



LESEPROBE

Stammzellen und Regenerative Medizin

**Prof. Dr. Uwe Knippschild, Prof Dr. Cagatay Günes, PD Dr. Markus
Hönicka, Dr. Joachim Bischof, Dr. Pengfei Xu**

1 Modulinhalt

Modulnummer	3.5
Modultitel	Stammzellen und Regenerative Medizin
Modulkürzel	Stz
Studiengang	Biopharmazeutisch-Medizintechnische Wissenschaften (M.Sc.)
Ort der Veranstaltung	Universität Ulm
Modulverantwortlichkeit	Prof. Dr. Uwe Knippschild
Lehrende	Prof. Dr. Uwe Knippschild, Dr. Joachim Bischof, Dr. Pengfei Xu, PD Dr. Markus Hönicka, PD Dr. Timo Burster, PD Dr. Cagatay Gunes
Voraussetzungen	Fundierte Kenntnisse in Molekularbiologie, Zellbiologie und Signaltransduktion
Verwertbarkeit	Verknüpfungen bestehen insbesondere zu den Modulen 1.2 Pharmazeutische Grundlagen und Immunologie, 1.3 Medizinische Grundlagen, 3.2a Neue Methoden in der Molekularbiologie, 3.2b Zelllinienentwicklung, 3.4 Therapeutische Proteine, Peptide und Small Drug Molecules. Die Stammzellforschung und Regenerative Medizin gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. Daher sind Kenntnisse in der Grundlagen-orientierten Stammzellforschung, über ethisch unbedenkliche Verfahren zur Gewinnung von Stammzellen, über das Potenzial der pharmakologischen Beeinflussung von Stammzellen durch „Small Molecule“ Inhibitoren für die Induktion von Differenzierungsprozessen und der Wachstumsinhibition von Tumorstammzellen, sowie Kenntnisse über rechtliche Grundlagen in der Stammzellforschung essentiell. Das in diesem Modul vermittelte theoretische und praktische Wissen kann in allen Master-Studiengängen mit naturwissenschaftlicher/ medizinischer Ausrichtung, wie u.a. Biologie, Molekulare Medizin, Medizin, Pharmazie, Medizinalchemie, chemische Biologie und Biotechnologie, eingesetzt werden.
Semester (empfohlen)	Wintersemester
Max. Teilnehmerzahl	10
Art der Veranstaltung	☐ Präsenzveranstaltung(en) ☐ Präsenzveranstaltung(en) mit E-Learning-Elementen ☒ Präsenzveranstaltung (en) im Labor mit E-Learning-Elementen ☒ Wochenendseminar
Veranstaltungssprache	☒ Deutsch, ☒ Englisch, ☐ Weitere, nämlich:
ECTS-Credits	6 Credits

	Arbeitsaufwand: Präsenzzeit: Seminarwochenende und Praktikum (60 Stunden) Selbststudium: Nachbereitung der Vorlesungen (überwiegend E-Learning basiert, deutschsprachige Videos mit englischsprachigen Folien, sowie Seminararbeiten vorwiegend in Englisch), schriftliche Ausarbeitung der Hausarbeit in Englisch, Vortrags- und Praktikumsvorbereitung (120 Stunden)
Prüfungsform	☐ Klausur, ☐ Referat, ☐ Kolloquium, ☐ Posterpräsentation, ☐ Podiumsdiskussion, ☒ Mündliche Einzel-/ Gruppenprüfungen, ☐ Essay, ☐ Forumsbeitrag, ☐ Übungen, ☐ Wissenschaftspraktische Tätigkeit, ☐ Bachelor- und Masterarbeit ☒ Haus-/ Seminararbeit, ☒ Einzel-/Gruppenpräsentation, ☐ Portfolio, ☒ Protokoll, ☐ Projektarbeit, ☐ Lerntagebuch/ Lernjournale <u>Umfang der Prüfung:</u> Die Abschlussnote ergibt sich aus der Bewertung der schriftlichen Seminararbeit und dem zugehörigen Vortrag (50%) sowie dem Laborprotokoll (50%). <u>Seminar:</u> Die Notenvergabe erfolgt aufgrund der Bewertung der schriftlichen Seminararbeit (66,6%) und des Vortrags (33,3%). Seminararbeit in Englisch (mit 15 min. Präsentation in Englisch oder Deutsch, sowie 5 min Fragen in Deutsch oder Englisch) <u>Praktikum:</u> Die Notenvergabe erfolgt aufgrund der Bewertung des Praktikumsprotokolls. Praktikumsprotokoll (in Englisch oder Deutsch)
Lernziele	Fachkompetenz Studierende kennen und verstehen die gesetzlichen Regelungen zur Stammzellforschung. Studierende verstehen die Physiologie von Stammzellen. Studierende verstehen Signalnetzwerke und können Zellzyklusregulation in Stammzellen analysieren. Studierende verstehen Stammzelltherapiekonzepte und können diese anwenden. Methodenkompetenz Studierende können folgende Techniken anwenden und beurteilen: <i>Tierexperimentelle Arbeiten</i> Isolierung und Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen aus der Maus mit Hilfe chromatographischer Techniken <i>Proteinchemische Techniken</i>

	(SDS-PAGE, Western Blot, Kinaseassays, Enzymkinetik, IC50 Bestimmungen von Kinaseinhibitoren, Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen) <i>Zellbiologische Techniken</i> Zellviabilitätsbestimmungen (MTT Assays), Differenzierung von Stammzellen, Immunfluoreszenzanalysen <i>Molekularbiologische Techniken</i> RNA Isolierung, cDNA Synthese, PCR, qRT-PCR <i>Immunhistologische Techniken</i> HE-Färbungen IHC-Färbungen Selbst- und Sozialkompetenz Studierende kennen die üblichen Verfahren und Grundsätze wissenschaftlichen Arbeitens in der Stammzellforschung und können diese anwenden. Studierende können selbstständig wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der Stammzellforschung verfassen. Studierende können komplexe Aufgaben in Teams gemeinsam lösen und strukturiert bearbeiten.
Lehrinhalte	Vorlesung (1 SWS): - Eigenschaften von Stammzellen - Stammzellnischen und Stammzellkultur - Leberstammzellen und Tumorstammzellen - Molekulare Mechanismen der Stammzellalterung - Signaltransduktion und Stammzellen - „Small molecule“ Inhibitoren (HDAC- und Kinaseinhibitoren) - Stammzelltherapie Seminar (1 SWS): Seminarwochenende in Rettenberg - Erstellen einer schriftlichen Seminararbeit in Englisch über ein Stammzell-relevantes Thema (Auswahl der vorgegeben Themen möglich) - Powerpointpräsentation der Seminararbeit (während der Wochenendexkursion in Englisch oder Deutsch) Praktikum (ganztägig 1 Woche, 2 SWS) - Praktikumsbezogenes Kurzreferat - Isolierung und Charakterisierung von hämatopoetischen Stammzellen - Analyse von Signaltransduktionswegen

	- Bestimmung der Expression und Aktivität verschiedener Kinasen - Charakterisierung von potentiellen Kinaseinhibitoren (IC₅₀ Bestimmungen) - Nachweis der Expression von Tumorsuppressoren und Stammzellmarkern (Western-Blot-Analysen, Immunfluoreszenzanalysen, Immunhistochemie, quantitative Realtime PCR) - Aufreinigung von rekombinanten Proteinen
Literatur	- Brack AS, Munoz-Canoves P. The ins and outs of muscle stem cell aging. <i>Skelet Muscle</i> 2015;6:1. - Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N. Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. <i>Stem Cell Rev</i> 2016;12(1):54-72. - Chen KG, Mallon BS, McKay RD, Robey PG. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. <i>Cell Stem Cell</i> 2014;14(1):13-26. - Focosi D, Pistello M. Effect of Induced Pluripotent Stem Cell Technology in Blood Banking. <i>Stem Cells Transl Med</i> 2016;5(3):269-74. - Gunes C, Rudolph KL. The role of telomeres in stem cells and cancer. <i>Cell</i> 2013;152(3):390-3. - Keraliya AR, Rosenthal MH, Krajewski KM, Jagannathan JP, Shinagare AB, Tirumani SH, Ramaiya NH. Imaging of Fluid in Cancer Patients Treated With Systemic Therapy: Chemotherapy, Molecular Targeted Therapy, and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. <i>AJR Am J Roentgenol</i> 2015;205(4):709-19. - Lacina L, Plzak J, Kodet O, Szabo P, Chovanec M, Dvorankova B, Smetana K, Jr. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. <i>Int J Mol Sci</i> 2015;16(10):24094-110. - Lewandowski J, Kurpisz M. Techniques of Human Embryonic Stem Cell and Induced Pluripotent Stem Cell Derivation. <i>Arch Immunol Ther Exp (Warsz)</i> 2016. - Lin L, Bolund L, Luo Y. Towards Personalized Regenerative Cell Therapy: Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. <i>Curr Stem Cell Res Ther</i> 2016;11(2):122-30. - Shen S, Xia JX, Wang J. Nanomedicine-mediated cancer stem cell therapy. <i>Biomaterials</i> 2016;74:1-18.

2 Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Gesetzliche Richtlinien	
1.1	Zusammenfassung	4
1.2	Einleitung - Stammzellforschung im internationalen Vergleich	4
1.2.1	Die Vereinten Nationen (UNO/UNESCO)	4
1.2.2	Der Europarat	5
1.2.3	Die Europäische Union	5
1.2.4	Internationale Gesellschaft für Stammzellforschung (ISSCR)	6
1.3	Richtlinien für Stammzellforschung in Deutschland	6
1.3.1	Forschung zu Stammzellen	6
1.3.2	Das Grundgesetz	7
1.3.3	Das Embryonenschutzgesetz in Deutschland	7
1.3.4	Das Stammzellengesetz (StZG)	8
1.4	Richtlinien für Stammzellforschung in der EU	9
1.5	Richtlinien für Stammzellforschung in den USA	14
1.5.1	Einleitung - The Nation Institutes of Health (NIH)	14
1.5.2	Staatliche Richtlinien zur Forschung mit menschlichen embryonalen Stammzellen	15
1.5.3	Rechtsordnungen der Einzelstaaten bezüglich Stammzellforschung	17
1.6	Ausblick	24

Inhalt

1	Einführung	3
2	Adulte Stammzellen	4
2.1	Zweck und Vorkommen.....	4
2.2	Leber.....	4
2.2.1	Funktionen der Leber	4
2.2.2	Makroskopischer Aufbau der Leber	4
2.2.3	Feinbau der Leber.....	5
2.2.4	Leberregeneration.....	6
	Exkurs: Prometheus.....	6
2.2.5	Modelle zur Leberregeneration.....	7
	Streaming Liver	7
	Ovalzell-Modell.....	8
2.2.6	Zusammenfassung.....	10
2.3	Darm.....	10
2.3.1	Funktionen des Darms.....	10
2.3.2	Makroskopischer Aufbau des Darms.....	11
2.3.3	Feinbau des Darms	11
2.3.4	Intestinale Stammzellen	12
	Das "crypt base columnar cell (CBCC)" bzw. LGR5 ⁺ Modell	12
	Das „label-retaining cells +4 (LRC+4)" Modell	13
2.3.5	Einsatz von intestinalen Stammzellen in der regenerativen Medizin	14
2.4	Skelettmuskel	15
2.4.1	Funktion und makroskopischer Aufbau des Skelettmuskels.....	15
2.4.2	Feinbau des Skelettmuskels	15
2.4.3	Stammzellen und Regeneration	16
2.4.4	Therapeutischer Einsatz von Satellitenzellen.....	18
2.5	Knochenmark	18
2.5.1	Funktion und makroskopischer Aufbau des Knochenmarks	18
2.5.2	Hämatopoetische Stammzellen	18
2.5.3	Knochenmark-/Stammzelltransplantation	19
	Knochenmark-/Stammzellspende	20
	Ablauf der Stammzelltransplantation	20
2.6	Stammzellplastizität	23
3	Tumorstammzellen.....	23
3.1	Das Tumorstammzell-Modell	23
3.2	Identifizierung von Tumorstammzellen	24
3.3	Auswirkungen auf die Tumorthherapie.....	25
4	Ausgewählte Literatur	27
	Lizenzhinweise.....	28

Content

List of Abbreviations.....	iii
Abstract	1
1. Introduction.....	2
2. Three Models for Cancer Stem Cell Heterogeneity.....	4
a. Clonal Evolution Model.....	4
b. Cancer Stem Cell Model	5
c. Cellular Plasticity	6
3. Cross Talk between Cancer Stem Cells and Their Niches.....	7
a. Cancer-associated fibroblasts	8
b. Mesenchymal Stem Cells	9
c. Inflammatory Cells.....	11
d. Hypoxia and Angiogenesis.....	14
e. ECM-Cell Interactions and Cell-cell Contact	15
4. The Primary Tumor Microenvironment and the Metastatic Niche.....	17
a. Metastatic Cancer Stem Cells and Cancer Cell Intravasation.....	18
b. The Pre-metastatic Niche and Metastatic Niches.....	20
5. Stem Cell Niche as a Target for Cancer Therapy	24
a. A Challenge: Therapy Resistance of Cancer Stem Cells	24
b. Targeting the Microenvironment of Cancer Stem Cells	25
6. Concluding Remarks.....	29
7. Publication bibliography	1

Inhaltsverzeichnis

1	Résumé	1
2	Einführung	1
2.1	Charakterisierung der Stammzellen	1
2.2	Das Prinzip der Stammzellnische	2
3	Model der Haarfollikelstammzellnische	4
3.1	Grundlagen zum Haar	4
3.2	Aufbau des Haarfollikels	5
3.3	Regeneration des Haarfollikels	8
3.4	Identifikation der adulten Stammzellen im Haarfollikel	11
3.5	Plastizität der Haarfollikelstammzellen	17
3.6	Fazit und Ausblick	18
4	Model der Brustdrüsenstammzellnische	19
4.1	Aufbau der Brustdrüse	19
4.2	Zyklen der Brustdrüse	21
4.3	Identifikation der Stammzellnische und Lokalisation der Stammzellen	22
4.4	Brustdrüsenstammzellnische	25
4.5	Fazit und Ausblick	28

Outline

Outline	II
List of abbreviations	III
Abstract	1
1 Introduction	2
1.1 Self-renewal	3
1.2 Post-transcriptional mechanisms	4
2 Stem Cell system in Tissue Homeostasis and Oncogenesis	5
2.1 Hematopoietic Stem Cells	6
2.2 Intestinal stem cells	6
2.3 Cancer Stem Cells	6
3 Developmental Signals Regulating Stem Cell Self-Renewal	8
3.1 Wnt/ β -catenin pathway	8
3.2 Notch Signaling	10
4 RNA-binding Proteins: The Emerging Players in Stem Cell Regulatory Network	12
4.1 Overview	12
4.2 Heterogeneous Ribonucleoprotein E2 (hnRNP E2)	13
4.3 IGF2BP Family	14
4.3.1 IGF2BP1	14
4.3.2 IGF2BP2	16
4.3.3 IGF2BP3	16
4.4 LIN28	17
4.5 Musashi Family	20
4.5.1 Musashi 1	20
4.5.2 Musashi 2	22
4.6 HuR	23
4.7 Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E	25
5 Summary and Outlook	27
Literature	V
List of figures and tables	XIV

List of contents

List of contents	1
List of abbreviations	2
1. Introduction	5
2. Tumour development and carcinogenesis	9
3. Stem cells and important signaling pathways	12
3.1 Stem cells in the normal tissue	15
3.2. Important signal transduction pathways in stem cells	17
3.2.1 Basic mechanism of signal transduction inside the cell	18
3.2.2.1 The Notch pathway	21
3.2.2.2 The Hedgehog (HH) pathway	24
3.2.2.3 The Wnt pathway	26
4. Connection between cancer and stem cells: The concept of cancer stem cells	30
4.1 Definition of cancer stem cells	30
4.2 Stem cells in cancerous tissue	31
4.3 Models of cancer stem cells promoted tumour growth	34
4.4 Identification of cancer stem cells	36
5. Cancer stem cells and tumour therapy	43
5.1 Targeting of the Notch pathway in cancer stem cells	44
5.2 Targeting of the Hedgehog pathway in cancer stem cells	48
5.3 Targeting of the Wnt pathway in cancer stem cells	51
6. Outlook	54
References	58

Inhalt

1	Motivation: Regenerative Medizin.....	1
2	Identifizierung und Charakterisierung von (Tumor-)Stammzellen.....	2
2.1	<i>In vitro</i> Nachweismethoden	2
2.1.1	Nachweis der Selbsterneuerungsfähigkeit.....	2
	Colony-Formation Assay.....	2
	Sphere-Formation Assay.....	2
2.1.2	Nachweis der Differenzierungsfähigkeit	3
	Differenzierungs-Assay	3
2.1.3	Nachweis der Metastasierungsfähigkeit	4
	Cell Migration Assay.....	4
2.1.4	Nachweis spezifischer Stammzellmarker	5
2.2	<i>In vivo</i> Nachweismethoden	6
2.2.1	Nachweis der Selbsterneuerungsfähigkeit.....	6
	Xenotransplantations-Assay.....	6
2.2.2	Nachweis der Migrationsfähigkeit.....	7
	Injektions-Assay.....	7
2.2.3	Nachweis der Differenzierungsfähigkeit	8
	Fate-Mapping / Lineage-Tracing.....	8
2.3	Zusammenfassende Betrachtung.....	9
3	Aufreinigung von Stammzellen	10
3.1	Flourescence-assisted cell scanning/sorting (FACS).....	10
3.2	Magnetic-activated cell sorting (MACS)	15
4	Kultivierung von Stammzellen.....	15
4.1	Embryonale Stammzellen.....	15
4.1.1	Gewinnung von embryonalen Stammzellen	15
	<i>In vitro</i> Fertilisation (IVF)	16
	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).....	16
	Somatischer Zellkerntransfer	16
4.1.2	Kultivierung von embryonalen Stammzellen	17
4.2	Adulte Stammzellen	18
4.2.1	Gewinnung von adulten Stammzellen	18
4.2.2	Kultivierung von adulten Stammzellen	18
5	Induzierte pluripotente Stammzellen	19
5.1	Die Reprogrammierungs-/Yamanaka-Faktoren	20
5.2	Ablauf der Reprogrammierung.....	21
5.3	Alternative Methoden zur Reprogrammierung	22
5.4	Probleme in der Verwendung von iPSCs	23
6	„Take home messages...“	24
7	Ausgewählte Literatur	25
	Lizenzhinweis.....	25

Causes, consequences, and reversal of immune system aging

by *Nadja Raab*

EDITED BY UWE KNIPPSCHILD

Table of contents

1. Introduction – The human immune system	2
1.1 Innate and adaptive immunity	2
1.1.1 Cells of innate immunity	2
1.1.2 Cells of adaptive immunity	3
1.1.3 General course of innate and adaptive immune responses.....	5
1.2 HSCs and Hematopoiesis	6
1.3 Objectives of this work	9
2. Immune system aging	10
2.1 Causes and consequences of innate immune system aging	10
2.1.1 Age-related changes of neutrophils	11
2.1.2 Age-related changes of dendritic cells.....	11
2.1.3 Age-related changes of macrophages	12
2.1.4 Age-related changes of NK cells	13
2.1.5 Age-related changes of mast cells	13
2.2 Causes and consequences of adaptive immune system aging	14
2.2.1 Age-related changes of lymphopoiesis.....	14
2.2.2 Age-related changes of T cells	17
2.2.3 Age-related changes of B cells	18
2.3 Causes and consequences of zinc deficiency	19
2.4 Causes and consequences of inflamm-aging	20
2.5 Renewal of the aged immune system	23
2.5.1 Reversal of thymus involution	23
2.5.2 Zinc supplementation	24
2.5.3 Caloric restriction.....	25
3. Summary	26
4. Annex	27
4.1 Bibliography.....	27
4.2 List of abbreviations	29

I Table of content

II Abbreviations.....	2
1 Introduction.....	4
2 The interrelation of Klotho, stem cells and aging	6
2.1 Klotho	7
Structure and expression of <i>Klotho</i> gene	7
The localization of <i>Klotho</i> gene expression.....	9
2.2 Klotho protein functions	12
2.2.1 The role transmembrane Klotho.....	12
Klotho and endocrine FGFs	13
The regulation of phosphate metabolism	15
2.2.2 The role of soluble Klotho	18
Klotho acts as glucuronidase and regulates ion channel activity	19
Klotho prevents dehydration (and down regulates Ald and ADH)	21
Suppression on Insulin/IGF signalling pathway.....	22
Suppression on oxidative stress.....	23
Suppression of Wnt signaling.....	25
Suppression of breast cancer	25
2.3 The effect of Klotho over expression versus Klotho deficiency.....	26
Klotho over expression results in extended life span.....	26
Klotho deficiency results in premature aging and cellular senescence.....	29
2.4 Stem cells and aging	30
Stem cells are effected by Klotho	32
Klotho deficiency causes stem cell senescence and depletion through up regulation of the Wnt signalling pathway.....	32
The promoting effect of Klotho on autophagy	33
3 Conclusion	35
4 Outlook.....	36
Replacement of Klotho as a possible anti aging strategy	36
Administration of exogenous Klotho	37
Activation of endogenous Klotho.....	38
4 Summary.....	39
5 References.....	41

Contents

Contents.....	II
List of abbreviations.....	I
List of figures and tables	III
 Abstract	 1
1 Introduction	3
2 Telomere.....	4
2.1 Structure	4
2.2 The end-replication problem	7
3 Telomerase	9
3.1 Elongation process	9
3.2 Alternative elongation mechanism	10
3.3 Complex regulation	11
3.4 Dependency of telomerase on TERT and TERC showed in animal models	12
4 Ageing, telomere length and cell cycle arrest: causal or correlative?	14
4.1 Hayflick limit	14
4.2 How dysfunctional telomeres trigger cell cycle arrest	14
5 Development of different cell types concerning telomere length	17
5.1 Normal cells	17
5.2 Cancer.....	17
5.3 Stem cells	18
6 Effects of telomerase dysfunction and telomere shortening	20
6.1 DNA damage	20
6.2 Ageing	21
6.3 Diseases	21
6.4 Cancer.....	22
7 Novel therapeutic approaches	26
7.1 Telomerase-induced therapy against cancer.....	26
7.2 Therapeutic approach against telomerase-deficient diseases	27
8 Telomere biology services and telomere protection products	28
9 Conclusion and outlook.....	29
References	i-x
 Attachment: Presentation	

Table of Contents

Abstract.....	I
Table of Contents	II
Abbreviations.....	III
1. Introduction	1
2. Telomerase.....	5
3. Shelterin complex	8
4. The telomere interactome	11
4.1 DNA repair signaling pathways and cell cycle control.....	13
4.1.1 ATM and ATR.....	13
4.1.2 RTEL1.....	15
4.1.3 EB1 and tankyrase.....	16
4.1.4 ERCC1/XPF.....	17
4.1.5 MRN complex.....	19
4.1.6 WRN and BLM helicases.....	19
4.1.7 PARP 1/2	20
4.1.8 Ku 70/80.....	21
4.1.9 SIAH2.....	21
4.1.10 CBX3.....	22
4.1.11 UPF1 and OBFC1.....	22
4.2 Other non-telomeric functions of telomeric proteins.....	23
5. Telomere syndromes.....	24
5.1 Telomere shortening syndromes	24
5.1.1 Dyskeratosis congenita and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome	25
5.1.2 Aplastic anemia and similar diseases	26
5.1.3 Nijmegen breakage syndrome and Ataxia-telangiectasia	27
5.1.4 Werner and Bloom syndromes	27
5.1.5 Idiopathic pulmonary fibrosis	28
5.2 Long telomere syndromes.....	28
5.3 Other cancer-predisposition syndromes.....	30
6. Summary and conclusion	31
Literature	i

Mechanisms that regulate stem cell aging and life span

by Ruben Daum

edited by Uwe Knippschild

Index of contents

1. INTRODUCTION	2
1.1 STEM CELL AGING	2
1.2 STEM CELL MAINTENANCE, QUIESCENCE AND SENESENCE	3
2. CELL INTRINSIC REGULATIONS OF STEM CELL MAINTENANCE	4
2.1 GATE-KEEPING TUMOR SUPPRESSORS	4
2.2 CARE-TAKING TUMOR SUPPRESSORS	7
2.3 REGULATION OF ROS LEVELS.....	9
2.4 TELOMERE MAINTENANCE	11
2.5 PROTEOSTASIS.....	12
3. CELL EXTRINSIC REGULATIONS OF STEM CELL MAINTENANCE.....	13
3.1 NICHE SIGNALS	13
3.2 DIETARY RESTRICTION AND MTOR SIGNALING.....	14
3.3 LONG RANGE SIGNALS.....	16
4. REGULATION OF STEM CELL AGING CHANGES OVER TIME	18
5. CONCLUSION	20
6. LIST OF ABBREVIATIONS	21
7. REFERENCES	22

Contents

List of abbreviations.....	I
List of Figures and Tables	IV
Abstract	V
1. Introduction	1
1.1 The concept of stem cells	1
1.2 Stem cells and aging	2
2. Characteristics and consequences of stem cell aging	4
2.1 Hematopoietic stem cells.....	4
2.2 Intestinal stem cells	6
2.3 Satellite cells.....	7
2.4 Neural stem cells	8
2.5 Skin stem cells	9
2.6 Germline stem cells	11
3. Causes of stem cell aging	13
3.1 Telomere attrition	13
3.2 Cellular senescence.....	15
3.3 DNA damage and mutations.....	17
3.4 Epigenetic alterations	20
3.5 Nutrient sensing and metabolism	22
3.5.1 Caloric restriction.....	22
3.5.2 Reactive Oxygen Species.....	24
3.5.3 Mitochondrial dysfunction.....	25
3.6 Cell polarity and proteostasis	26
3.7 Niche deterioration and circulating factors	28
3.8 Cell survival, selection and fitness	29
4. The impact of stem cell aging on longevity	31
5. Rejuvenation through reprogramming.....	32
6. Future directions	33
References	34

Table of Contents

Abstract	I
Table of Abbreviations.....	III
Table of Figures	V
1 Preface.....	1
1.1 Prostate Cancer.....	1
1.2 Prostate Cancer Treatments.....	4
2 Stem Cell Based Gene Therapy	8
2.1 Stem Cell Sources	8
2.1.1 Mesenchymal Stem Cells.....	8
2.1.2 Neural Stem Cells.....	10
2.1.3 Further Stem Cells.....	10
2.2 Migration and Homing of SCs	11
2.3 Transduction of MSCs and NSCs	12
2.4 Prodrug Converting Enzymes Systems	13
2.5 Further Antitumour Agents	14
2.6 Bystander Effect.....	15
2.7 Stem Cell Tracking.....	16
2.8 Clinical Studies	17
3 Discussion, Outlook and Further Investigations	19
3.1 Discussion	19
3.2 Outlook and Further Investigations.....	21
Statement of Authorship.....	24
Reference List	25

Table of Contents

List of abbreviations	3
Summary	5
I. Introduction.....	6
1.1 Coronary heart disease – common facts.....	6
1.2 Development of CHD.....	6
1.3 Symptoms and risk factors of CHD	8
1.3.1 Symptoms.....	8
1.3.2 Reasons.....	8
1.4 Mesenchymal stem cells	9
1.5 Conventional therapies for CHD.....	11
1.5.1 Medical therapy.....	12
1.5.2 Percutaneous coronary intervention (PCI).....	12
1.5.3 Coronary artery bypass graft (CABG)	13
II. Differentiation strategies	14
2.1 Preliminary note	14
2.2 Biochemical induction	14
2.2.1 5-Azacytidine	14
2.2.2 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2).....	16
2.2.3 Angiotensin-II (Ang-II).....	18
2.3 Myocardial microenvironment.....	20
2.3.1 <i>In vivo</i>	20
2.3.2 <i>In vitro</i>	21
2.4 Genetic modifications	23
2.4.1 Improvement of cell survival and anti-apoptosis.....	24
2.4.2 Stem cell homing.....	24
2.4.3 Improvement of angiogenesis.....	25
III. MSC-based clinical therapeutic approaches for myocardial infarction	27
3.1 Which is the suitable time for transplantation after myocardial infarction?	27
3.2 What is the most efficient concentration of injected cells?	27
3.3 Delivery route of MSCs.....	28
3.3.1 Intracoronary artery injection	28
3.3.2 Intramyocardial injection	28
3.3.4 Tissue engineering technology.....	29

IV.	Optimization of the differentiation rate	30
V.	Conclusion	31
VI.	Bibliography.....	32
VII.	List of figures	37

Table of contents

List of abbreviations	iii
1 Introduction.....	1
1.1 Musculoskeletal system.....	1
1.2 Musculoskeletal disorders	1
1.3 Economic burden of musculoskeletal diseases	2
1.4 Regenerative Medicine.....	3
1.4.1 Tissue Engineering.....	3
1.5 Mesenchymal Stem Cells in Musculoskeletal Tissue Engineering.....	4
1.5.1 Introduction.....	4
1.5.2 Identification	4
1.5.3 Sources	5
1.5.4 Self-renewal and proliferation Capacity	5
1.5.5 Musculoskeletal differentiation and plasticity.....	6
1.5.6 Immunogenicity and safety.....	6
2 Bone.....	7
2.1 Physiology	7
2.2 Natural regeneration capacity.....	7
2.3 Conventional therapy	8
2.3.1 Distraction osteogenesis	8
2.3.2 Masquelet technique	8
2.3.3 Bone grafting	9
2.4 Regenerative Medicine approaches	10
2.4.1 Cells	10
2.4.2 Signaling molecules	10
2.4.3 Scaffold	11
2.4.4 <i>In vitro</i> vs <i>in vivo</i>	11
2.4.5 Conclusion	12
3 Hyaline cartilage	13
3.1 Physiology	13

3.2	Natural Regeneration capacity	14
3.3	Osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA)	15
3.3.1	Osteoarthritis	15
3.3.2	Rheumatoid arthritis	16
3.3.3	Therapy.....	16
3.4	Conventional Therapy.....	17
3.4.1	Debridement	17
3.4.2	Mosaicplasty.....	17
3.4.3	Microfracture	18
3.4.4	Autologous chondrocyte transplantation (ACT)	18
3.4.5	Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation (MACT)	19
3.4.6	Autologous matrix induced chondrogenesis (AMIC)	20
3.5	Regenerative Medicine approaches	20
3.5.1	Conclusion	24
4	Tendon.....	25
4.1	Physiology	25
4.2	Natural Regeneration	26
4.3	Conventional Therapy.....	27
4.3.1	Suture Repair.....	27
4.3.2	Grafts	27
4.4	Regenerative medicine approaches	28
4.4.1	Conclusion	29
5	Summary	30
6	References.....	31

I. Table of Content

I. Table of Content.....	II
II. List of Abbreviations	IV
III. List of Figures and Tables	VI
Abstract	VIII
1 Introduction.....	1
2 Spinal Cord Injury (SCI)	2
2.1 Pathophysiology of SCI.....	2
2.1.1 Primary Injury Phase	2
2.1.2 Secondary Injury Phase	2
2.2 Therapeutic Options	4
2.3 Animal Model for SCI: <i>Shiverer</i> Mouse	4
3 Stem Cell Definitions	5
3.1 Self-Renewal of Stem Cells.....	5
3.2 Differentiation	5
3.3 Transdifferentiation	7
4 Potential of Stem Cells for Spinal Cord Repair	8
5 Central Concepts of Stem Cell-Based Therapies for SCI.....	9
5.1 Neural Cell Replacement in the Injured Spinal Cord.....	9
5.2 Regenerative Approaches for Spinal Cord Repair	10
5.2.1 Neuroprotection and Preventing Apoptosis.....	10
5.2.2 Axon Regeneration and Myelin Formation	10
5.2.3 Proteins with Potential for Regenerative Approaches	10

6	Stem Cell-based Therapies for SCI	13
6.1	Human Embryonic Stem Cell (hESC) Therapy	13
6.2	Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Therapy	15
6.3	Adult-derived Neural Stem Cell (NSC) Therapy	17
6.4	Mesenchymal Stem Cell (MSC) Therapy	18
6.5	Hematopoietic Stem Cell (HSC) Therapy	19
6.6	Stem Cell-like Olfactory Ensheathing Cell (OEC) Therapy	19
7	Gene Carriers and Alternative Methods for Reprogramming	21
8	Strategies for Optimizing the Therapeutic Effect of Stem Cells in SCI	22
8.1	Administration Route and Location of Injection.....	22
8.2	Timing of Stem Cell Transplantation	23
8.3	Molecular Imaging	23
9	Clinical Application of Stem Cells in SCI	25
10	Ethical and Social Concerns.....	27
11	New Trends in Stem Cell-based Therapies for SCI	28
11.1	Stem Cell Therapy in Combination with Gene Therapy	28
11.2	Stem Cell Therapy in Combination with Tissue Engineering Scaffolds.....	28
11.3	Combination of Different Types of Stem Cells.....	29
12	Conclusion.....	30
13	References	i
14	Appendix	v

Contents

Abstract.....	I
List of abbreviations	III
List of figures and tables.....	V
1 Introduction	1
2 Pathophysiology of myocardial infarction and conventional treatment	2
2.1 Current therapies for myocardial infarction (MI).....	4
3 Stem cell therapy for heart regeneration and repair.....	6
3.1 Endogenous mobilization of stem and progenitor cells	7
3.2 Stem cell transplantation	8
3.2.1 General requirements for stem cell transplantation	8
3.2.2 Stem cells used for transplantation.....	9
3.2.3 Methods for cell delivery to myocardium.....	17
3.2.4 Hurdles in stem cell transplantation.....	20
4 Strategies to improve the efficacy of stem cell therapy for heart regeneration and repair ..	21
4.1 Optimizing host myocardium	22
4.1.1 Revascularization	22
4.1.2 Anti-inflammation techniques	23
4.1.3 Reactive oxygen species (ROS) scavengers.....	24
4.1.4 Supply of extracellular matrices (ECM)	24
4.2 Cellular protection	25
4.2.1 Pretreatment of stem cells.....	25
4.2.2 Preconditioning of cells	28
5 Conclusion and future outlook of stem cell therapy for heart regeneration and repair	30
6 References.....	33

Content

List of figures	
Abbreviations	
Abstract	1
1. Introduction.....	2
2. Tissue Development.....	3
2.1. Development of ES Cells	3
2.2. The Three Germ Layers	4
2.2.1. Ectoderm.....	4
2.2.2. Mesoderm	4
2.2.3. Endoderm.....	5
2.3. MET and EMT	5
2.4. Gene regulatory networks and epigenetics	6
3. Cellular Reprogramming.....	7
3.1. Reprogramming methodes.....	7
3.2. Reprogramming via transcription factors.....	10
3.3. Reprogramming via small molecules.....	13
3.4. Reprogramming via miRNAs	14
3.4.1. miRNAs	14
3.4.2. miRNA 302/367 Cluster.....	16
3.4.3. miRNA-200c / miRNA-302 family / miRNA-369 family	18
3.4.4. MiRNA-34a and tumor suppressor p53.....	19
3.5. Direct Lineage Reprogramming.....	21
3.5.1. Induced Neuronal Stem Cells.....	21
3.5.2. Induced Cardiomyocyte-Like Cells.....	22
3.5.3. Induced Osteoblast-Like Cells.....	23

4. Application of reprogrammed cells	24
4.1. Regenerative Medicine / Transplantation	24
4.2. Disease Model.....	25
4.3. Combination of cellular reprogramming and genome editing therapies.....	26
5. Conclusion and Outlook	28
References	30

OUTLINE

List of abbreviations	I
Abstract.....	1
1 Introduction.....	2
1.1 Stem cells	2
2 Hematopoietic Stem Cell Transplantation	4
2.1 Procedure of HSCT	4
2.2 HSCT Mechanisms	7
2.2.1 Immunosuppressive conditioning	7
2.2.2 Immune-mediated destruction of autoreactive lymphocytes	9
2.2.3 Mixed chimerism as an approach to tolerance induction	10
2.2.4 Blockade of costimulatory signaling pathways.....	11
2.2.5 Regulatory T cells	12
2.2.6 Toleration of B cells.....	13
3 Autoimmune diseases.....	15
3.1 Multiple sclerosis.....	15
3.2 Connective tissues disease	18
3.2.1 Systemic sclerosis (SSc).....	18
3.2.2 Systemic lupus erythematosus.....	22
3.3 Crohn's disease	25
3.4 Type 1 diabetes mellitus.....	27
4 Conclusion & Outlook	29
List of figures.....	III
Publication bibliography.....	IV

Table of contents

1 Introduction	2
2 Most common liver diseases.....	3
2.1 Liver cirrhosis & alcoholic liver disease.....	3
2.2 Liver cancer	6
2.3 Hepatitis	6
3 Liver transplantation & potential stem cell types for therapy.....	7
3.1 Liver transplantation.....	7
3.2 Mesenchymal stem cells (MSCs).....	10
3.3 Hematopoietic stem cells (HSCs).....	12
3.4 Liver stem progenitor cells (LSPCs).....	12
3.5 Induced pluripotent stem cells (iPSC)	13
4 Methods and technologies for stem cell-based therapies	15
4.1 Hepatocyte Culture Techniques	16
4.1.1 Embryonic stem cells (ESCs)	18
4.1.2 Induced pluripotent stem cells (iPSCs).....	19
4.1.3 Liver stem progenitor cells (LSPCs)	21
4.1.4 Mesenchymal stem cells (MSCs)	23
4.2 Cell sheet approach & 3D culture systems for tissue engineering	24
4.3 Bioartificial liver	26
5 Current status of clinical trials.....	28
6 Comparison of advantages and risks in the use of stem-cell based therapies as an alternative for liver transplantation.....	29

Table of content

I	List of abbreviations	III
II	List of figures	V
III	List of tables	V
1.	Abstract.....	1
2.	Introduction	2
3.	Isolation of ASCs from adipose tissue.....	4
3.1	Structure of adipose tissue	4
3.2	Collection of adipose tissue.....	5
3.3	Isolation of ASCs.....	7
4.	Characteristics of ASCs	9
4.1	Phenotype and niche of ASCs	9
4.2	Secretory and immunomodulatory properties of ASCs.....	10
4.3	Proliferation capacity and culture	13
5.	Differentiation potential of ASCs	15
5.1	Mesodermal pathway differentiation.....	15
5.2	Non-mesodermal pathway differentiation	18
5.3	Assessment of multipotency.....	20
6.	Application of ASCs in cell-based therapies.....	21
6.1	Properties of ASCs for clinical use	21
6.2	ASCs in clinical studies	21
6.2.1	Fat reconstruction	22
6.2.2	Wound healing.....	24
6.2.3	Bone regeneration	24
6.2.4	Cartilage regeneration	25
6.2.5	Ischemic injury	26
6.2.6	Immune disorders	27
6.3	Problems in clinical use of ASCs.....	29
7.	Conclusion	30
8.	References.....	VI

3 Leseprobe

1

Gesetzliche Richtlinien der Stammzellforschung in Deutschland, der EU und den USA

1.1	Zusammenfassung	4
1.2	Einleitung - Stammzellforschung im internationalen Vergleich	4
1.3	Richtlinien für Stammzellforschung in Deutschland	6
1.4	Richtlinien für Stammzellforschung in der EU	9
1.5	Richtlinien für Stammzellforschung in den USA	14
1.6	Ausblick	24

1.1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die Forschung mit Stammzellen, insbesondere die embryonale Stammzellforschung wurde schon immer heftig diskutiert. Da die Forschung mit adulten Stammzellen meist wenig kontrovers ist, wird diese in den meisten Ländern erlaubt und gefördert. Im Gegensatz hierzu steht die Forschung mit embryonalen Stammzellen, welche immer mit ethischen und moralischen Fragen in Verbindung gebracht wird. Weder in der Europäischen Union, noch in den USA gibt es einheitliche Regelungen zu Umgang und Forschung mit embryonalen Stammzellen. Es gibt Versuche Richt- und Leitlinien zu definieren, um die Forschung mit embryonalen Stammzellen moralisch und ethisch vertretbar zu machen. Allgemein betrachtet unterscheiden sich die Gesetze bezüglich der Stammzellforschung darin, ob die Forschung prinzipiell erlaubt wird, aus welchen Quellen das Material stammen darf, ob ein möglicher Import oder Export genehmigt wird und wie die Forschung finanziert wird. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die aktuellen Rechtslagen in Deutschland, der EU und den USA geben und die Unterschiede in der Handhabung von Stammzellforschung wiedergeben.

1.2 Einleitung - Stammzellforschung im internationalen Vergleich

International gesehen existieren keine einheitlichen Regelungen zur Forschung mit (embryonalen) Stammzellen. Es gibt jedoch Bemühungen durch verschiedene Institutionen, wie den Vereinten Nationen oder der Europäischen Union, Regelungen bezüglich Klonierung und Forschung mit embryonalen Stammzellen zu finden.

1.2.1 Die Vereinten Nationen (UNO/UNESCO)

Die UNESCO stellt das „International Bioethics Committee“ (IBC), welches sich mit der Regelung der Forschung an embryonalen Stammzellen beschäftigt. In ihrem Report „The use of Embryonic Stem Cells in Therapeutic Research“ vom 6. April 2001 spricht das Komitee von einer ethischen Frage bezüglich der embryonalen Stammzellforschung, welche auf nationaler Ebene individuell geregelt werden muss. Die nationalen Debatten sollen staatlich gefördert sowie frei und öffentlich gestaltet sein. In Ländern, in welchen die embryonale Stammzellforschung zugelassen ist, soll diese staatlich reguliert und überwacht sein. Die Forschung an überzähligen Embryonen sei auf jeden Fall an die Zustimmung der Spender zu knüpfen. Ebenfalls soll zur Entscheidung über Forschungsvorhaben mit embryonalen Stammzellen ein Ethikkomitee herangezogen werden. Alternative Techniken zur Stammzellgewinnung sollen ausgeschlossen sein [10],

1.2 Einleitung - Stammzellforschung im internationalen Vergleich

1.2.2 Der Europarat

1997 wurde den Mitgliedsstaaten das „Übereinkommen zum Schutz der Menschenrechte und der Menschenwürde im Hinblick auf die Anwendung von Biologie und Medizin“ zur Unterzeichnung vorgelegt. Dieses Übereinkommen besagt, dass „die Erzeugung menschlicher Embryonen zu Forschungszwecken verboten“ ist. Auf diesem Weg soll der Embryo angemessen geschützt werden, sofern Forschung an Embryonen zugelassen wird. Jedoch wird der Begriff des „angemessenen Schutzes“ nicht weiter erläutert. Somit liegt es bei den Mitgliedsstaaten die Forschung genauer zu definieren. Eine interessante Tatsache ist, dass u.a. Deutschland eines der wenigen Länder ist, welches dieses Übereinkommen noch nicht unterzeichnet hat (Stand 20.11.2012) [11].

1.2.3 Die Europäische Union

Die Europäische Kommission, ein Organ der Europäischen Union, gründete die „Europäische Gruppe für Ethik der Naturwissenschaften und der neuen Technologie (EGE)“. Im Februar 2000 veröffentlichte diese Gruppe eine „Stellungnahme zu den ethischen Aspekten der Forschung und der Verwendung embryonaler Stammzellen“, welche besagt, dass es jedem Mitgliedstaat selbst überlassen ist die Embryonenforschung zuzulassen oder zu verbieten. Falls Forschungen an embryonalen Zellen erlaubt werden, müssen die Achtung der Menschenwürde, kein willkürliches Experimentieren und die Vorbeugung einer „Instrumentalisierung menschlicher Embryonen“ garantiert sein. Ebenfalls muss bei einer Zulassung eine öffentliche Kontrolle durch eine zentrale Stelle gewährleistet sein. Die Erzeugung von Embryonen zu Forschungszwecken sei ethisch nicht vertretbar, falls überzählige Embryonen aus *in-vitro*-Fertilisationen zur Verfügung stehen. Die Gruppe steht auch dem Zellkerntransfer zur Embryoerzeugung kritisch gegenüber, da andere Methoden, beispielsweise die Gewinnung von Zellen aus fetalem Gewebe oder die Nutzung von adulten Stammzellen zur Forschung, durchaus verwendet werden können. Der Europäische Gerichtshof beschäftigte sich ebenfalls ganz aktuell mit der Frage nach der Patentierbarkeit von Stammzellen. In diesem Urteil wurden verschiedene Punkte herausgearbeitet: „Jede menschliche Eizelle vom Stadium ihrer Befruchtung an, jede unbefruchtete menschliche Eizelle, in die ein Zellkern aus einer ausgereiften menschlichen Zelle transplantiert worden ist, und jede unbefruchtete menschliche Eizelle, die durch Parthenogenese zur Teilung und Weiterentwicklung angeregt worden ist, ist ein ‚menschlicher Embryo‘.“ Das Urteil besagt, dass Erfindungen basierend auf Embryonen für eine kommerzielle oder industrielle Nutzung nicht patentiert werden können, ebenso wie die „Verwendung zu Zwecken der wissenschaftlichen Forschung, und nur die Verwendung zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken, die auf den menschlichen Embryo zu dessen Nutzen anwendbar ist (...).“ Ebenfalls von der Patentierbarkeit ausgeschlossen sind Erfindungen, „wenn die technische Lehre, die Gegenstand des Patentantrags ist, die vorhergehende Zerstörung menschlicher Embryonen oder deren Verwendung als Ausgangsmaterial erfordert, in welchem Stadium auch immer die Zerstörung

1.3 Richtlinien für Stammzellforschung in Deutschland

oder die betreffende Verwendung erfolgt, selbst wenn in der Beschreibung der beanspruchten technischen Lehre die Verwendung menschlicher Embryonen nicht erwähnt wird“ [11].

Am 27. November 2012 entschied der Bundesgerichtshof, dass weiterhin keine Patente auf menschliche Stammzellen aus Embryonen angemeldet werden können. Jedoch gab es einen Teilerfolg für den Neurobiologen Oliver Brüstle: Falls Stammzellen aus Embryonen gewonnen werden können, ohne diese zu zerstören, bleibt der Patentschutz von Herr Brüstle bestehen.

Laut dem Urteil des Bundesgerichtshofs kann der Einsatz von menschlichen embryonalen Stammzellen und die Verwendung von Embryonen nicht gleichgesetzt werden, da Stammzellen nicht die Fähigkeit aufweisen „den Prozess der Entwicklung eines Menschen in Gang zu setzen“. Auch die Tatsache, dass dies durch mögliche Kombination mit anderen Zellen der Fall sein könnte, reicht nicht aus, um sie vor dieser Behandlung als Embryonen anzusehen [3].

1.2.4 Internationale Gesellschaft für Stammzellforschung (ISSCR)

In Jahr 2002 wurde die „Internationale Gesellschaft für Stammzellforschung“ (ISSCR) ins Leben gerufen. Die Gesellschaft ist unabhängig und gemeinnützig und fördert den Austausch über Stammzellforschung. 2006 wurde ein Katalog über „Standards für die Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen“ herausgebracht. Forscher, die mit embryonalen Stammzellen arbeiten, sollen sich per Selbstverpflichtung an diese Standards halten. Es soll vom Klonen von Menschen zu Reproduktionszwecken abgesehen und nur unter strengen Auflagen das Herstellen von Chimären erlaubt werden. Die ISSCR will damit erreichen, dass nur noch solche Studien in namhaften Zeitschriften publizieren, die sich an diesen Standards orientieren [10].

1.3 Richtlinien für Stammzellforschung in Deutschland

1.3.1 Forschung zu Stammzellen

Der Einsatz adulter Stammzellen ist seit Jahren in Deutschland etabliert. Diese dienen als alternativer Therapieansatz, da es möglich ist fast undifferenzierte Zellen zu isolieren, sodass diese sich zu unterschiedlichen Zelltypen weiterentwickeln können. Normalerweise haben diese Zellen im Körper die Funktion der Regeneration und Reparatur. Im Gegensatz hierzu stehen die embryonalen Stammzellen, welche bisher nur durch Zerstörung eines Embryos gewonnen werden können; jedoch ist dieser Schritt in Deutschland strafbar. Deshalb konzentriert sich die Forschung auf Alternativen zur Gewinnung embryonaler Stammzellen. Es werden also Stammzellen mit einem ähnlichen Entwicklungspotential wie embryonale Stammzellen gesucht. Ein Schwerpunkt liegt auf der Gewinnung und dem Erhalt von toti- und multipotenten Stammzellen, die ein ähnliches Potential haben wie embryonale Stammzellen, sich jedoch nicht mehr in ein eigenständiges Individuum entwickeln können. Forschungsschwerpunkte liegen hier bei der

1.3 Richtlinien für Stammzellforschung in Deutschland

Reprogrammierung von adulten menschlichen Zellen, sowie bei der Nutzung von natürlich vorkommenden multi- und pluripotenten Zellen. Es ist zu erwähnen, dass in manchen Projekten embryonale Stammzellen verwendet werden. Die entsprechenden Projekte wurden vom Robert-Koch-Institut (zuständige Behörde) überprüft und stehen nicht im Konflikt mit dem Embryonenschutzgesetz oder dem Stammzellgesetz [2].

1.3.2 Das Grundgesetz

Der erste Abschnitt des ersten Artikels des Grundgesetzes besagt, dass „die Würde des Menschen (. . .) unantastbar“ ist [4]. Der zweite Abschnitt des zweiten Artikels besagt: „Jeder hat das Recht auf Leben und körperliche Unversehrtheit. Die Freiheit der Person ist unverletzlich. In diese Rechte darf nur auf Grund eines Gesetzes eingegriffen werden.“ [11]

1.3.3 Das Embryonenschutzgesetz in Deutschland

Zunächst ist der Begriff des Embryos zu definieren. Dieser ist im §8 „Begriffsbestimmung“ des Embryonenschutzgesetzes (ESchG) festgelegt, welches am 1. Januar 1991 in Kraft getreten ist. Es kommen immer wieder Diskussionen auf, ab wann die befruchtete Eizelle als Embryo angesehen werden kann. Das ESchG besagt, dass bereits eine befruchtete, entwicklungsfähige, menschliche Eizelle ab dem Zeitpunkt der Kernschmelzung als Embryo anzusehen ist. Ebenso wie jede aus einem Embryo entnommene totipotente Zelle, die unter den erforderlichen Voraussetzungen fähig ist, sich zu teilen und zu einem eigenen Individuum zu entwickeln. Die befruchtete, menschliche Eizelle gilt in den ersten 24 Stunden nach der Kernverschmelzung als entwicklungsfähig, außer es lässt sich schon vor Ablauf der Frist feststellen, dass diese nicht in der Lage ist sich über das Einzellstadium hinaus zu entwickeln. [12] Die deutsche Gesetzeslage sieht die Verwendung menschlicher Embryonen als streng verboten an. Dies macht das Schaffen von embryonalen Stammzelllinien zur Straftat [18]. Der §2 des Gesetzes zum Schutz von Embryonen besagt:

„(1) Wer einen extrakorporal erzeugten oder einer Frau vor Abschluss seiner Einnistung in der Gebärmutter entnommenen menschlichen Embryo veräußert oder zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck abgibt, erwirbt oder verwendet, wird mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.

(2) Ebenso wird bestraft, wer zu einem anderen Zweck als der Herbeiführung einer Schwangerschaft bewirkt, dass sich ein menschlicher Embryo extrakorporal weiterentwickelt.

(3) Der Versuch ist strafbar.“ [28]

1.3 Richtlinien für Stammzellforschung in Deutschland

1.3.4 Das Stammzellengesetz (StZG)

Das Stammzellgesetz trat am 29. Juni 2002 in Kraft und wurde zuletzt am 25. November 2003 überarbeitet. Das Gesetz dient der Regelung über die Einfuhr und Verwendung von Stammzellen. Es besagt, dass es nicht gestattet ist embryonale Stammzellen einzuführen oder zu verwenden, ebenso wie die Veranlassung von Deutschland aus embryonale Stammzellen zu gewinnen oder dass Embryonen zur Erzeugung embryonaler Stammzellen geschaffen werden. Eine Ausnahmeregelung gibt es lediglich für die Einfuhr und Verwendung embryonaler Stammzellen für die Forschung [26].

Einfuhr und Verwendung embryonaler Stammzellen

Generell ist die Einfuhr und Verwendung von embryonalen Stammzellen verboten, außer es werden Ausnahmen zu Forschungszwecken genehmigt. Jedoch müssen von der Genehmigungsbehörde folgende Punkte geklärt werden:

1. Die Stammzellen müssen vor dem 1. Januar 2002 in Übereinkunft mit der Gesetzeslage im Herkunftsland gewonnen worden sein. Die Stammzellen müssen seitdem entweder in Kultur gehalten oder anschließend (als embryonale Stammzelllinie) kryokonserviert worden sein.
2. Die Embryonen müssen mit dem Ziel einer Schwangerschaft extrakorporal befruchtet worden sein und dürfen nur genutzt werden, wenn sie für diesen Zweck endgültig nicht mehr verwendet werden können. Ebenfalls ist auszuschließen, dass der Grund hierfür nicht bei den Embryonen selbst liegt.
3. Es dürfen keine finanziellen Vorteile aus der Überlassung der Embryonen entstehen, wie z.B. durch Zahlung eines Entgeltes.
4. Es dürfen keine gesetzlichen Vorschriften gegen die Einfuhr bzw. die Verwendung der embryonalen Stammzellen sprechen [11].

Forschung an embryonalen Stammzellen

Die Forschung an embryonalen Stammzellen muss wissenschaftlich begründet sein. Aus den Forschungsergebnissen sollen Erkenntnisse für die Grundlagenforschung gewonnen werden oder den Erkenntnisstand in den Bereichen Medizin, Diagnostik, präventiver oder therapeutischer Verfahren für den Menschen erweitern. Die Forschungen müssen bereits davor in geeigneten *in-vitro*-Modellen an Tieren oder mit tierischen Zellen getestet worden sein. Ebenfalls muss sichergestellt werden, dass die Forschungsziele nur mit embryonalen Stammzellen durchgeführt werden können und eine Alternative ausgeschlossen ist. Jede Forschung an Embryonen muss zunächst von der zuständigen Behörde genehmigt werden. Die zuständige Behörde wird vom Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherung bestimmt. Der Antrag muss schriftlich gestellt werden, in dem die verantwortliche Person des Forschungsvorhabens, sowie eine Projektbeschreibung und eine Darlegung zur Erfüllung oben genannter Anforderungen genannt werden. Die zu verwendenden Stammzellen müssen in einem (staatlich) autorisierten Register eingetragen sein. Gleichzeitig holt die zuständige Behörde

1.4 Richtlinien für Stammzellforschung in der EU

die Stellungnahme der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellforschung ein. Die Zentrale Ethik-Kommission für Stammzellforschung setzt sich aus insgesamt neun Mitgliedern aus den Bereichen Biologie, Ethik, Medizin und Theologie zusammen. Ihre Stellungnahme wird dem Antragsteller durch die zuständige Behörde mitgeteilt. Innerhalb von 2 Monaten hat die zuständige Behörde dann unter Berücksichtigung der Stellungnahme der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellforschung schriftlich über den Antrag zu entscheiden. Eine Genehmigung kann auch an Auflagen und Bedingungen gekoppelt und befristet sein. Falls sich nach der Genehmigung Tatsachen ergeben, die gegen eine Genehmigung sprechen, kann diese (ganz oder teilweise) widerrufen werden oder es können sich neue Auflagen für das Projekt ergeben [1].

1.4 Richtlinien für Stammzellforschung in der EU

Die Stammzellforschung ist in den verschiedenen Ländern der EU mit unterschiedlichen Richtlinien, sowie ethischen und regulatorischen Aspekten geregelt.

Belgien

- Gesetz über die Forschung an Embryonen *in-vitro*

In Belgien ist es erlaubt an Embryonen bis zu 14 Tage nach der Befruchtung zu forschen. Die Forschung ist an gewisse Bedingungen geknüpft: Sie muss neue Erkenntnisse über die Prävention oder Behandlung von Krankheiten ergeben oder die Forschung muss sich mit den Themen Fruchtbarkeit, Sterilität oder Organ-/Gewebetransplantationen beschäftigen. Es darf nur *in-vitro* an Embryonen geforscht werden, wenn keine andere Methode vergleichbare Ergebnisse verspricht. Die Herstellung von Embryonen für Forschungszwecke ist nicht erlaubt, außer wenn der Bedarf durch das Forschungsvorhaben nicht gedeckt werden kann [35].

Bulgarien

- Bulgarisches Gesundheitsgesetz
- Gesetz für Transplantationen von Organen, Geweben und Zellen
- Zentrale Ethikkommission, Bulgarische Bioethikkommission
- Komitee der medizinischen Forschung der medizinischen Universität Sofia

Im bulgarischen Gesetz ist die embryonale Stammzellforschung und die Ableitung embryonaler Stammzelllinien nicht direkt geregelt. Das bulgarische Gesundheitsgesetz besagt, dass überzählige Embryonen aus *in-vitro*-Fertilisationen in Absprache mit den Spendern für Forschungszwecke genutzt werden dürfen. Reproduktives Klonen ist verboten, auch für den Zweck der Organspende oder der Gewinnung von Zellen oder Gewebe [14].

1.4 Richtlinien für Stammzellforschung in der EU

Dänemark

- Gesetz Nr. 460
- Verordnung 728 vom 17.09.1997

Forschung an menschlichen Embryonen ist in Dänemark erlaubt, sofern die Forschung neue Erkenntnisse in den Bereichen medizinisch-assistierte Fortpflanzung, Präimplantationstechniken und Behandlung von schweren Krankheiten verspricht. Es dürfen nur überzählige Embryonen aus *in-vitro*-Fertilisationen mit dem Einverständnis der Spender verwendet werden. Jede Forschung muss von einem Ethikkomitee genehmigt werden. Befruchtete Eizellen dürfen ohne Kryokonservierung maximal 14 Tage nach der Befruchtung verwendet werden. Sowohl befruchtete als auch unbefruchtete Eizellen dürfen bis zu zwei Jahre mit anschließender Vernichtung gelagert werden. Reproduktives Klonen ist verboten, die rechtliche Lage für therapeutisches Klonen ist unklar [35].

Finnland

- Gesetz für medizinische Forschung
- Nationaler, finnischer Beratungsausschuss für Forschungsethik
- Nationaler, finnischer Ethikrat

Finnland erlaubt die Forschung an Embryonen, welche nach Unfruchtbarkeits-Behandlungen maximal 14 Tage nach der Befruchtung übriggeblieben sind (danach müssen Embryonen zerstört werden). Embryonen dürfen bis zu 15 Jahre eingefroren werden und müssen anschließend zerstört werden. Die Schaffung von Embryonen für Forschungszwecke ist verboten, außer zur Ermittlung neuer Heilungs- und Behandlungsmethoden für schwere Krankheitsbilder. Somatische Zellkerntransfers sind laut Gesetz nicht verboten [16].

Frankreich

- Bioethikgesetz
- Agentur für Biomedizin
- Nationales beratendes Ethikkomitee

Sowohl die Forschung an embryonalen, als auch an adulten Stammzellen ist in Frankreich streng reguliert. Embryonen dürfen speziell für die Forschung nicht geschaffen werden. Um menschliche Embryonen oder embryonale Stammzellen nutzen zu dürfen müssen folgende Punkte erfüllt sein: 1. Die Forschung muss wissenschaftlich relevant sein, 2. Diese muss bedeutende medizinische Vorteile erbringen, 3. Alternativen zu embryonalen Zellen müssen ausgeschlossen sein, 4. Die Forschung muss französischen Ethikvorschriften entsprechen. Es dürfen nur Embryonen aus *in-vitro*-Fertilisationen mit Einverständnis der Spender verwendet werden. Forschungsprojekte können für 5 Jahre genehmigt werden, es muss jedoch der Agentur für Biomedizin jährlich ein Bericht vorgelegt werden. Embryonen dürfen ebenfalls importiert werden, dies geschieht jedoch nur unter Auflagen (z.B. freiwillig und mit Zustimmung) und muss von der Agentur für Biomedizin genehmigt werden [17].

1.4 Richtlinien für Stammzellforschung in der EU

Griechenland

- Nationale, griechische Bioethik-Kommission
- Gesetz für medizinische Reproduktion am Menschen

Griechenland erlaubt die Verwendung von überzähligem, reproduktivem Material für die Forschung, vorausgesetzt der Spender gibt sein Einverständnis. Die Embryonen dürfen bis zu fünf Jahre eingefroren werden, danach müssen sie zerstört oder für therapeutische oder Forschungszwecke eingesetzt werden. Befruchtete Eizellen müssen spätestens 14 Tage nach der Befruchtung zerstört werden. Das menschliche reproduktive Klonen ist strengstens verboten [19].

Irland

- Irische Verfassung
- Irischer Bioethikrat

Irland besitzt keine Regelungen bezüglich Stammzellforschung. Das Irische Gericht entschied 2009, dass Embryonen, welche kryokonserviert sind und außerhalb des Mutterleibs erzeugt wurden, nicht durch die irische Verfassung geschützt sind. 2008 gab es einen Gesetzesentwurf, welcher die Forschung an Embryonen verbieten sollte, dieses Gesetz trat jedoch nie in Kraft. 2009 verbot der Irische Medizinrat das Schaffen von Embryonen ausschließlich für Forschungszwecke [20].

Italien

- Italienisches Ethikkomitee
- Gesetz 40

In Italien wird der Embryo ab dem Zeitpunkt der Befruchtung als ein Objekt betrachtet, das Anspruch auf seine Rechte hat. Das Gesetz verbietet die Verwendung von Embryonen für jegliche Forschung, außer diese zielt auf die Verbesserung von therapeutischen und medizinischen Zuständen des Embryos. Seit 2004 wird die adulte Stammzellforschung stark unterstützt [21].

Litauen

- Gesetz über Ethik im biomedizinischen Forschungsbereich
- Gesetz für die Spende und Transplantationen von menschlichen Geweben, Zellen und Organen
- Bioethik-Komitee

Das Gesetz über Ethik im biomedizinischen Forschungsbereich definiert einen Embryo ab dem Zeitpunkt der Befruchtung, also der Entstehung einer Zygote bis zum Ende der achten Woche der Schwangerschaft. Die Verwendung von Embryonen zu Forschungszwecken ist auf klinische Beobachtungen beschränkt (nicht-interventionell). Der Import und Export von menschlichen Embryonen, embryonalen Stammzellen oder Zelllinien ist deshalb verboten. Das Gesetz für die Spende und Transplantationen von menschlichen Geweben, Zellen und Organen regelt die Lagerung und Verwendung von adulten Stammzellen für Transplantationszwecke [22].

1.4 Richtlinien für Stammzellforschung in der EU

Luxemburg

- Großherzogliche Regelung Einrichtung Krankenhausplan

Für Luxemburg sind keine speziellen Regelungen zur Forschung mit embryonalen Stammzellen bekannt.

Niederlande

- Erlass über Embryonen
- Central Committee for Research Involving Human Subjects (CCMO)

In den Niederlanden ist die Herstellung von menschlichen Embryonen zu Forschungszwecken verboten, jedoch die Forschung selbst erlaubt. Stammzellen dürfen aus überzähligen Embryonen bis zu 14 Tage nach der Befruchtung bei Einverständnis der Spender entnommen werden. Die Entnahme der Stammzellen und deren Verwendung muss jedoch zuvor vom Central Committee for Research Involving Human Subjects (CCMO) genehmigt und zugelassen werden.

Österreich

- Fortpflanzungsmedizingesetz
- Österreichische Bioethikkommission

Die Stammzellforschung in Österreich wird durch das Fortpflanzungsmedizingesetz (2004) geregelt. Die Forschung an Embryonen oder die Ableitung von embryonalen Stammzelllinien aus Embryonen für die Forschung ist verboten. Embryonen dürfen für keinen anderen Zweck als die künstliche Befruchtung genutzt werden. Das Gesetz trifft jedoch keine Aussage über die Einfuhr von pluripotenten, embryonalen Stammzellen und Forschung an denselben ist deshalb zulässig [13].

Polen

- Strafgesetzbuch
- Medizinethischer Kodex
- Arztgesetz

In Polen ist die Forschung an Embryonen *in-vitro* verboten, jedoch gibt es keine speziellen Regelungen. Grundsätzlich wird ein *in-vitro* erzeugter Embryo geschützt wie ein Embryo *in-vitro*. Der „strafrechtliche Schutz der Gesundheit“ gilt auch außerhalb des Mutterleibs.

Portugal

- Gesetz für medizinisch-assistierte Zeugung
- Nationaler Rat für medizinisch-assistierte Zeugung

Die Stammzellforschung wird durch das Gesetz für medizinisch-assistierte Zeugung reguliert. Forschung ist nur an eingefrorenen oder überzähligen Embryonen gestattet. Die Forschung muss einen deutlichen Beitrag zum therapeutischen oder medizinischen Nutzen leisten. Die Schaffung von Embryonen für Forschungszwecke ist verboten. Jegliche Forschung an eingefrorenen oder überzähligen

1.4 Richtlinien für Stammzellforschung in der EU

Embryonen muss lizenziert und genehmigt werden. Die Regierung diskutierte 2011 über eine Lockerung des Gesetzes, um neue Therapieansätze für die regenerative Medizin zu finden. Portugal sollte so konkurrenzfähiger in Europa gemacht und der Zugang zu embryonalen Stammzelllinien und deren Forschung geebnet werden. Bislang gibt es allerdings keine richtungsweisende Entscheidung [23].

Schweden

- Erlass über Aktivitäten, die menschliche Eizellen für Forschungs- oder Behandlungszwecke beinhalten
- Erlass über Biobanken in der medizinischen Versorgung
- Erlass zur Genetischen Integrität

Schweden erlaubt Forschung an Embryonen bis zu 14 Tage nach der Befruchtung. Anschließend müssen diese zerstört werden. Der Erlass zur Genetischen Integrität erlaubt seit 2005 die Schaffung von humanen Embryonen für Forschungszwecke durch somatischen Zellkerntransfer (therapeutisches Klonen), jedoch wird hierzu die Zustimmung der Ethik-Kommission und der Spender benötigt [25].

Schweiz

- Erlass über die Forschung mit embryonalen Stammzellen

Der Erlass erlaubt die Verwendung von überzähligen Embryonen aus *in-vitro*-Fertilisationen, welche nicht zur Herbeiführung einer Schwangerschaft genutzt werden können. Die Verwendung ist an strenge Zulassungsbedingungen und der Zustimmung des spendenden Paares gekoppelt. Es dürfen bis zu drei Embryonen pro *in-vitro*-Fertilisations-Zyklus für Forschungszwecke aufbewahrt werden, das Einfrieren für weitere Forschungen oder Spenden ist nicht erlaubt. Embryonen müssen anschließend zerstört werden. Embryonale Stammzelllinien dürfen importiert werden.

Spanien

- Gesetz für biomedizinische Forschung
- Gesetz für medizinisch-assistierte Zeugung

Das Gesetz für biomedizinische Forschung erlaubt die Forschung an Embryonen für therapeutische und Forschungszwecke. Hierfür ist jede Technik zum Sammeln embryonaler Stammzellen erlaubt, für die weder ein Embryo noch ein Prä-Embryo geschaffen werden muss. Die Schaffung von Embryonen für Forschungszwecke ist verboten. Das Gesetz regelt ebenfalls Stammzellexperimente, die Spende und Verwendung von Embryonen, Zellen, Geweben und Organen [24].

Tschechien

- Gesetz zur Forschung an menschlichen, embryonalen Stammzellen und zugehörigen Aufgabenbereichen
- Tschechische Bioethikkommission

Adulte Stammzellen und Tumorstammzellen

1 Einführung

Bevor wir beginnen, uns im Speziellen mit adulten Stammzellen oder Tumorstammzellen zu beschäftigen, gilt es noch einige Definitionen einzuführen bzw. zu wiederholen.

Stammzellen werden allgemein charakterisiert durch das Vorliegen von zwei essentiellen Merkmalen: Pluri- bzw. Multipotenz und Selbsterneuerung. Um als verlässliche Ressource für die Embryonalentwicklung bzw. für die Regeneration von Geweben verfügbar zu sein, darf sich der Stammzellpool nie erschöpfen. Es müssen immer genügend Stammzellen verfügbar sein, welche die benötigten Zelltypen ausbilden und sich in diese differenzieren können. Daher müssen sich die Stammzellen selbst immer wieder erneuern und ihre Charakteristika erhalten können (= Selbsterneuerung). Die Begriffe der Pluri-, Multi- und Unipotenz werden innerhalb der folgenden Absätze wiederholt bzw. eingeführt:

Ein neuer Organismus, ein Embryo entwickelt sich aus einer befruchteten Eizelle, der **Zygote**. Unter allen Stammzellarten wäre die Zygote als die potenteste anzusehen, denn die Zygote ist **totipotent** und ist damit in der Lage, einen kompletten Organismus auszubilden.

Teilt sich die Zygote, so wird später das Embryonalstadium der **Blastozyste** erreicht. In diesem Stadium steht der Embryo kurz vor der Einnistung. Aus der sogenannten **inneren Zellmasse** der Blastozyste können **embryonale Stammzellen** gewonnen werden. Diese Stammzellen sind **pluripotent** und können die Vorläufer und Zellen der verschiedenen Keimblätter hervorbringen.

Die drei **Keimblätter** (bzw. auch Keimscheiben) bilden sich durch Einstülpung der Blastozyste und durch verschiedene komplexe Vorgänge in der weiteren Embryonalentwicklung. Wir unterscheiden hierbei **Ektoderm** (bildet u.a. Haut, Nervengewebe, Sinnesorgane, Zähne), **Endoderm** (bildet u.a. Epithelien von Leber, Pankreas, Verdauungstrakt, Atmungstrakt) und **Mesoderm** (bildet u.a. Knochen, Muskulatur, Bindegewebe).

Im erwachsenen Organismus kommen nach wie vor Stammzellen vor, die sogenannten **adulten Stammzellen**. In den Möglichkeiten ihrer Entwicklung sind adulte Stammzellen gegenüber embryonalen Stammzellen jedoch deutlich eingeschränkter. Sie sind **mutlipotent** und können damit Vorläuferzellen und verschiedene Zelltypen innerhalb ihrer Keimblattgrenze generieren. Sie können jedoch nicht Vorläufer und Zellen anderer Keimblätter ausbilden.

Stamm- und Vorläuferzellen im erwachsenen Organismus können auch **unipotenten** Charakter haben, das heißt sie können nur Zellen entlang einer vorgegebenen Entwicklungslinie ausbilden, auf die sie festgelegt sind.

2 Adulte Stammzellen

2.1 Zweck und Vorkommen

Wie zur Einführung bereits erwähnt wurde sind adulte Stammzellen charakterisiert durch die Charakteristika der Selbsterneuerung und der Multipotenz. Sie erfüllen im erwachsenen Organismus die Aufgabe Organe bzw. Gewebe zu erneuern und zu erhalten. Kommt es durch den Alterungsprozess der Zellen bzw. durch Krankheit oder Trauma zu einer Gewebeschädigung, so kann das Gewebe durch adulte Stammzellen, welche die jeweils benötigten Zelltypen durch Proliferation und Differenzierung zur Verfügung stellen, wieder regeneriert werden. Hierbei differenzieren die Stammzellen zunächst zu Vorläuferzellen, die sich dann entlang einer festgelegten Entwicklungslinie weiter zum Ziel-Zelltyp differenzieren.

Adulte Stammzellen kommen in den Geweben des erwachsenen Organismus in sogenannten Stammzellnischen vor. Die Stammzellnische sorgt dafür, dass die Stammzellen erhalten bleiben und ihre essentiellen Charakteristika nicht verlieren. Hierfür geben die Zellen, welche die Stammzellnische bilden, entsprechende Faktoren ab und sorgen für ein Milieu, das zur Erhaltung der Stammzellen beiträgt.

Adulte Stammzellen kommen in weit mehr Geweben bzw. Organen vor als ursprünglich angenommen wurde. Man geht davon aus, dass für nahezu jedes Gewebe eigene adulte Stammzellen existieren, welche das entsprechende Gewebe erhalten und regenerieren können. Im Zuge dieser Lektion werden wir beispielhaft die adulten Stammzellen der Leber, des Darms, des Skelettmuskels und des Blutes näher betrachten.

2.2 Leber

2.2.1 Funktionen der Leber

Als zentrales Stoffwechselorgan erfüllt die Leber (*griechisch „Hepar“*) zahlreiche wichtige Aufgaben. Als **Verdauungsdrüse** produziert sie bis zu 600 ml Gallensaft pro Tag, unterstützt damit die Verdauung bzw. Aufnahme von Fetten und fördert die Ausscheidung von Fremdstoffen. Zur **Entgiftung** baut die Leber Fremdstoffe ab oder wandelt z.B. nicht-wasserlösliche Stoffe aus dem Zellstoffwechsel um. Die Leber nimmt außerdem zentrale Positionen ein im **Glucosestoffwechsel** (Aufnahme, Neusynthese, Speicherung/Abgabe), im **Eiweißstoffwechsel** (Abbau von Ammoniak, Synthese/Abbau von Eiweißkörpern wie Albumin, Globulin oder Gerinnungsfaktoren) und im **Fettstoffwechsel** (Energiegewinnung, Umwandlung in Speicherfett).

2.2.2 Makroskopischer Aufbau der Leber

Die Leber teilt sich makroskopisch in zwei große Leberlappen (*Lobus dexter/sinister*) und zwei kleinere Leberlappen (*Lobus quadratus/caudatus*) (siehe Abbildung 1A). Über die Leberpforte (*Porta hepatis*), einen Bereich an der Unterseite der Leber, treten Blutgefäße, Gallengänge, Lymphgefäße und Nervenfasern in die Leber ein bzw. verlassen sie. Über die Leberarterie (*Arteria hepatica*) wird die Leber mit sauerstoffreichem Blut versorgt (25%). Der größte Teil des Blutes jedoch, der die Leber erreicht (75%), tritt über die Pfortader (*Vena portae*) in die Leber ein. Die Pfortader sammelt das Blut aus den unpaaren Bauchorganen (Magen, Darm, Milz, Pankreas) und führt es der Leber zu. Enthalten sind Nährstoffe (aus Magen und Darm), Abbauprodukte (Milz), und Hormone (Pankreas). Der venöse Abfluss von der Leber in Richtung Herz verläuft über die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*).

2.2.3 Feinbau der Leber

Mikroskopisch betrachtet besteht die Leber aus 50.000 bis 100.000 sechseckig wabenförmig aufgebauten Leberläppchen von denen jedes einen Durchmesser zwischen ein und zwei Millimetern besitzt (siehe Abbildung 1A). An den äußeren Rändern der sechseckigen Leberläppchen befinden sich die sogenannten Periportalfelder über welche die Läppchen mit arteriellem Blut (sauerstoffreich) und mit Blut von der Pfortader (nährstoffreich) versorgt werden, und über welche auch die Abfuhr der produzierten Gallenflüssigkeit (Gallengang) erfolgt. Die drei dafür erforderlichen Gefäße werden als Glisson'sche Trias bezeichnet. Im Zentrum jedes Leberläppchens steht die Zentralvene, die letztendlich in der Hohlvene endet. Zwischen den Periportalfeldern und der Zentralvene erstrecken sich die Sinusoide. Die Sinusoide sind erweiterte Leberkapillaren, über die das Blut der Pfortader in Richtung Zentralvene transportiert wird (siehe Abbildung 1B). Während das Blut das Sinusoid passiert kommt es zum Stoffaustausch mit den Zellen, die an das Sinusoid angrenzen. Entsprechend ihrer Funktion können verschiedene Zelltypen der Leber unterschieden werden:

- **Hepatozyten (Leberepithelzellen)**
Hepatozyten machen etwa 80% des Lebervolumens aus. Sie besitzen starke metabolische Aktivität und erfüllen die Leber-typischen Stoffwechselfunktionen.
- **Cholangiozyten/Gangzellen**
Die Cholangiozyten bilden das einschichtige Epithel der Gallengänge. Sie produzieren etwa ein Drittel der Gallenflüssigkeit.
- **sinusoidale Endothelzellen**
Die Endothelzellen zwischen Parenchymzellen (= Masse der Zellen, welche die Hauptcharakteristika eines Organs besitzen, hier z.B. Hepatozyten) und Sinusoiden werden als sinusoidale Endothelzellen bezeichnet. Sie kleiden die Sinusoide aus und grenzen sie gegen die anderen Zellen ab.
- **Ito-Zellen (hepatische Sternzellen)**
Ito-Zellen kommen im Raum zwischen Endothelzellen und Parenchymzellen vor (Dissé-Raum). Sie speichern Fette und Vitamin A und produzieren intralobuläre Bindegewebsfasern (von Bedeutung bei der Entstehung von Leberzirrhose).
- **Kupfferzellen**
Makrophagen, die in den Sinusoiden vorkommen, werden als Kupfferzellen bezeichnet.

Während das Blut die Sinusoide vom Portalfeld in Richtung Zentralvene durchquert, passiert die Gallenflüssigkeit die benachbarten Gallenkanälchen in umgekehrter Richtung (siehe Abbildung 1B) um über das Periportalfeld abgeführt zu werden.

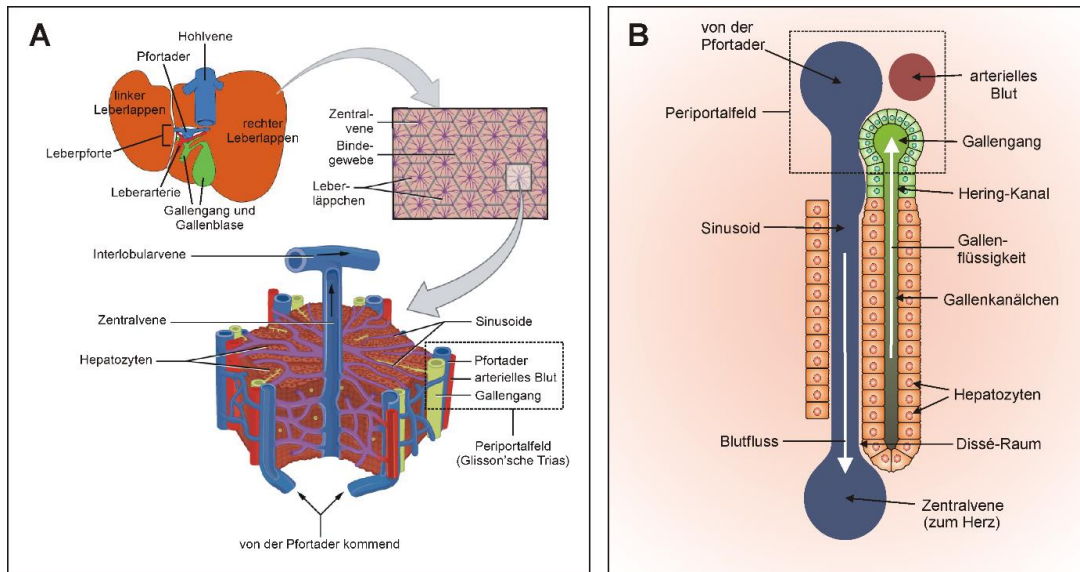


Abbildung 1: Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau der Leber. Der Feinbau der Untereinheit der Leberläppchen, der Sinusoide, ist in Abbildung (B) gezeigt.

2.2.4 Leberregeneration

Leberzellen durchlaufen ihrer Funktion geschuldet (Stoffwechsel, Entgiftung) einen entsprechenden Abnutzungsprozess und müssen kontinuierlich erneuert werden. Die durchschnittliche Lebenszeit eines Hepatozyten beträgt nur zwischen 200 und 300 Tagen. Die Leber besitzt damit ein enormes Regenerationspotential. Dies zeigt sich u.a. darin, dass die Leber nach teilweiser Entfernung (Hepatektomie) wieder bis zur ursprünglichen Größe auswachsen kann. Die entfernten Leberlappen wachsen dabei nicht anatomisch identisch nach, lediglich die Masse der Leber vergrößert sich bis zum ursprünglichen Zustand. Dieser Prozess dauert bei Nagetieren unter experimentellen Bedingungen nur etwa fünf bis sieben Tage!

Exkurs: Prometheus

Selbst in der Antike war das Regenerationspotential der Leber bereits bekannt. In der griechischen Mythologie zeigt sich dies in der **Prometheus-Sage**:

In der griechischen Mythologie ist Prometheus der Freund und Kulturstifter der Menschheit, der die Menschen aus Ton formte und ihr Lehrmeister war. Als Strafe für eine List, die Prometheus zugunsten der Menschen erdachte, versagte Zeus den Sterblichen auf der Erde das Feuer. Prometheus brachte es jedoch wieder zurück auf die Erde und erweckte damit erneut den Zorn des Göttervaters Zeus. Dieser bestrafte die Menschen mit Krankheit, Leid und Tod, die aus der Büchse Pandoras strömten und er bestrafte auch Prometheus, den er in der schlimmsten Einöde des Kaukasus an einen Felsen fesseln ließ. Prometheus musste dort ausharren während der Adler Ethon jeden Tag zu ihm kam und von Prometheus Leber fraß. Da er unsterblich war erneuerte sich seine Leber zu seiner Qual immer wieder. Die Qual dauerte viele Jahrhunderte, bis Herakles ihn aus Mitleid erlöste.

Heute wissen wir nicht nur um das extreme Regenerationspotential der Leber, wir wissen außerdem, dass dieses Wachstum streng reguliert sein muss. Die Leber „kennt“ dabei ihre benötigte Masse und die Größe, auf die sie wieder auswachsen sollte. Die zugrunde liegenden Regenerationsprozesse sind dabei streng reguliert durch verschiedene Faktoren, welche in Tabelle 1 in einer Übersicht dargestellt sind. Von besonderer Bedeutung unter den Wachstums-terminierenden Faktoren ist der Hippo-Signalweg, der über Zell-Zell-Kontakte moduliert werden kann.

Tabelle 1: Faktoren, über welche die Leberregeneration reguliert wird.

Replikations-induzierende Faktoren	Replikations-terminierende Faktoren
Hepatocyte Growth Factor	Transforming Growth Factor β 1
Interleukin-6	Erkennung von Gallensäure-Leveln im Blut (nukleäre Rezeptoren wie FXR)
Tumornekrosefaktor α	
Transforming Growth Factor α	Hippo-Signalweg
Epidermal Growth Factor	
Nicht-Peptidhormone (z.B. Triiodo-thyronin ²⁰ und Norepinephrin)	

2.2.5 Modelle zur Leberregeneration

„Streaming Liver“

Im ältesten Modell zur Leberregeneration, im Modell der „Streaming Liver“ (1985), wurde vorgeschlagen, dass neue Hepatozyten im Portalfeld im Bereich des Hering-Kanals (siehe Abbildung 1B) entstehen, und anschließend Richtung Zentralvene migrieren. Dies würde bedeuten, dass sich im Bereich des Hering-Kanals eine Stammzellnische für die verantwortlichen Vorläuferzellen befinden würde. Als Beweis für die Richtigkeit dieses Modells wurde angesehen, dass die Genexpression während der Migration bzw. Reifung der Hepatozyten entlang des Sinusoids verschieden ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich Mutationen in der mitochondrialen DNA vom periportalen Bereich (Portalfeld) in Richtung des perizentralen Bereichs (Zentralvene) ausdehnen. Da Mutationen in der mitochondrialen DNA relativ lange brauchen um sich zu etablieren, konnten diese als sicherer Marker angesehen werden (es handelte sich also nicht um neue Spontanmutationen!).

Das Modell der migrierenden/reifenden Hepatozyten bzw. der Streaming Liver wird jedoch dadurch widerlegt, dass das entdeckte unterschiedliche Genexpressionsmuster der Hepatozyten entlang des Sinusoids nicht abhängig ist von der Zellreifung, sondern vom Blutfluss im Sinusoid. Wird der Blutfluss experimentell umgekehrt und von der Zentralvene über das Sinusoid in Richtung Portalfeld geleitet, so kehrt sich das Genexpressionsmuster um. Es ist damit abhängig von den im Blut transportierten Metaboliten und während des normalen Zellumsatzes in der Leber findet keine Migration (reifer) Hepatozyten statt. Untersuchungen in Nagetieren haben sogar gezeigt, dass sich nach einer Hemihepatektomie (Entfernung einer funktionellen Leberhälfte) nahezu jede verbleibende Leberzelle (Hepatozyten und Gangzellen) einmal geteilt hat, um die ursprüngliche Masse wieder herzustellen. Die Leber würde damit über das einzigartige Merkmal verfügen, dass selbst normale, adulte Hepatozyten über stammzellartige Kapazität verfügen.

Ovalzell-Modell

Im zweiten Modell zur Leberregeneration werden Ovalzellen als potente Vorläuferzellen in der Leber angesehen. Ovalzellen wurden bereits 1978 zum ersten Mal beschrieben. Sie sind in der Portalzone lokalisiert und zeichnen sich zunächst durch eine hohe Proliferationsrate aus. Nach ihrer Migration in die Leberläppchen können sie zu Hepatozyten differenzieren. Ovalzellen zeigen ein Expressionsprofil, das dem eines embryonalen Hepatoblasten (Hepatozyten-Vorläufer) ähnelt. Neben α -Fetoprotein (exprimiert von endodermalen Geweben während der Embryonalentwicklung) exprimieren Ovalzellen CK19 (Marker des Gangepithels) sowie Albumin (Marker der Hepatozyten). Auf Ovalzellen wurden außerdem Marker identifiziert, die auch hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen charakterisieren (z.B. c-Kit, SCF, Thy-1, CD34, Sca-1). Ovalzellen können insgesamt als proliferierende, bipotente Vorläuferzellen angesehen werden, welche sowohl in Hepatozyten als auch in Gangzellen differenzieren können. Problematisch ist allerdings, dass die Gruppe der Ovalzellen nicht genau umschrieben ist und neben Vorläuferzellen auch reife Gangzellen, aktivierte Ito-Zellen oder Fibroblasten enthalten kann.

Für die Aktivierung der Ovalzell-Antwort existieren drei mögliche Modelle (siehe auch Abbildung 2 und (Duncan et al. 2009)):

a) Klassisches Ovalzell-Modell

Ein Ovalzell-Vorläufer bildet sich nach Aktivierung zum hepatischen Ovalzell-Vorläufer um, aus dem sich sowohl Gangzellen als auch Hepatozyten entwickeln können.

b) Modell der Ovalzell-Heterogenität

Ein Ovalzell-Vorläufer bildet sich über zwei Zwischenstufen (frühe Ovalzelle, intermediäre Ovalzelle) zur reifen Ovalzelle, aus der sich dann wiederum eine Prä-Gangzelle und eine Prä-Hepatozyte entwickeln können. Diese Vorstufen können ihrerseits dann reife Gangzellen bzw. Hepatozyten ausbilden.

c) Uni-liniäres Modell

Sowohl Hepatozyten als auch Gangzellen entwickeln sich über getrennte Linien und haben separate Vorläuferzellen, welche über eine Zwischenstufe reife Hepatozyten bzw. Gangzellen entwickeln können. Die Population der Vorläufer und Intermediär-Zelltypen wird hierbei als Ovalzellen bezeichnet.

Während Modelle b) und c) zwar hypothetisch möglich sind, ist Modell a), das klassische Modell, allgemein am meisten akzeptiert. Im klassischen Ovalzellmodell können für die **Ovalzell-Antwort** vier Phasen unterschieden werden: Aktivierung, Proliferation, Migration und Differenzierung. Die Ovalzell-Vorläuferzellen werden zunächst zu hepatischen Ovalzellen aktiviert. Diese proliferieren anschließend, migrieren an den Ort, an dem sie gebraucht werden, und differenzieren dort zu Hepatozyten und/oder Gangzellen. Eine Repopulation des Gewebes mit Hepatozyten und Gangzellen ist damit über die Ovalzell-Antwort möglich. Eine Übersicht über die verschiedenen Phasen der Ovalzell-Antwort finden Sie in Abbildung 3. Jede Phase der Ovalzellantwort wird eingeleitet und durch die Präsenz spezifischer Faktoren, die zur Aktivierung spezifischer Signalwege beitragen. Diese Faktoren werden u.a. durch die verschiedenen Zellen im umgebenden Gewebe (bzw. in der „Stammzellnische“) abgegeben, die damit auch maßgeblich an der Regulation der Ovalzell-Antwort beteiligt sind.

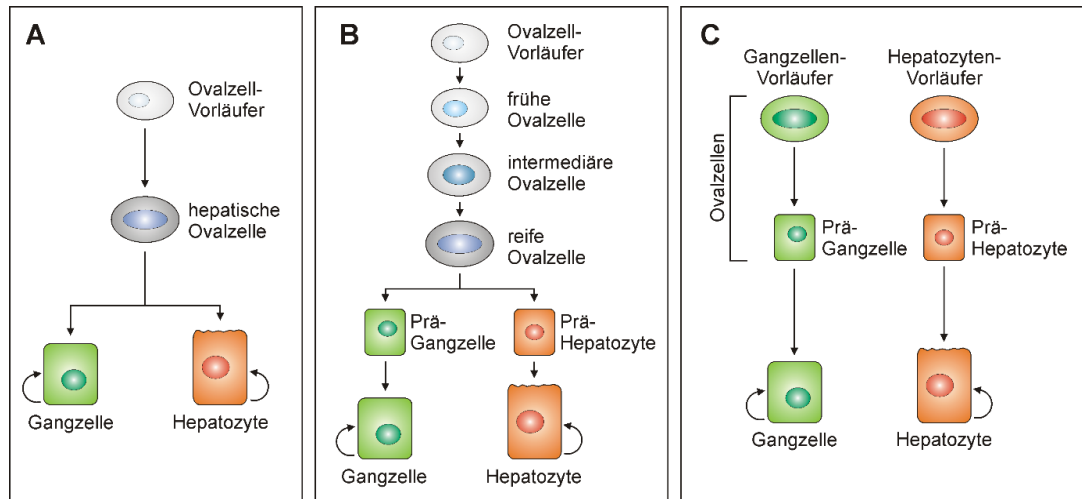


Abbildung 2: Modelle für die Ovalzell-Antwort. (A) Im klassischen Ovalzell-Modell bildet sich ein Ovalzell-Vorläufer nach Aktivierung zum hepatischen Ovalzell-Vorläufer um, aus dem sich sowohl Gangzellen, als auch Hepatozyten entwickeln können. (B) Im Modell der **Ovalzell-Heterogenität** bildet sich ein Ovalzell-Vorläufer über zwei Zwischenstufen zur reifen Ovalzelle, aus der sich dann wiederum eine Prä-Gangzelle und eine Prä-Hepatozyte entwickeln können. Diese Vorstufen können ihrerseits dann reife Gangzellen bzw. Hepatozyten ausbilden. (C) Nach dem **uni-linearen Modell** entwickeln sich sowohl Hepatozyten als auch Gangzellen über getrennte Linien und haben separate Vorläuferzellen, welche über eine Zwischenstufe reife Hepatozyten bzw. Gangzellen entwickeln können. Die Population der Vorläufer und Intermediär-Zelltypen wird hierbei als Ovalzellen bezeichnet (nach (Duncan et al. 2009)).

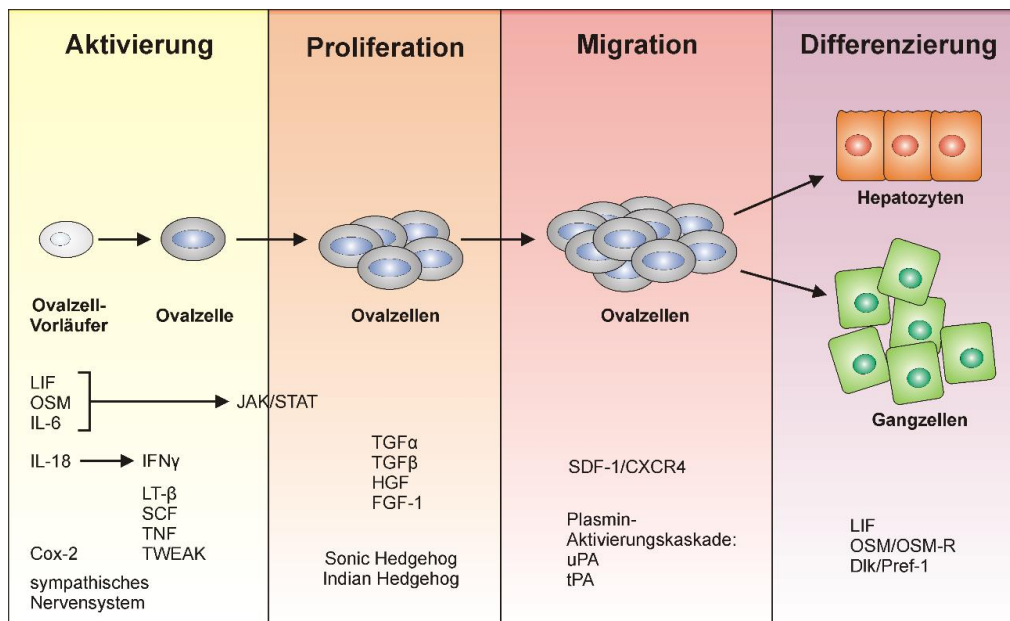


Abbildung 3: Übersicht über die vier Phasen der Ovalzell-Antwort. Die Ovalzellantwort verläuft über die Phasen der Aktivierung, Proliferation, Migration und Differenzierung. In jeder Phase sind verschiedene Signalmoleküle und Signalwege von Bedeutung, welche den Ablauf der Ovalzellantwort steuern (nach (Duncan et al. 2009)).

Basierend auf den Erkenntnissen der Forschung an beiden Modellen zur Leberregeneration (Streaming Liver und Ovalzell-Modell) können verschiedene Mechanismen zur Leberregeneration bei geringfügigen sowie bei größeren Gewebeschäden festgestellt werden:

- Bei geringfügiger Schädigung des Lebergewebes können zerstörte Hepatozyten bzw. Gangzellen durch Proliferation der benachbarten Zellen ersetzt werden.
- Bei größeren Gewebeschäden sowie bei Verlust der Teilungsfähigkeit von Hepatozyten (Seneszenz) kommt es zur Aktivierung einer Population von Vorläuferzellen (Ovalzellen), die im Bereich des Hering-Kanals lokalisiert still verharren. Diese Zellen können aktiviert werden, an den Ort der Gewebeschädigung migrieren und dort in Hepatozyten oder Gangzellen differenzieren, um den Schaden zu regenerieren (siehe auch (Best et al. 2013; Miyajima et al. 2014)).

An der Regulierung beider Reparatur-Mechanismen sind verschiedene Cytokine, Morphogene, Wachstumsfaktoren und Hormone beteiligt.

2.2.6 Zusammenfassung

Nach wie vor ist die Existenz und die Rolle echter Leberstammzellen unklar. Der Erhalt des Lebergewebes kann grundsätzlich aber über die Proliferation adulter Leberzellen (normaler Leberzell-Umsatz) sowie über potentielle Stammzellen erfolgen. Die Gruppe der Ovalzellen ist sehr heterogen definiert, enthält aber bipotente Vorläuferzellen, welche die Lebermasse bei Hepatozytenseneszenz oder bei massiver Gewebeschädigung rekonstituieren können. Ein therapeutischer Einsatz dieser Vorläuferzellen ist zwar denkbar, aber schwierig, da aufgrund der heterogenen Population der Ovalzellen keine verlässlichen Marker definiert werden können und geeignete Protokolle zur Isolierung dieser Zellen daher erst noch etabliert werden müssen.

2.3 Darm

2.3.1 Funktionen des Darms

Die verschiedenen Bereiche des Darms übernehmen grundsätzlich alle die Funktion der **Verdauung**: aufgenommene Nahrung wird in biologisch wichtige Bestandteile **aufgespalten** und diese Bestandteile werden anschließend **aufgenommen/resorbiert**. Zusätzlich dazu lassen sich bestimmten Bereichen des Darms noch weitere Funktionen zuordnen:

- **Zwölffingerdarm (Duodenum):**
Im Zwölffingerdarm münden Gallen- und Bauchspeicheldrüsensekrete in den Darm, welche verschiedene Enzyme beinhalten und u.a. auch beträchtlich zur Fettverdauung beitragen. In diesem Bereich wird zudem der Magensaft neutralisiert.
- **Krummdarm (Ileum):**
Durch eine Ansammlung von Lymphfollikeln nimmt der Krummdarm eine besondere Rolle bei der Immunabwehr ein.
- **Dickdarm (Colon, Rektum):**
Im Dickdarm erfolgt die Resorption von Wasser und Elektrolyten.

2.3.2 Makroskopischer Aufbau des Darms

Der Darm lässt sich in verschiedene funktionelle Bereiche unterteilen. Vom Magen ausgehend in Richtung Anus können folgende Bereiche unterschieden werden: Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum), Krummdarm (Ileum) und Dickdarm (Colon und Rektum). Der Dünndarm (Zwölffingerdarm, Leerdarm und Krummdarm) macht dabei den längsten und wichtigsten Abschnitt aus. Seine Länge beträgt je nach Muskeltonus etwa drei bis sechs Meter. Etwa 40% davon entfallen auf den Leerdarm, etwa 60% auf den Krummdarm.

2.3.3 Feinbau des Darms

Die Bereiche des Darms lassen sich auch mikroskopisch deutlich voneinander unterscheiden. Für eine möglichst effektive Resorption von Nährstoffen ist die Oberfläche der Darmwände stark vergrößert. Diese Vergrößerung wird erreicht durch Faltung der Darmwand („Keckring-Falten“; Faktor 3), Zotten (Gewebeausstülpungen; Faktor 7-14), Mikrovilli (fadenförmige Zellfortsätze, Faktor 15-40) und Krypten (Gewebeeinstülpungen). Dadurch ergibt sich im Darm jedes erwachsenen Menschen eine gesamte Resorptionsfläche von etwa 180 m². Während im Dünndarm Zotten und Krypten gleichzeitig vorkommen, so kommen im Bereich des Dickdarms nur Krypten vor.

In allen Bereichen des Darms können verschiedene Zelltypen unterschieden werden, die auch in Abbildung 4 dargestellt sind:

- **Enterozyten (Saumzellen)**
Enterozyten sind der häufigste Zelltyp des Darmepithels. Sie bilden einen luminalen (= zum Lumen/Darminhalt gerichteten) Bürstensaum und nehmen die Nahrungsbestandteile aus dem Lumen auf.
- **Becherellen**
Becherzellen sind für die Sekretion von Schleim (Muzinen) verantwortlich. Die Muzine bilden auf der Epitheloberfläche einen zusammenhängenden Schutzfilm, der das Epithel bedeckt.
- **Paneth-Zellen**
Paneth-Zellen bilden eine Abwehr gegen Bakterien, Pilze oder Viren indem sie Defensine und Lysozyme abgeben. Sie kommen vor allem vor im Leerdarm und Krummdarm und haben eine Lebensdauer von nur 20 Tagen.
- **Enteroendokrine Zellen (Sammelbegriff)**
Die Gruppe der enteroendokrinen Zellen beinhaltet Zellen, welche für die Verdauung wichtige Peptidhormone abgeben (u.a. Gastrin-Zellen, Sekretin-Zellen, Entero-Glukagon-Zellen).
- **Bürstenzellen**
Bürstenzellen nehmen ähnliche Funktionen ein wie Geschmacksknospen und können bestimmte Nahrungsbestandteile wahrnehmen.

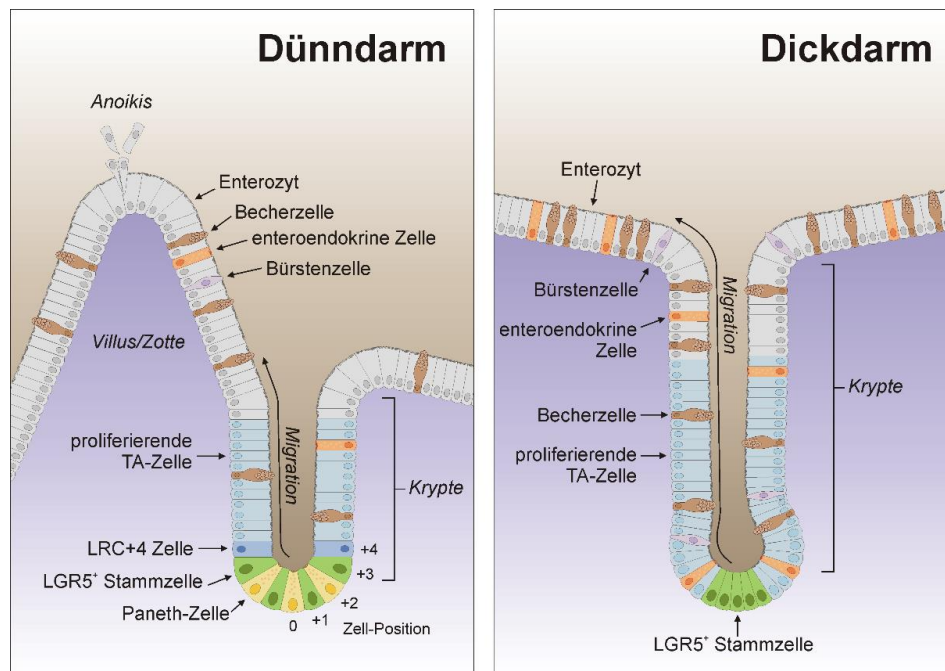


Abbildung 4: Aufbau und Zelltypen des Dün- und Dickdarmepithels (nach (Barker 2014)).

2.3.4 Intestinale Stammzellen

Das Darmepithel ist das sich am schnellsten erneuernde Gewebe im menschlichen Körper. Im Dünndarm erneuern sich Epithelzellen alle drei bis fünf Tage (Paneth-Zellen alle drei bis sechs Wochen), im Dickdarm alle fünf bis sieben Tage. Epithelzellen, die am Ende ihrer Lebensdauer angekommen sind, werden dabei einfach ins Darmlumen abgegeben (siehe Abbildung 4: *Anoikis* = griechisch „heimatlos“; Zellen gehen in Apoptose nach Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes). Im Darmepithel müssen daher Stammzellen mit großer Selbsterneuerungskapazität vorkommen, die aufgrund dessen auch von großem Forschungsinteresse sind: die intestinalen Stammzellen.

Bei den intestinalen Stammzellen wird grundsätzlich zwischen ruhenden und proliferierenden Stammzellen unterschieden. Die aktiv proliferierende Stammzellpopulation bildet die Grundlage für die Regeneration des Darmepithels während die ruhende Stammzellpopulation als Reserve für die Reaktion auf Epithel-Verletzungen dient. Die proliferierende Stammzellpopulation kann auch über die ruhende Stammzellpopulation regeneriert werden. Parallel existieren für intestinale Stammzellen also zwei unterschiedliche Modelle:

1. das „crypt base columnar cell (CBCC)“ bzw. LGR5⁺ Modell = aktiv proliferierende Stammzellen
2. das „label-retaining cells +4 (LRC+4)“ Modell = ruhende Stammzellen.

Das „crypt base columnar cell (CBCC)“ bzw. LGR5⁺ Modell

CBCC-Zellen bzw. LGR5⁺-Zellen (nach der Expression des Markers LGR5) sind aktiv proliferierende Stammzellen mit großem Selbsterneuerungspotential. Sie kommen an der Kryptenbasis sowohl im Dün- als auch im Dickdarm vor und sind in der Lage zu transient amplifizierenden (TA) Tochterzellen zu differenzieren. Die TA-Zellen selbst sind weitere Vorläuferzellen, die sich schnell teilen und von der Kryptenbasis in Richtung Darmlumen migrieren. Während der Migration differenzieren die TA-Zellen in Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Bürstenzellen. Nur die zur Abwehr wichtigen

4 Beratung und Kontakt

Ansprechpartner

Dr. Gabriele Gröger
Albert-Einstein-Allee 45
89081 Ulm



Tel 0049 731 – 5 03 24 00
Fax 0049 731 – 5 03 24 09

gabriele.groeger@uni-ulm.de
www.uni-ulm.de/saps

Geschäftsführender Direktor der SAPS: Prof. Dr.-Ing. Hermann Schumacher

Postanschrift

Universität Ulm
School of Advanced Professional Studies
Albert-Einstein-Allee 45
89081 Ulm

Der Zertifikatskurs „Stammzellen und regenerative Medizin“ wurde entwickelt im Projekt CrossOver, das aus Mitteln des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg und vom Ministerium für Soziales und Integration Baden-Württemberg aus Mitteln des Europäischen Sozialfonds gefördert wird (Förderkennzeichen: 696606).
