

Lichtblicke

Selbstorganisation in 3D –
auf dem Weg zu einer gezüchteten Netzhaut

Prof. Dr. Paul G. Layer

Entwicklungsbiologie & Neurogenetik, Technische Universität Darmstadt

Gewebeersatz – mit und ohne Silicon

Wenn Frauen sich ihre Brust mit Silicon verschönern lassen, so hat dies mit Tissue Engineering eher wenig, mit Material- und Abfallwirtschaft jedoch viel zu tun.

Lassen Sie die Ästhetik einmal hinter sich und stellen sich vor, Sie wären taub, also gehörlos, sprachlos, musiklos. Sicher wären Sie dann von einer kürzlich erfolgten Meldung berührt: Australische Forscher haben Patienten, die seit früher Kindheit an Hörschwäche litten, Stammzellen aus der Nasenschleimhaut ins Ohr transplantiert, was zu einer deutlichen Verbesserung ihres Hörvermögens führte [1]. Was wie ein Wunder klingt, bringt uns schon näher an das Thema Tissue Engineering (TE) heran. Was ist wohl schlimmer: Taub oder blind zu sein? Weltweit gibt es annähernd 50 Mio. Blinde, alle 5 Sekunden wird in Europa ein Mensch blind. Dabei spielen die degenerativen Erkrankungen mit der altersbedingten Macula-Degeneration (AMD) und der Retinitis pigmentosa (RP) die vorherrschende Rolle.

Nun, vereinzelte Lichtblicke scheinen für RP-erblindete Menschen durch die Einführung eines elektronischen Sehchips auf [2]. Tübinger Biomediziner und Reutlinger Ingenieure haben mit ihrem Retina-Implant eine grandiose Meisterleistung vollbracht, die noch vielen Betroffenen unschätzbare Dienste leisten wird. Dennoch stellt der Chip keine Heilung dar, er bleibt eine siliconbasierte Sehhilfe.

Lässt sich eine lädierte oder gar erblindete Retina in Zukunft eventuell richtig – soll heißen biologisch – heilen? Viele Therapiemethoden sind noch zu verbessern, denn ärztliche Maßnahmen und medikamentöse Behandlungen sind häufig eher auf Symptome konzentriert, als dass sie zu einer echten Heilung beitragen. Kann die regenerative Medizin, kann das Tissue Engineering uns größere Hoffnungen machen – und sie auch halten?

Abb. Nachweis einzelner Zelltypen im Retina-Sphäroid.
Stäbchen (grün) und Zapfen liegen korrekt in der äußersten Zellschicht und beginnen zu differenzieren.

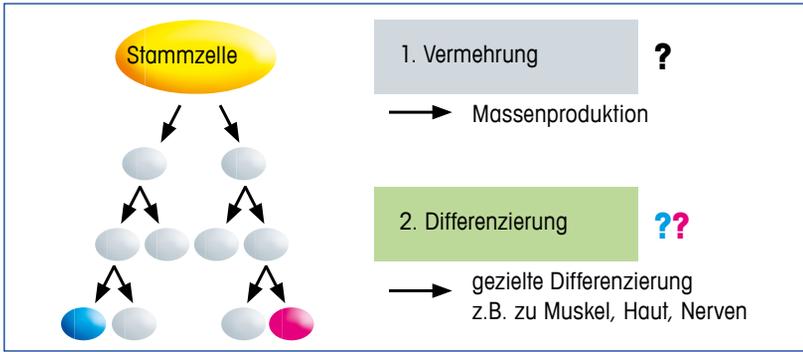


Abb. 1 Stammzellen (gelb, grau) zeichnen sich durch zwei Grundeigenschaften aus, ihre Proliferationsfähigkeit und ihr Differenzierungspotenzial (blau, pink, verschiedene Zelltypen). Die erforderlichen Genschalter, Signalwege und Wachstumsfaktoren sind zum Teil, aber bei Weitem nicht vollständig bekannt (??).

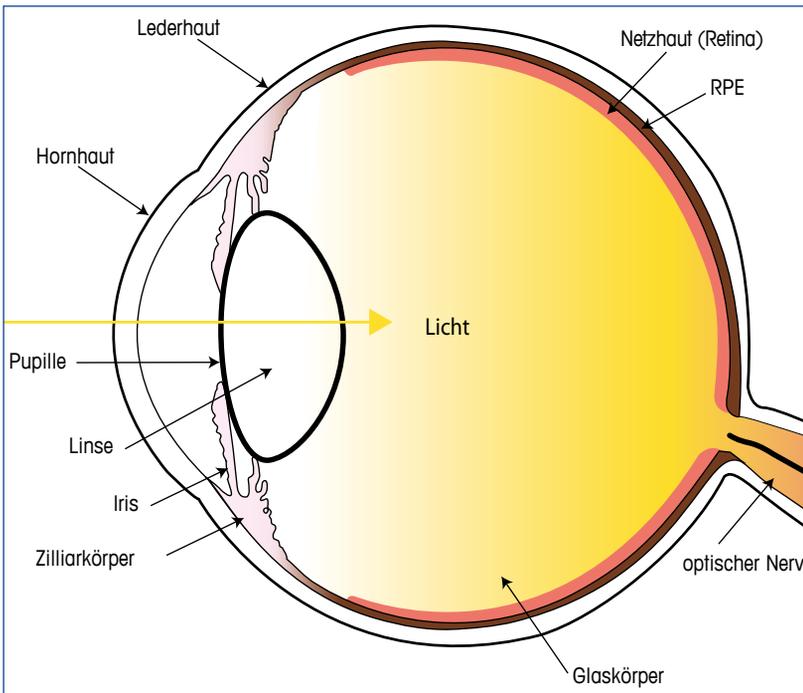


Abb. 2 Schemaschnitt durch menschliches Auge.

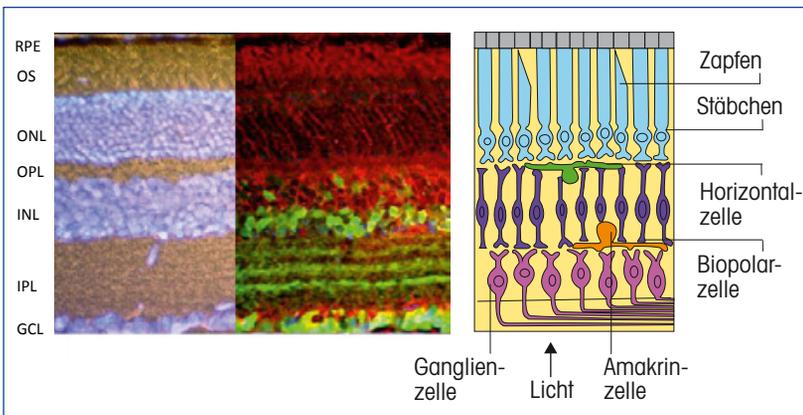


Abb. 3 Zellschichten, Zelltypen und Zellverschaltung in der Retina.
Links: Alle Zellkörper sind in drei „nukleären“ Körnerschichten konzentriert (blau).
Mitte: Die verschiedenen Zelltypen werden mit spezifischen Markern nachgewiesen; hier Müller'sche Radialgliazellen (rot), bestimmte Amakrinzellen (grün), deren Dendriten in der IPL synaptische Subbanden bilden.
Rechts: ein vereinfachtes Schaltbild der verschiedenen Zelltypen. Lichteinfall erfolgt von unten. RPE, retinales Pigmentepithel; OS, äußere Segmente; ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht

Tissue Engineering – „Hope or Hype?“

Das Tissue Engineering – wofür es noch keine wirklich treffende deutsche Bezeichnung gibt – ist laut Definition „ein multidisziplinäres Fach, das Methoden und Prinzipien der Biologie und des Ingenieurwesens vereint, um Lebend-Gewebersatz zu entwickeln und somit Funktionen von erkranktem oder beschädigtem Humangewebe wieder herzustellen“. TE beschäftigt sich mit der künstlichen Zucht von nahezu allen Geweben und sogar ganzen Organen des menschlichen Körpers. Dies unter Einsatz von geeigneten Stammzellen, die zwei Grundeigenschaften aufweisen müssen (Abb. 1): i) sich in der Zellkultur möglichst unbegrenzt teilen lassen (Fähigkeit zur Proliferation) und ii) sich anschließend durch gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren zur Produktion der für das Gewebe notwendigen Zellarten anregen lassen (Differenzierungspotenzial). Hier ein Überblick über die gängigsten Stammzellarten.

Einteilung der Stammzellen.

- a) nach Entwicklungsstadium (prinzipiell zu unterscheidende SC-Typen):
 - embryonale Stammzellen (eSCs; toti- oder pluripotent)
 - Keimzell-Vorläufer (GCPs, pluripotent)
 - fötale Stammzellen (fSCs; multipotent)
 - Nabelschnurblut (NSB; pluripotent)
 - adulte Stammzellen (aSCs multipotent)
 - induzierte pluripotente Stammzellen (iPS cells)
- b) nach Entwicklungspotenzial (was kann aus ihnen entstehen?):
 - totipotent (alles, insb. ganzer lebender Organismus)
 - pluripotent (Zellen aller 3 Keimblätter, aber nicht ganzer Organismus)
 - multipotent (mehrere verschiedene Zelltypen, nur 1 Keimblatt)
 - unipotent (nur ein bestimmter Zelltyp)

Sie alle zeigen ausgeprägte Vor- und Nachteile wie schlechte Vermehrungs- oder Differenzierungsfähigkeiten, spätere Tumoranfälligkeit und nicht zuletzt ethische Bedenken. Selbst für die als Königsweg favorisierten iPSCs kann nach jüngsten Erkenntnissen eine Tumorbildung im implantierten Gewebe nicht ausgeschlossen werden [3].

War bisher alles nur „Hype“ oder gibt es auch „Hope“ im stammzellbasierten TE, das in den letzten 10–15 Jahren zu einem riesigen Forschungs- und Industrieunterfangen herangewachsen ist. Die Forschungen etwa im Fall von Diabetes sind durchaus viel versprechend. Embryonale Stammzellen (eSCs) wurden *in vitro* zu β -Zellen differenziert und konnten nach Implantation in eine diabetische Maus tatsächlich deren Zuckerhaushalt verbessern. Weit gediehen ist das TE auch im Bereich des Knorpel- und

Knochenersatzes (die berühmte Ohrmaus dürfte mancher Leser noch vor Augen haben) und hat u.a. Eingang in die Zahnchirurgie gefunden. Bei hochgradigen Verbrennungen wird die klassische Spalthaut zwar noch lange nicht zu ersetzen sein; aber inzwischen kann *in vitro*-gezüchtete menschliche Haut schon als Fertigpräparat gekauft oder auch von adulten Stammzellen aus Haarfollikeln des Patienten selbst gezüchtet werden. Von zehn Haaren des Patienten können immerhin 25 cm² Haut produziert und eingesetzt werden [4].

Dreidimensionale Selbstorganisation von Geweben in der Kulturschale

Bei der herkömmlichen Art, Zellen *in vitro* zu züchten, sät man Zellen in einer Plastikschale aus, versorgt sie mit Nährmedium und lässt sie sich am Boden haftend ausbreiten. Leider zeigen diese Zellen oft wenige Ähnlichkeiten mit dem Ausgangsgewebe, weil ihnen die natürliche dreidimensionale Zellumgebung fehlt. Deshalb titelte Nature schon vor Jahren „Goodbye, flat biology“, jedoch ist die Verbreitung von 3D-Kulturen aufgrund des hohen Arbeitsaufwands immer noch begrenzt. Organotypische Kulturen werden zur Zucht von vielerlei Geweben eingesetzt, die auch therapeutisch zum Einsatz kommen könnten. Typischerweise geht man hierbei von reaggregierten Zellkugeln (Zellsphäroiden) aus.

Mit diesem Ansatz versucht man, eine vollständige Rekonstruktion eines gewünschten Gewebes, ausgehend von wenigen (Stamm) Zellen unter kontrollierten Bedingungen, zu erreichen. Das Maß an Selbstorganisation, das hierbei oft zu beobachten ist, kann erstaunlich sein. Hat man die richtigen Ausgangszellen, so ist die weitere Durchführung technisch einfach: Die Zellen werden in Schalen eingebracht und auf einem Rotationsschüttler in ständiger Bewegung gehalten. Die Zellen reaggregieren schnell, beginnen sich zu vermehren und können in geeignetem Nährmedium zur gezielten Differenzierung gebracht werden. Gleichzeitig beginnen die entstehenden Zelltypen, sich in der Zellkugel räumlich anzuordnen. Innerhalb von Tagen bis Wochen kann hierbei die Bildung organotypischer Strukturen genauestens, sozusagen Zell-für-Zelle, analysiert werden. Mit diesem Ansatz wurde nicht nur die Bildung verschiedener embryonaler Gewebe, sondern auch die Regulation von Krebszellen analysiert. Ähnlich werden auch Neurosphären von eSCs aus der Blastozyste im so genannten Hanging Drop gezüchtet.

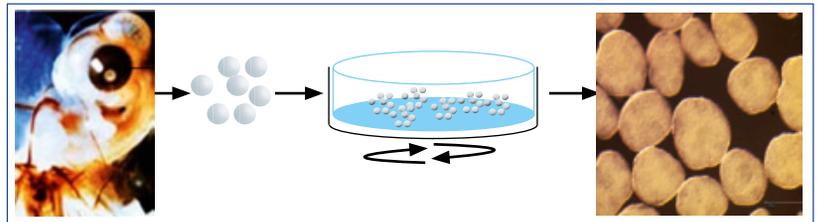


Abb. 4 Produktion von Zellkugeln (Retina-Sphäroiden) aus den Augen von fünf Tage alten Hühnerembryonen.

Die Retina wird nach Entnahme enzymatisch in Zellen zerlegt („dissoziiert“); diese werden in einer Kulturschale auf einem Rotationsschüttler (s. Abb. 9) reaggregiert. Innerhalb von 2 Tagen bilden sich gleichmäßige Zellkugeln.

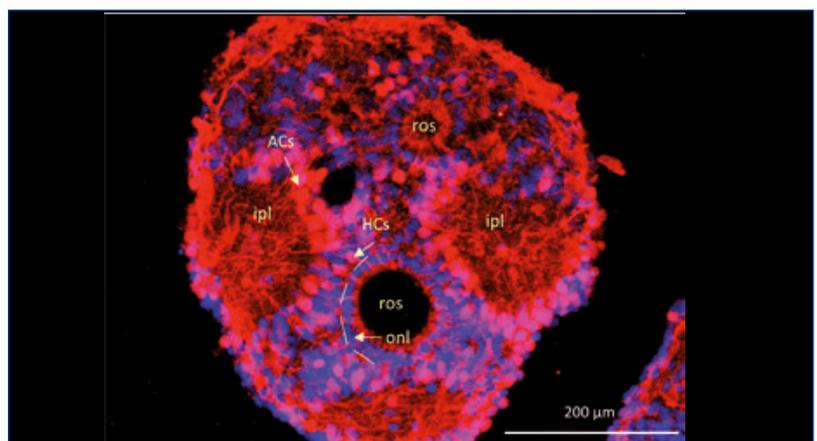


Abb. 5 Histotypische Strukturen auf einem Schnitt durch ein Rosetten-Sphäroid (wie in Abb. 4 produziert). Beachte zwei Rosetten (ros) mit Fotorezeptoren (ONL) und mehrere IPL-artige Areale; dazwischen geordnete INL-Schichtungen mit Horizontal- (HCs) und Amakrinzellen (ACs). Färbungen: DAPI (blau) zeigt alle Zellkörper, Pax6 (rot) zeigt Amakrinzellen. Abkürzungen ansonsten wie in Abb. 3. Bild: Gesine Bachmann

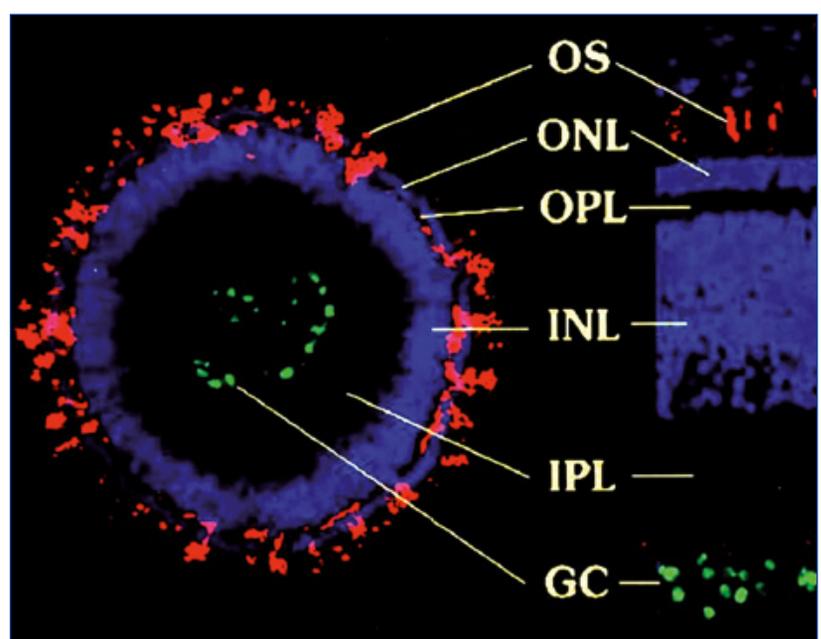


Abb. 6 Eine nahezu vollständige Rekonstitution einer Retina des Hühnerembryos (links) im Vergleich mit einer Normalretina (rechts).

Das Sphäroid wurde aus vollständig dissoziierten Retinae des Hühnerembryos in Gegenwart von RPE-Überständen produziert. Färbungen: DAPI (blau) zeigt die Zellkorperschichten (GCL ist falschfarben in Grün kodiert); Stäbchen-Fotorezeptoren sind rot.



Paul Layer im Forschungslabor an der TU Darmstadt isoliert Hühnerembryonen aus bebrüteten Eiern.

Die Rekonstruktion einer Retina *in vitro*

Am Beispiel von retinalen Zellkugeln, die wir aus sich entwickelnden Wirbeltieraugen züchten (Abb. 2), sollen diese Verfahren nun veranschaulicht werden [5, 6]. Die Netzhaut (Retina) stellt das lichtempfindliche Gewebe in unserem Auge dar (Abb. 3). Als Untersuchungsobjekt ist sie für Neurobiologen von besonderem Interesse, weil sie von außen gut erreichbar und ihre dreifache Zellschichtung vom Fisch bis zum Menschen vergleichbar ist. In einer äußersten Schicht findet man in Form von Stäbchen und Zapfen die Fotorezeptoren, die auf Höhe einer äußeren synaptischen Schicht (OPL) mit Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen als Interneuronen in einer mittleren Zellschicht (INL) verschaltet sind. Diese ihrerseits sind in einer breiten, inneren synaptischen Schicht (IPL) mit den am Glaskörper anliegenden Ganglienzellen (GCL) verbunden, deren Axone die nun schon hoch verarbeiteten elektrischen Signale über den Sehnerv in das Sehzentrum im Gehirn weiterleiten. Die Retina wird von radial durch das Gewebe reichenden Müller'schen Gliazellen stabilisiert; nach außen wird sie vom retinalen Pigmentepithel (RPE) umhüllt.

Mit dem Modellsystem Netzhaut konnte eine weit gehende Geweberegeneration *in vitro* bestens studiert werden. Bringt man dissoziierte Retinazellen aus dem frühen Hühnerembryo in eine Rotationskultur, so bilden sie innerhalb weniger Tage etwa 400 µm dicke Zellkugeln aus, die in ihrem Inneren geschichtete Einheiten aufweisen, die mit der Normalretina vergleichbar sind (Abb. 4). Innere Rosetten enthalten zunächst noch proliferierende Zellen, später dann Fotorezeptoren (Abb. 5). Die Zellkörper von Stäbchen und Zapfen beginnen sogar, äußere Segmente zu bilden. Bis auf Ganglienzellen werden alle anderen Zelltypen an entsprechenden Orten angetroffen. Radiale Müllerzellen reichen durch diese Schichtanordnungen hindurch und sammeln sich in zirkulären Matrices, die der inneren plexiformen Schicht einer Normalretina entsprechen (Abb. 7c). Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen und ihre synaptische Verknüpfung untereinander können mit spezifischen Markern histologisch, biochemisch oder physiologisch verfolgt werden und hängt von den jeweiligen Kulturbedingungen ab. So bilden sich Fotorezeptoren besser in Anwesenheit von Müllerzellen und/oder bestimmten Wachstumsfaktoren [8-10].

Rosettensphäroide entsprechen jedoch bei Weitem noch nicht einer normalen Retina, denn die Anordnung der

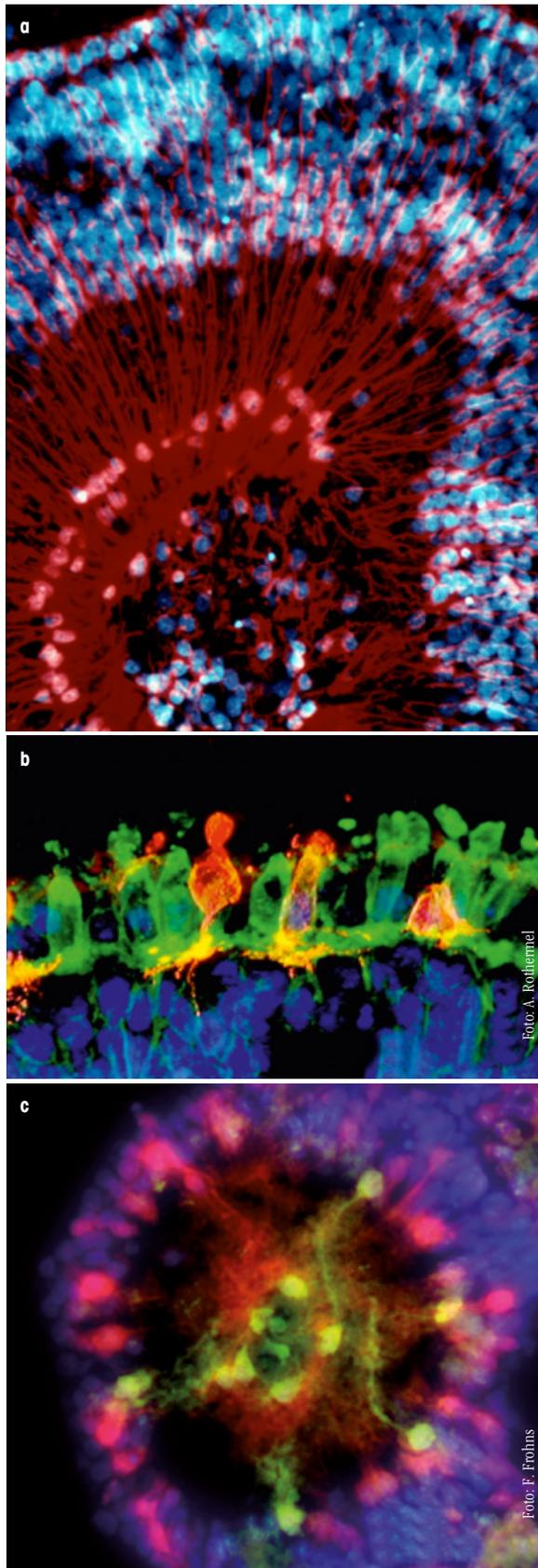


Abb. 7 Nachweis einzelner Zelltypen im Retina-Sphäroid.

a Müller'sche Radialgliazellen (rot) durchziehen die gesamte Schichtung in einem stratifizierten Sphäroid aus dem Hühnerembryo (vgl. Abb. 6).

b Stäbchen (grün) und Zapfen liegen korrekt in der äußersten Zellschicht und beginnen zu differenzieren.

c IPL-artiger Bereich in einem Rosetten-Sphäroid (vgl. Abb. 5), wo Amakrinzell-Dendriten synaptische Subbanden ausbilden (vgl. Abb. 3). Färbungen: grün, Cholinacetyltransferase; rot, Calretinin; blau, DAPI für Zellkörper.

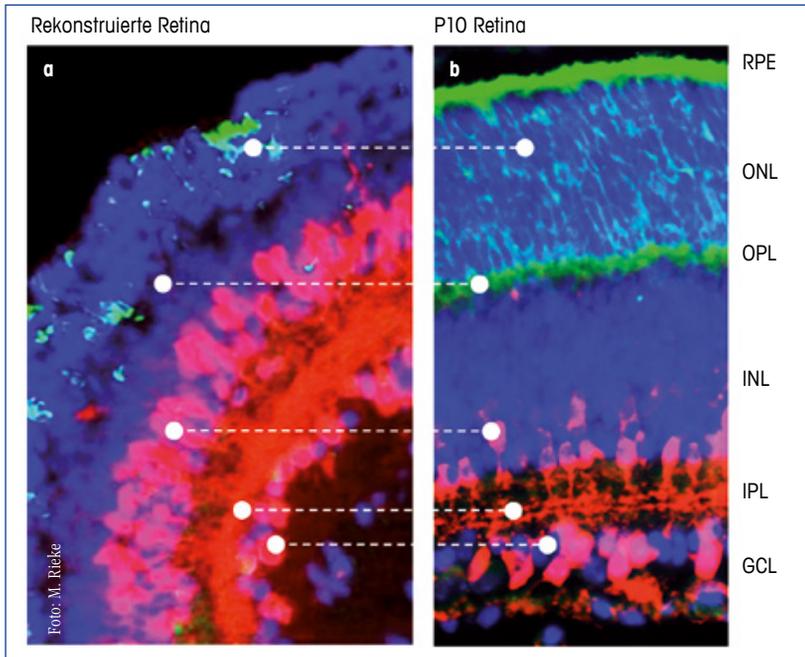


Abb. 8 Auch weit gehende Rekonstruktion von Säuger-Retinae ist *in vitro* möglich. Struktur einer 10 Tage alten (P10) Retina der Wüstenrennmaus (b) im Vergleich zu einer nahezu vollständigen Rekonstruktion in einem retinalen Sphäroid (a), der in Gegenwart von RPE-Überstand und Wnt-3a aus dispergierten Einzelzellen einer P1-Retina für 10 Tage gezüchtet wurde. Färbungen: blau, DAPI für Zellkerne; rot, Calretinin für Amakrin- und Ganglienzellen; grün, CERN-901 für Stäbchen-Fotorezeptoren.

Schichten ist invertiert. Die Fotorezeptoren liegen rosettenartig nach innen gerichtet, an die sich die anderen Schichten nach „außen“ anschließen. Lassen sich denn nun Wege finden, eine normale Zellschichtung in den Zellkugeln zu erreichen? Ein wenig gleicht das ganze TE immer noch mittelalterlicher Alchemie, wo man durch „trial-and-error“ die richtigen Zutaten zum Kulturmedium finden muss. So war es auch hier. Aus frühen Studien an niederen Wirbeltieraugen war bekannt, dass das retinale Pigmentepithel eine Retinaregeneration begünstigen kann. Diesem Gedanken folgend, konnten wir in Gegenwart von RPE die Struktur von Rosettensphäroiden vollständig umstülpen, sodass sich normal geschichtete Sphäroide gebildet haben (Abb. 6, 7). Auch Müller'sche Gliazellen konnten solche Stratosphäroide induzieren. Eine japanische Gruppe hat dann die Beteiligung der Wnt-Signalkaskade an diesem Prozess nachgewiesen. Im Weiteren konnten wir all diese Studien auf verschiedene Nager und damit auf Retinae von Säugern ausdehnen (Abb. 8).

Obwohl in diesem Beitrag die Zucht von ganzen Geweben, also das Thema TE, im Vordergrund steht, muss der grundlegende Erkenntnisgewinn, der mit Zellsphäroiden erzielt werden kann, betont werden. Sphäroide können leicht genetisch transfiziert werden, sind also für „gain-“ oder „loss-of-function-Experimente“ zugänglich und können histologisch wie auch molekular ausgewertet werden. Ihre Weiterentwicklung für High-throughput-Verfahren [10] dürfte zu vermehrtem Einsatz als Analysesysteme in der Toxikologie, Pharmakologie und im Umwelt-Monitoring führen (Abb. 9).

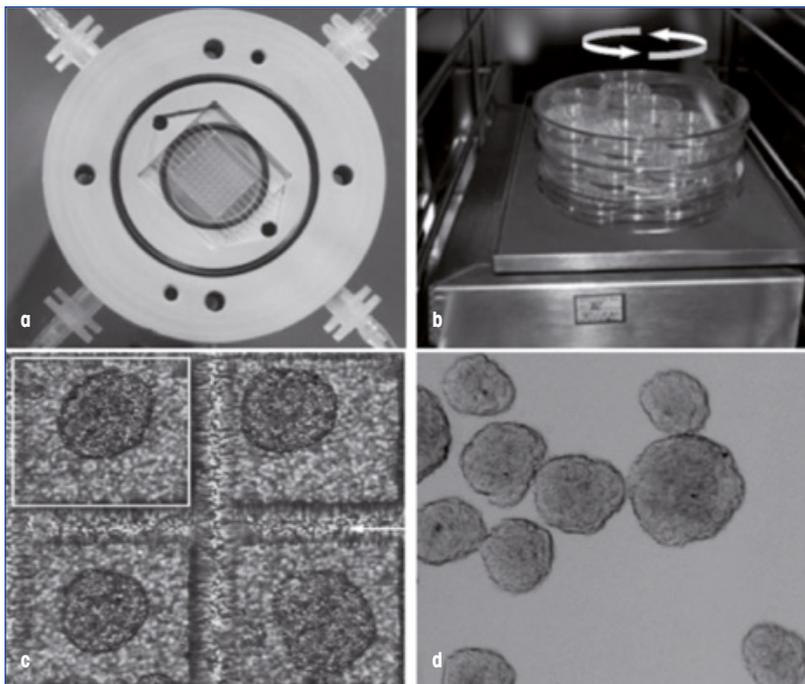


Abb. 9 Retina-Sphäroide werden einzeln in Mikrokavitäten eines Zell-Chips (cf-chip) (c) in einem bewegungsfreien Bioreaktor (a) gezüchtet; ihre innere Struktur ist den unter Rotation (b) gezüchteten Sphäroiden (d) vergleichbar. Diese Anordnung ist für Reihenuntersuchungen besonders geeignet, z.B. für pharmakologische, toxikologische oder Umweltanalysen und kann u.a. helfen, Tierversuche zu ersetzen (siehe [7, 10]).
Quelle: Rieke et al., 2008

Welche Stammzellen – embryonal oder adult?

Die genannten Studien wurden mit Retinae des Hühnerembryos bzw. postnatalen Maus durchgeführt, also im Prinzip mit fötalen Stammzellen und haben belegt, dass diese Zellen ein hohes Maß zur Selbstorganisation von funktionellem Retinagewebe besitzen. Ein therapeutischer Einsatz ist natürlich damit noch nicht möglich. Noch viele biologische und technische Herausforderungen sind zu meistern, wie etwa Fragen der Implantierbarkeit der kugeligen Gewebe oder die Entwicklung biokompatibler Materialien als abbaubare Hilfsgerüste (scaffolds) [4]. Viele Teams, insbesondere in Japan, den USA und England, suchen nach geeigneten Zellquellen und therapeutischen Verfahren. Die Gruppe um David Gamm (Madison, Wisconsin) konnte aus menschlichen eSCs

hoch geordnete Retina-Sphäroide züchten, die den unsrigen aus perinatalen Mäusen gleichen. Auch legen Studien mit eSCs verschiedener Säugetiere und vom Menschen nahe, dass man sie zu Fotorezeptoren oder gar im Auge zu retinaartigen Strukturen entwickeln kann, wobei allerdings auch hier wieder Tumore mit entstehen können. Falls daher doch adulte SCs die Zellen der Wahl würden, kämen hierfür Zellen des Ziliarkörpers oder der Iris, aber auch RPE- oder isolierte Müller'sche Gliazellen infrage. Sie alle sind mehr oder weniger gut aus dem Auge isolierbar und können *in vitro* vermehrt und in Retinazellen transdifferenziert werden. Ob man sie dann in eine geschädigte Retina direkt implantiert oder aber zunächst aus ihnen mittels TE Retinagewebe züchtet, so wie es hier beschrieben wurde, müssen nun Ophthalmologen weiter ermitteln.

Aus-, Durch- und Lichtblick

Zweifellos erleben wir hinsichtlich der Entwicklung zellbasierter Therapien in der experimentellen Augenheilkunde derzeit aufregende Zeiten. Obwohl die menschliche Retina normalerweise nach einer Schädigung keinerlei Anzeichen zur Regeneration zeigt, haben Versuche an niederen Wirbeltieren angedeutet, dass es im adulten Auge wohl dennoch Zellen gibt, in denen eine solche Fähigkeit schlummert. Die hier beschriebenen Ansätze mit embryonalen, fötalen und adulten Stammzellen zeigen Wege auf, die tatsächlich zu einer Rekonstitution von humanem Retinagewebe in der Gewebezucht führen könnten.

Obwohl der Weg dorthin mit eSCs und auch iPSCs schon als weit fortgeschritten erscheint, muss – wegen der nicht auszuschließenden Tumorgefahr – die weitere Forschung sich doch eher den möglichen Zellquellen aus dem adulten Auge zuwenden (aus Platzgründen musste diese Darstellung sehr verkürzt bleiben; s. ausführlicher in [6], pdf beim Autor erhältlich).

■ layer@bio.tu-darmstadt.de

Literatur

- [1] Pandit, S. et al. (2011). Stem cells, Feb. 2011, DOI 10.1002/stem.609.
- [2] Zrenner, E. et al. (2010). Proc.R.Soc.B, online Nov 3, 2010. doi: 10.1098/rspb.2010.1747.
- [3] Wobus AM (2010). Bioessays 32, 993-1002.
- [4] Atala, A. et al. (2007). Principles of regenerative medicine. Academic Press. Abbott A (2003). Nature 424, 870-872.
- [5] Layer, PG et al. (2002). Trends Neurosci 25, 131-134.
- [6] Layer, PG et al. (2010). Exp Rev Ophthalmol 5, 523-544.
- [7] Rothermel, A. et al. (2005). Tissue Eng 11, 1749-1756.
- [8] Rothermel, A. et al. (2006). Invest Ophthalmol Vis Sci 47, 2716-2725.
- [9] Frohns, F. et al. (2009). Eur J Neurosci 29, 1931-1942.
- [10] Rieke, M. et al. (2008). Lab Chip 8, 2206-2213.

Paul Layer geboren 1948 in Beutelsbach (bei Stuttgart), studierte 1969–73 Physik in Stuttgart sowie Ernährungswissenschaften in Hohenheim und promovierte 1977–79 an der Universität Konstanz bei F. Hucho über den cholinergen Rezeptor und Cholinesterasen. Von 1977–79 schloss sich ein USA-Aufenthalt als Postdoc an der Stanford School of Medicine an, wo er bei E. Shooter über den Nervenwachstumsfaktor NGF arbeitete. Zurück in Deutschland, untersuchte er 1980–1991 die Entwicklung von Gehirn und Auge im Hühnerembryo am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen. Er habilitierte sich an der Universität Tübingen als Heisenberg-Stipendiat für das Fach Zoologie und wurde 1991 an die Technische Universität Darmstadt als C4-Professor für Entwicklungsbiologie & Neurogenetik in den Fachbereich Biologie berufen. Seine Forschungen befassen sich mit embryonalen Funktionen des Neurotransmitters Acetylcholin sowie mit Methoden zur Züchtung von retinalem Gewebe unter Einsatz geeigneter Stammzellen (Tissue Engineering). Die Kooperation mit chinesischen Wissenschaftlern brachte ihn 1986 und 1990 für ausgedehnte Aufenthalte an das MPG-Gästelabor der Academia Sinica nach Shanghai, weiterhin war er 1999 Gastprofessor für Cognitive & Brain Sciences an der University of Tsukuba in Japan.

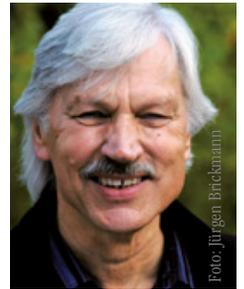


Foto: Jürgen Brackmann