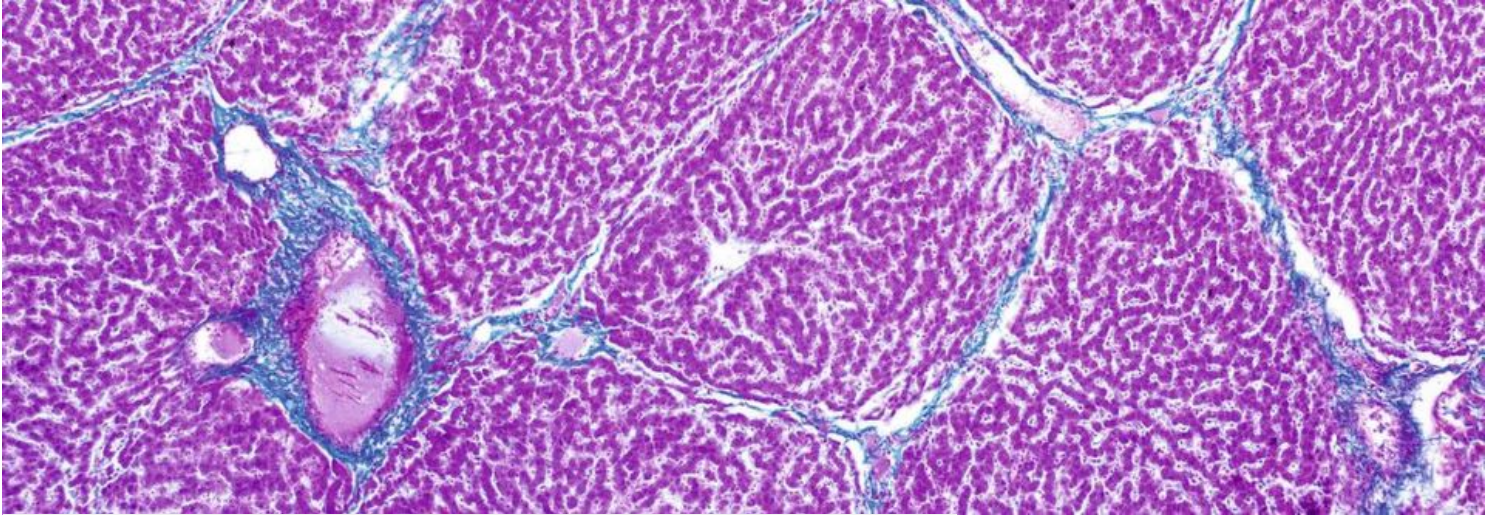


Der Mensch zum Selberbauen?

Möglichkeiten und Grenzen Stammzell-basierter Testverfahren in der Wirkstoffforschung

06.08.19 | Autor / Redakteur: Prof. Dr. Jan G. Hengstler*, Wiebke Albrecht*, Tim Brecklinghaus*, David Feuerborn*, Patrick Nell*, Anna Cherianidou**, Dr. Karolina Edlund*, Prof. Dr. Agapios Sachinidis** / [Dr. Ilka Ottleben](#)



Menschliche Leberzellen und der Mikroskop (Symbolbild)(Bild: ©sinhyu - stock.adobe.com)

Stammzellen bieten großes Potenzial, auch für die Pharmaforschung. Nicht zuletzt ließen sich durch den Einsatz Stammzell-basierter Testverfahren die Anzahl von Tierversuchen reduzieren. Noch haben solche Tests Limitationen. Doch warum ist das so und lassen sie sich überwinden?

Stammzellen sind besonders und sie sind begehrt. Denn – im Prinzip kann aus Stammzellen jeder Zelltyp des menschlichen Körpers hergestellt werden. Das eröffnet vielfältige Möglichkeiten. Im Bereich der Pharmakologie und Toxikologie könnten Medikamente an diesen Zellen auf Wirksamkeit und Sicherheit getestet werden. Trotzdem werden stammzellbasierte Testverfahren noch nicht in größerem Umfang in der Routine eingesetzt. Welche Probleme müssen noch überwunden werden?

Sichere Medikamente?

Wann ein Medikament als sicher einzustufen ist, weiß man mit letzter Verbindlichkeit erst dann, wenn viele Patienten eine spezielle Therapie erhalten haben. Die Herausforderung für Toxikologen besteht jedoch darin, eine giftige Wirkung schon zu erkennen, bevor Menschen zu Schaden gekommen sind. Bei dieser Beurteilung geht es i.d.R. nicht um die Frage, ob eine Substanz grundsätzlich giftig ist oder nicht. Vielmehr ist es entscheidend, ob bei einer bestimmten Dosis der Substanz schädliche Wirkungen auftreten. Denn auch scheinbar harmlose Substanzen wie Zucker oder Wasser wären schädlich oder sogar tödlich, wenn extrem hohe Dosen aufgenommen würden. Bei Medikamenten interessiert daher die Frage, ob die therapeutische Dosis harmlos oder toxisch ist; bei Chemikalien interessiert die Dosis, welche wir im Alltag z.B. durch Lebensmittel aufnehmen können, ohne dass es zu schädlichen Wirkungen kommt.

Tierversuch vs. Kulturschale

Herkömmlicherweise verabreicht man Prüfsubstanzen an Tiere, meist Mäuse oder Ratten. Von Interesse ist die höchste Dosis, die gerade noch keine schädlichen Effekte

auslöst. Diese sollte viel höher sein, als die im Menschen einzusetzende Dosis. Eine Einschränkung von Tierversuchen sind die Interspezies-Unterschiede; Zellen verschiedener Arten sprechen manchmal unterschiedlich auf Chemikalien an. Doch sobald ein Wirkmechanismus aufgeklärt ist, kann verglichen werden, ob er in menschlichen Zellen in ähnlicher Weise auftritt wie im Versuchstier.

Tests in der Kulturschale haben den Vorteil, dass menschliche Zellen eingesetzt werden können – somit entfällt das Problem der Interspeziesunterschiede und die Notwendigkeit von Tierversuchen wird verringert. Es bleibt die Herausforderung der Pharmakokinetik: Ein Organismus nimmt eine Substanz auf, sie gelangt ins Blut und zu den Zellen, in welchen Toxizität ausgelöst werden kann; gleichzeitig wird die Substanz wieder über Urin und Stuhl ausgeschieden. In der Kulturschale findet Derartiges nicht statt. Daher ist man auf Rechenmodelle angewiesen, um einen Bezug zwischen einer experimentell eingestellten Konzentration im Kulturmedium und einer vom Organismus aufgenommenen Dosis herzustellen.

Trotz dieser Einschränkungen haben Tests in der Kulturschale wichtige Fortschritte ermöglicht. Falls z.B. eine bestimmte Konzentration eines in Entwicklung befindlichen Medikaments im Blut benötigt wird, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, diese Konzentration jedoch kultivierte menschliche Leberzellen schädigt, dann erscheint die weitere Entwicklung dieser Substanz als Medikament sinnlos und Tierversuche können so vermieden werden. Mit Tests in der Kulturschale können also ganz besonders toxische Substanzen schon im Vorfeld aussortiert werden. Dies gelingt bereits relativ zuverlässig für die Vorhersage einer reizenden Wirkung an Haut und Auge oder für die Eigenschaft von Chemikalien, Veränderungen an der DNA zu verursachen – eine Wirkung, die zu Krebs führen kann.

Lebertoxizität kann ebenfalls mit gewissen Einschränkungen in vitro untersucht werden. Doch hierfür sind Hepatozyten erforderlich, die aus operativ entnommenem Lebergewebe gewonnen werden, z.B. das gesunde Randgewebe bei der Entfernung von Lebermetastasen. Dies ist aufwändig und die Verfügbarkeit menschlicher Hepatozyten ist limitiert. Daher wäre es ein großer Fortschritt, wenn Leberzellen aus Stammzellen gewonnen werden könnten.

Gewebe aus Stammzellen

Fortschritte der Stammzellbiologie haben es ermöglicht, dass im Prinzip jeder menschliche Zelltyp in der Kulturschale hergestellt werden kann (s. Abb. 1). Hierbei werden u.a. menschliche embryonale Stammzellen (hESC) verwendet. Diese Zellen müssen aus menschlichen Embryonen gewonnen werden; eine Technik, die in Deutschland nicht vorgenommen werden darf. Im Gegensatz dazu können induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) aus beispielsweise dem Hautgewebe eines beliebigen Patienten hergestellt werden (Reprogrammierung; s. Abb. 1), was sowohl für personalisierte Untersuchungen, aber auch für die unbegrenzte Produktion der Zellen Vorteile bietet.

Beide Stammzelltypen können zu Zellen des entsprechenden Keimblatts (Endo-, Meso-, Ektoderm) differenziert werden; danach wird durch spezielle Kulturbedingungen, oder auch genetische Manipulation, die Differenzierung zu bestimmten, reifen Zelltypen angestrebt. Ein Beispiel: Leberzellen (Hepatozyten) entstehen aus der Leberknospe, die vom Vorderdarm gebildet wird, eine Struktur, welche aus dem Endoderm hervorgeht (s. Abb. 2A).

Die Mechanismen, welche diesen Entwicklungsprozess voranbringen, sind in Grundzügen verstanden (s. Abb. 2B). So sind für die Ausbildung des Vorderdarms Zytokine aus der Gruppe der Wnt-Faktoren und Fibroblastenwachstumsfaktoren (z.B. FGF4) wichtig. Damit sich dann eine Leberknospe ausbildet, muss z.B. BMP auf das Gewebe einwirken, ein Protein, das im benachbarten kardialen Mesoderm gebildet wird. Dieses Wissen hat es ermöglicht, entsprechende Entwicklungsschritte in vitro nachzuvollziehen (s. Abb. 2C). So gelingt es, „Hepatozyten-ähnliche Zellen“ (HLC) herzustellen, die echten Hepatozyten ähnlich sehen und auch einige Funktionen übernehmen; z.B. produzieren sie das Serumprotein Albumin. Ähnliche Erfolge gibt es auch für weitere Zelltypen, wie rhythmisch kontrahierende Herzmuskelzellen, Vorläufer

von Nervenzellen und Nierenepithelzellen.

Stammzell-abgeleitete Leberzellen: Gut aber nicht gut genug?

Doch warum sind Stammzell-abgeleitete Leberzellen noch nicht gut genug für Routineanwendungen? Aus Stammzellen gewonnene Zellen weichen noch erheblich von primären Zellen ab. Genomweite Analysen der mRNA haben gezeigt, dass Hunderte Gene stark unterschiedlich exprimiert werden. Dabei wird ein besonderes Muster erkennbar: Zum einen sind viele Gene, welche in primären Hepatozyten stark exprimiert werden, in den aus Stammzellen abgeleiteten Zellen zu schwach vertreten. Ein zweites Phänomen besteht darin, dass die aus Stammzellen abgeleiteten Zellen Gene exprimieren, welche in primären Hepatozyten nicht zu finden sind; dies sind z.B. Gene, welche von Darmepithelzellen und ihren Vorläufern gebildet werden, also eine „unerwünschte Entwicklung“ zeigen.

Entwicklungstoxikologie

Leider ist es noch nicht möglich, aus hiPSC ausgereifte menschliche Zellen herzustellen, welche sich von primären Zellen kaum unterscheiden. Es ist aber sehr gut möglich, Stammzellen ein Stück weit zu reiferen Vorläuferzellen zu differenzieren. Während dieser Differenzierungsperiode können Chemikalien zugesetzt werden, um zu untersuchen, ob diese Substanzen die Entwicklung stören.

Dies wird am besten als genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf Entwicklungsgene gelegt, also Gene die während der Entwicklungsphase in der Kulturschale ohne Substanzzusatz hoch- oder runterreguliert werden. Eine hilfreiche Maßzahl ist dann der Anteil an Entwicklungsgenen, dessen normale Hoch- oder Herunterregulation durch die Prüfsubstanz gestört wird. Bei Substanzen, welche die menschliche Em-bryonalentwicklung stören, z.B. Valproinsäure oder Methylquecksilber, ist dieser Anteil deutlich im Vergleich zu harmlosen Substanzen erhöht. Trotz dieser erfolgreichen ersten Ergebnisse stehen umfassende Studien noch aus.

Wie geht es weiter?

Die Zukunft stammzellbasierter Methoden hängt davon ab, ob es gelingen wird, reife menschliche Körperzellen mit ausreichender Ähnlichkeit zu den entsprechenden primären Zellen herzustellen. Hierbei kann das Wissen um die oben erwähnten zu schwach exprimierten Gene und die „unerwünschten Gene“ hilfreich sein. Denn es ist bekannt, durch welche Transkriptionsfaktoren diese Gene reguliert werden. Daher ist es folgerichtig, diese in Zukunft zu adjustieren.

Es bleibt jedoch Ermessensspielraum, ab wann man eine Ähnlichkeit als ausreichend ansieht, um eine mögliche Eignung für toxikologische Tests zu prüfen. Schließlich kann man grobe Abschätzungen zytotoxischer Wirkungen schon mit herkömmlichen Zelllinien erreichen. Doch organspezifische Wirkungen setzen voraus, dass die Zellen die für ein Organ relevanten Funktionen möglichst genau wiedergeben – etwa die Fähigkeit zum Fremdstoffmetabolismus der Leber oder Erregungsbildung und Kontraktion von Herzmuskelzellen. Trotzdem kann ein zellbasiertes Testverfahren selbst dann sinnvoll sein, wenn noch nicht alle Eigenschaften und Funktionen perfekt mit primären Zellen übereinstimmen.

Eine Roadmap

Eine Prüfung der Eignung und weitere Optimierung kann entlang der im Folgenden beschriebenen Strategie zur Testentwicklung erfolgen (s. Abb. 4).

Zunächst ist es sinnvoll, Goldstandardsubstanzen und Signalwegkontrollen zu untersuchen. Für Goldstandardsubstanzen ist der toxische Wirkmechanismus gut

verstanden und toxische als auch harmlose Dosisbereiche sind bekannt. Paracetamol ist ein Beispiel, das diese Kriterien erfüllt. Liefert ein zellbasierter Test für Lebertoxizität bei Konzentrationen zwischen 1 und 2 mM keine positiven (toxischen) Ergebnisse, dann sollte die Entwicklung abgebrochen und zunächst das Zellsystem verbessert werden. Signalwegkontrollen greifen in bekannter Weise in Abläufe der Signaltransduktion ein. So sollten Wnt-Inhibitoren ein positives Ergebnis in zellbasierten Tests für Entwicklungstoxizität liefern.

Nach der erfolgreichen Testung der Goldstandards – ein Schritt, bei dem viele neue Tests scheitern – kommt die nächste Stufe. Hierfür benötigt man etwa 20 positive als auch negative Kontrollsubstanzen für die bekannt sein muss, zu welchen Blutkonzentrationen eine bestimmte (z.B. oral aufgenommene) Dosis führt. Hierfür kann die C_{\max} verwendet werden, die maximale Blutkonzentration. Weiterhin muss bekannt sein, ob die orale Dosis der Kontrollsubstanzen Toxizität verursacht oder nicht. Die Ergebnisse werden dann in ein Koordinatensystem eingetragen, mit C_{\max} auf der y-Achse und der niedrigsten im zellbasierten Test toxischen Konzentration auf der x-Achse.

Im Beispiel (s. Abb. 3) sind hepatotoxische und nicht-hepatotoxische Substanzen rot bzw. grün dargestellt. Je weiter die roten und grünen Symbole auseinanderliegen, desto besser die Testperformance. Die Güte dieser Separierung wird durch den Toxizitätsseparierungsindex (TSI) numerisch ausgedrückt. Der Vorteil von Leistungsindices wie dem TSI besteht darin, dass so stammzellbasierte Tests systematisch optimiert werden können; es kann nachvollzogen werden, ob eine vermeintliche Verbesserung des Protokolls auch wirklich zu einem besseren TSI führt. Nach dieser Verbesserungsphase muss geprüft werden, ob sich der optimierte Test auch bei weiteren Substanzen und in unabhängigen Labors bewährt. Für einen ausgereiften Test sollten Daten von mehreren Hundert positiven und negativen Substanzen vorliegen und herkömmliche statistische Gütekriterien wie Sensitivität und Spezifität sollten bekannt sein.

Schon heute unterstützen stammzellbasierte Testverfahren toxikologische Entscheidungsprozesse. Doch bis zur Einführung in die Routine und zur behördlichen Akzeptanz ist noch ein weiter Weg.

Literatur:

[1] Reif R, Karlsson J, Günther G, Beattie L, Wrangborg D, Hammad S, Begher-Tibbe B, Vartak A, Melega S, Kaye PM, Hengstler JG, Jirstrand M: Bile canalicular dynamics in hepatocyte sandwich cultures. Arch Toxicol. 2015 Oct;89(10):1861-70. doi: 10.1007/s00204-015-1575-9. Epub 2015 Aug 18.

[2]Albrecht W, Kappenberg F, Brecklinghaus T, et al: Prediction of human drug-induced liver injury (DILI) in relation to oral doses and blood concentrations. Arch Toxicol. 2019 Jun;93(6):1609-1637. doi: 10.1007/s00204-019-02492-9.

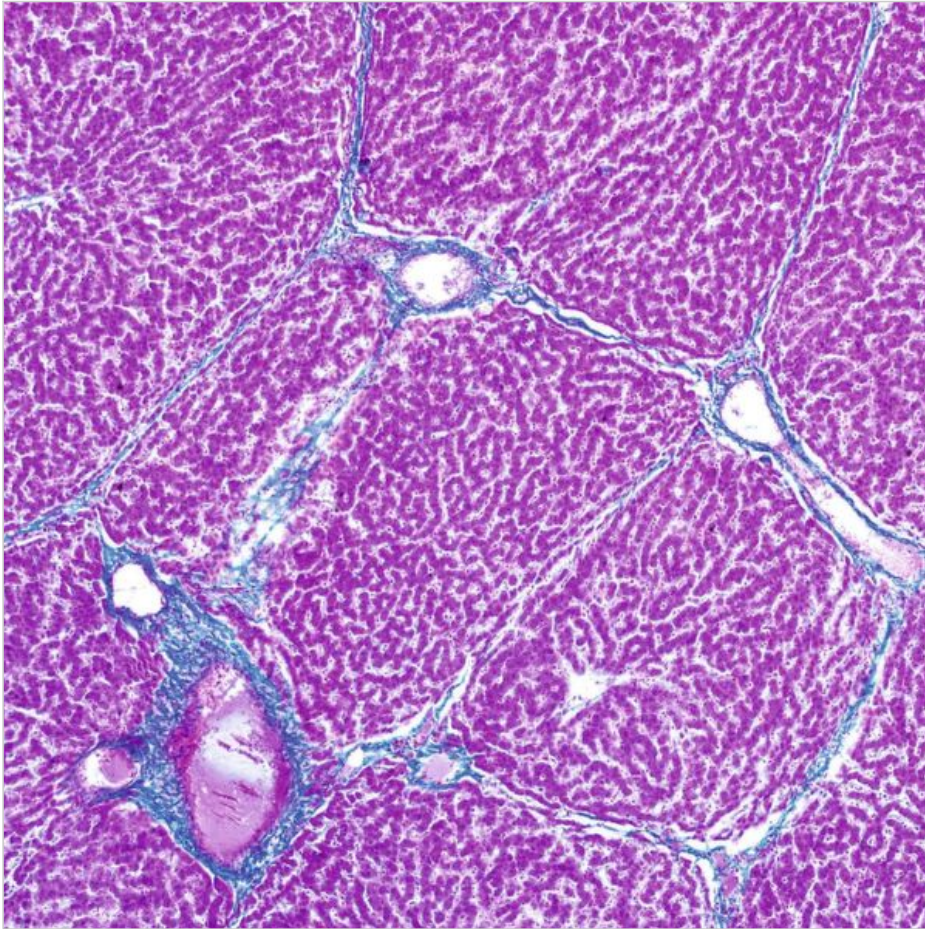
[3]Sachinidis A, Albrecht W, Nell P, -Cherianidou A, Hewitt NJ, Edlund K, Hengstler JG.: Road Map for Development of Stem Cell-Based Alternative Test Methods. Trends Mol Med. 2019 Jun;25(6):470-481. doi: 10.1016/j.molmed.2019.04.003.

*Prof. Dr. J. G. Hengstler, W. Albrecht, T. Brecklinghaus, D. Feuerborn, P. Nell, Dr. K. Edlund: Leibniz Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfADo), Forschungsbereich Toxikologie/Systemtoxikologie, 44139 Dortmund

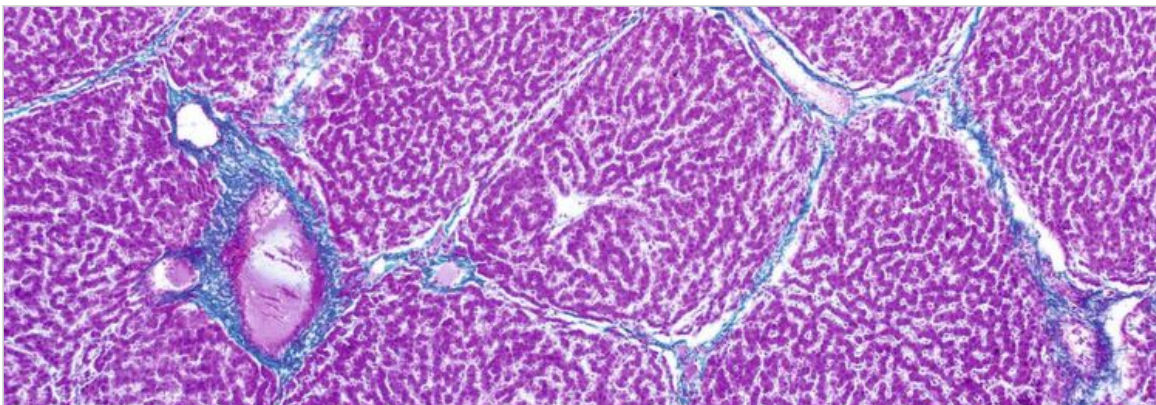
**A. Cherianidou, Prof. Dr. A. Sachinidis: Universität zu Köln, Zentrum Physiologie und Pathophysiologie, Institut für Neurophysiologie, 50931 Köln

Dieser Beitrag ist urheberrechtlich geschützt.
Sie wollen ihn für Ihre Zwecke verwenden?
Infos finden Sie unter www.mycontentfactory.de.

Dieses PDF wurde Ihnen bereitgestellt von <http://www.laborpraxis.vogel.de>



Menschliche Leberzellen und der Mikroskop (Symbolbild) (©sinhyu - stock.adobe.com)



Menschliche Leberzellen und der Mikroskop (Symbolbild) (©sinhyu - stock.adobe.com)

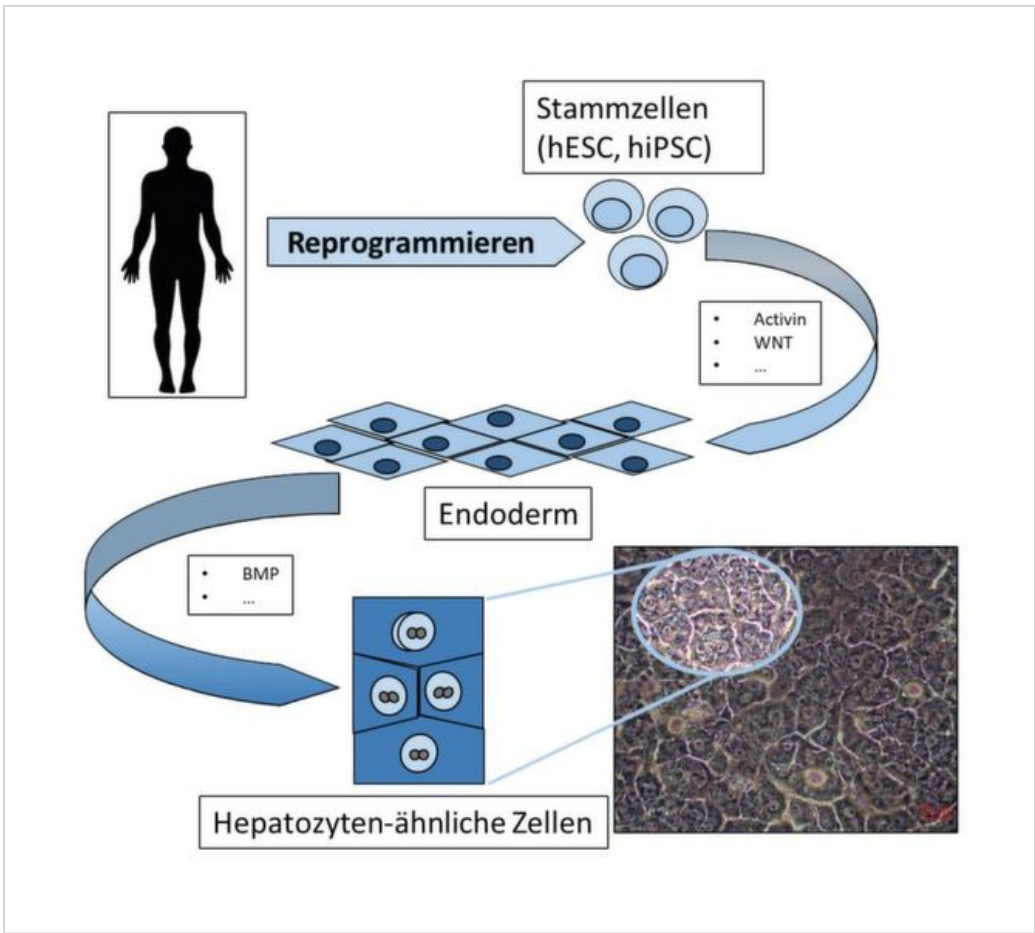


Abb. 1: Fortschritte der Stammzellbiologie haben es ermöglicht, dass im Prinzip jeder menschliche Zelltyp in der Kulturschale hergestellt werden kann. (IfADO; aus [1])

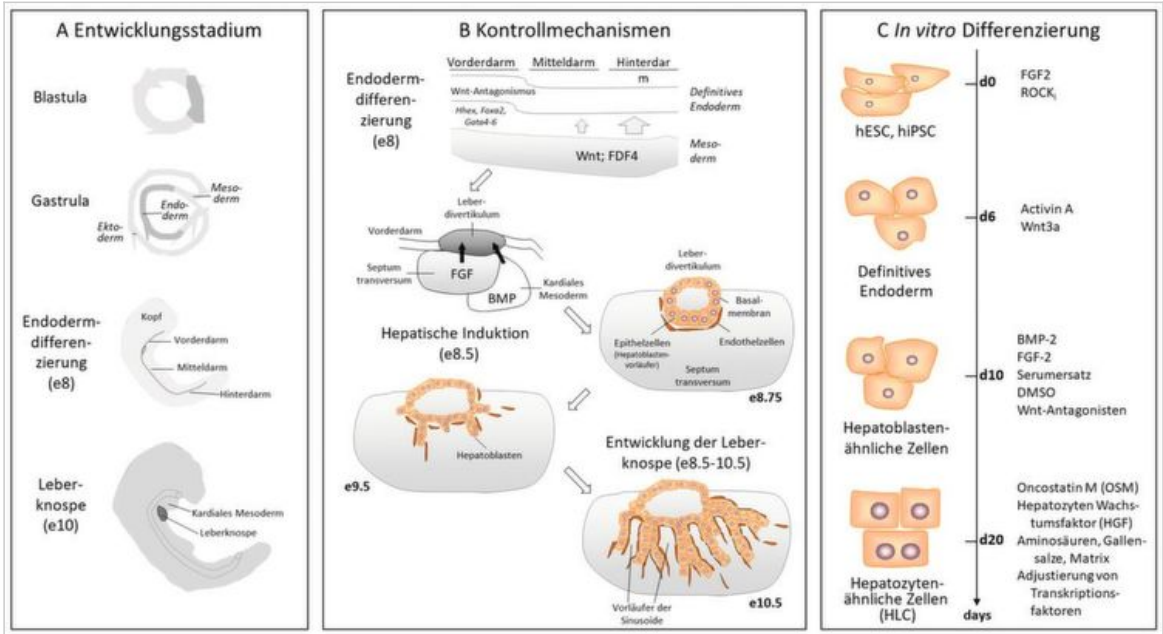


Abb. 2: Differenzierung von Leberzellen (Hepatozyten) (IfADO; aus [3])

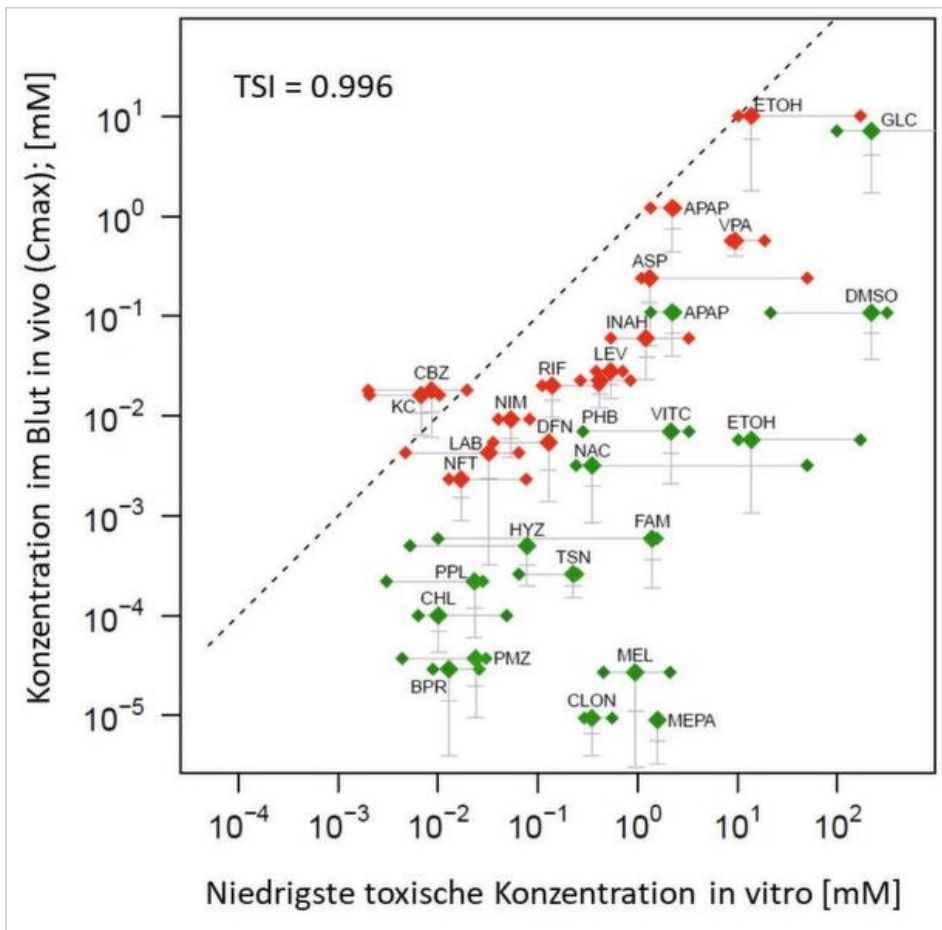


Abb. 3: Prüfung auf Eignung von Substanzen im Rahmen der Testentwicklung. Hepatotoxische und nicht-hepatotoxische Substanzen rot bzw. grün dargestellt. (IfADo; aus [2])

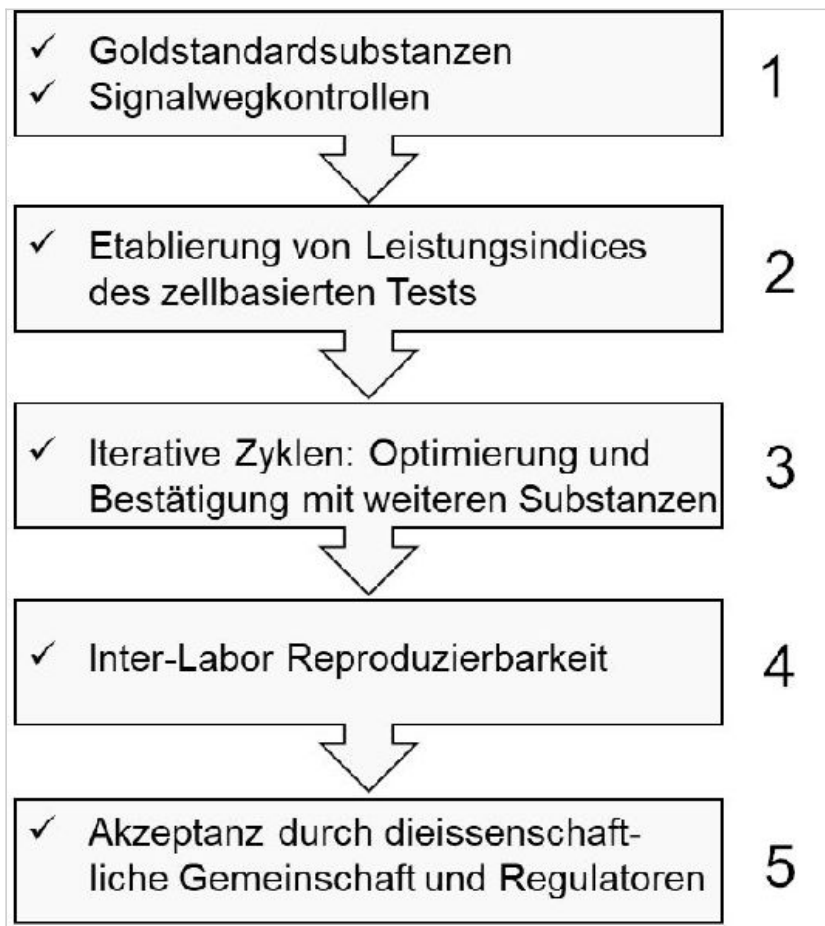


Abb. 4: Strategie für die Prüfung der Eignung und weitere Optimierung von Testsubstanzen (IfADo)