human iPSC-derived PGC-like and rat testicular cells. In: *Molecular Human Reproduction* 26 (12), 879–893. DOI 10.1093/molehr/gaaa067
- Mincheva, M. / Sandhowe-Klaverkamp, R. / Wistuba, J. / Redmann, K. / Stukenborg, J. B. B. / Kliesch, S. / Schlatt, S. (2018): Reassembly of adult human testicular cells: can testis cord-like structures be created in vitro? In: *Molecular human reproduction* 24 (2), 55–63. DOI 10.1093/molehr/gax063

- Mincheva, M. / Wistuba, J. / Brenker, C. / Schlatt, S. (2020): Challenging human somatic testicular cell reassembly by protein kinase inhibition -setting up a functional in vitro test system. In: *Sci Rep-uk* 10 (1), 8935. DOI 10.1038/s41598-020-65924-y
- Monsanto, M. M. / Wang, B. J. / Ehrenberg, Z. R. / Echeagaray, O. / White, K. S. / Alvarez, R. / Fisher, K. / Sengphanith, S. / Muliono, A. / Gude, N. A. / Sussman, M. A. (2020): Enhancing myocardial repair with CardioClusters. In: *Nature Communications* 11 (1), 3955. DOI 10.1038/s41467-020-17742-z
- Murase, Y. / Yabuta, Y. / Ohta, H. / Yamashiro, C. / Nakamura, T. / Yamamoto, T. / Saitou, M. (2020): Long-term expansion with germline potential of human primordial germ cell-like cells in vitro. In: *Embo J* 39 (21), e104929. DOI 10.15252/embj.2020104929
- Riveiro, A. R. / Brickman, J. M. (2020): From pluripotency to totipotency: an experimentalist's guide to cellular potency. In: *Development* 147 (16), dev189845. DOI 10.1242/dev.189845
- Rodríguez Gutiérrez, D. / Eid, W. / Biason-Lauber, A. (2018): A human gonadal cell model from induced pluripotent stem cells. In: *Frontiers in genetics* 9, 498. DOI 10.3389/fgene.2018.00498
- Sharma, S. / Wistuba, J. / Pock, T. / Schlatt, S. / Neuhaus, N. (2019): Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. In: *Human reproduction update* 25 (3), 275–297. DOI 10.1093/humupd/dmz006
- Sosa, E. / Chen, D. / Rojas, E. J. / Hennebold, J. D. / Peters, K. A. / Wu, Z. / Lam, T. N. / Mitchell, J. M. / Sukhwani, M. / Taylor, R. C. / Meistrich, M. L. / Orwig, K. E. / Shetty, G. / Clark, A. T. (2018): Differentiation of primate primordial germ cell-like cells following transplantation into the adult gonadal niche. In: *Nature communications* 9 (1), 5339. DOI 10.1038/s41467-018-07740-7
- Takahashi, K. / Okita, K. / Nakagawa, M. / Yamanaka, S. (2007): Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. In: *Nature protocols* 2 (12), 3081–3089. DOI 10.1038/nprot.2007.418
- Yamashiro, C. / Sasaki, K. / Yokobayashi, S. / Kojima, Y. / Saitou, M. (2020): Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture. In: *Nature Protocols*, 1–24. DOI 10.1038/s41596-020-0297-5
- Yamashiro, C. / Sasaki, K. / Yabuta, Y. / Kojima, Y. / Nakamura, T. / Okamoto, I. / Yokobayashi, S. / Murase, Y. / Ishikura, Y. / Shirane, K. / Sasaki, H. / Yamamoto, T. / Saitou, M. (2018): Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. In: *Science*, 362, 356–360. DOI 10.1126/science.aat1674