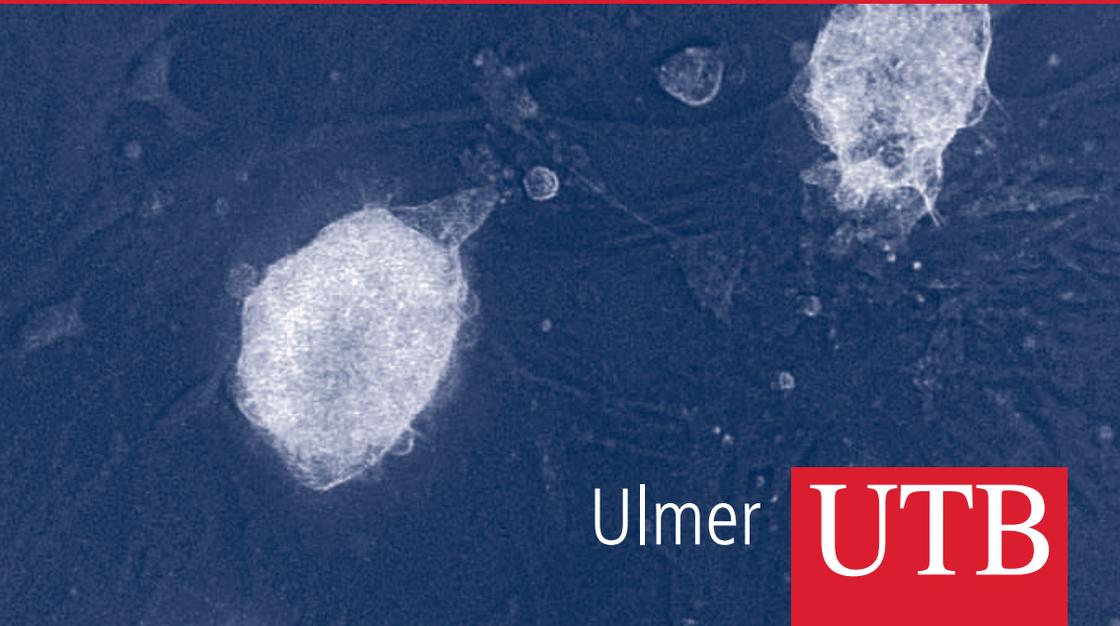


Susanne Kühl
Michael Kühl
Stammzellbiologie



Ulmer

UTB



Eine Arbeitsgemeinschaft der Verlage

Böhlau Verlag · Wien · Köln · Weimar

Verlag Barbara Budrich · Opladen · Toronto

facultas.wuv · Wien

Wilhelm Fink · München

A. Francke Verlag · Tübingen und Basel

Haupt Verlag · Bern · Stuttgart · Wien

Julius Klinkhardt Verlagsbuchhandlung · Bad Heilbrunn

Mohr Siebeck · Tübingen

Nomos Verlagsgesellschaft · Baden-Baden

Ernst Reinhardt Verlag · München · Basel

Ferdinand Schöningh · Paderborn · München · Wien · Zürich

Eugen Ulmer Verlag · Stuttgart

UVK Verlagsgesellschaft · Konstanz, mit UVK/Lucius · München

Vandenhoeck & Ruprecht · Göttingen · Bristol

vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich

Susanne Kühl | Michael Kühl

Stammzellbiologie

63 Abbildungen
13 Tabellen

Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Prof. Dr. Michael Kühl, Studium und Promotion der Biochemie in Berlin, Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Bereich der Entwicklungsbiologie in Ulm, Seattle (USA) und Göttingen. Seit 2002 Universitätsprofessor für Biochemie und Molekulare Biologie. Forschungsschwerpunkte im Bereich der intrazellulären Signaltransduktion und deren Bedeutung in der frühen embryonalen Entwicklung. Seit 2006 auch Leiter der International Graduate School in Molecular Medicine Ulm.

Dr. Susanne Kühl, Studium der Biologie und Promotion in den Naturwissenschaften an der Universität Ulm. Seit vielen Jahren tätig in der Grundlagenforschung im Bereich der Entwicklungsbiologie.

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikationen in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-8252-3735-6 (UTB)
ISBN 978-3-8001-2945-4 (Ulmer)

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

© 2012 Eugen Ulmer KG
Wollgrasweg 41, 70599 Stuttgart (Hohenheim)
E-Mail: info@ulmer.de
Internet: www.ulmer.de
Lektorat: Sabine Mann
Titelfoto: Purushotama R. Tata, PhD
Herstellung: Jürgen Sprenzel
Umschlagentwurf: Atelier Reichert, Stuttgart
Satz: Atelier Reichert, Stuttgart
Grafiken: Dr. Susanne Kühl
Druck und Bindung: Freiburger Graphische Betriebe, Freiburg
Printed in Germany

ISBN 978-3-8252-3735-6 (UTB-Bestellnummer)

Inhaltsverzeichnis

Vorwort 7

1 Einführung: einige Grundlagen der Entwicklungs- und Molekularbiologie 9

- 1.1 Differenzierung 10
- 1.2 Frühe Entwicklung: Konzept der drei Keimblätter 14
- 1.3 Methoden zum Nachweis der differentiellen Genaktivität 15
- 1.4 Regulation der Entwicklung: extrazelluläre Wachstumsfaktoren 16

2 Regeneration im Tierreich 22

- 2.1 Regeneration in *Hydra* 25
- 2.2 Regeneration in Planarien 31
- 2.3 Regeneration in Urodelen 35
- 2.4 Regeneration in Zebrafischen 43
- 2.5 Regeneration in adulten Säugern 52

3 Embryonale Stammzellen zeigen vielfältige Entwicklungsmöglichkeiten 57

- 3.1 Begriffsklärung: Was ist eine Stammzelle? 57
- 3.2 Embryonale Stammzellen 62
- 3.3 Das molekulare Netzwerk embryonaler Stammzellen 67
- 3.4 Epigenetik 72
- 3.5 Das Entwicklungspotenzial von Stammzellen 81
- 3.6 Humane ES-Zellen 84
- 3.7 Zielgerichtete Differenzierung von embryonalen Stammzellen 88
- 3.8 Embryonale Stammzellen als Therapieoption: auftretende Probleme 90
- 3.9 Ethische Problematik bei der Verwendung humaner ES-Zellen 91

4 Adulte Stammzellen: ein Überblick 94

- 4.1 Das Konzept der Stammzellnische 95
- 4.2 Migration adulter Stammzellen 99
- 4.3 Therapieansätze mit adulten Stammzellen 100

5 Adulte Stammzellen des Knochenmarks 102

- 5.1 Die Stammzellen des Knochenmarks 102

5.2	Herkunft hämatopoetischer Stammzellen	105
5.3	Identifizierung hämatopoetischer Stammzellen	105
5.4	Molekulare Signatur und Reinigung hämatopoetischer Stammzellen	106
5.5	Die Stammzellnische hämatopoetischer Stammzellen	110
5.6	Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen	114
5.7	Klinische Anwendung hämatopoetischer Stammzellen	116
5.8	Die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks	121
5.9	Die endothelialen Vorläuferzellen des Knochenmarks	126
6	Gewebeständige adulte Stammzellen	133
6.1	Adulte Stammzellen des Skelettmuskels	133
6.2	Stammzellen des zentralen Nervensystems	138
6.3	Stammzellen der Haut	145
6.4	Stammzellen des Darms	148
7	Reprogrammierung: die Umkehr der embryonalen Entwicklung	158
7.1	Die historischen Wurzeln	158
7.2	Die Arbeiten von BRIGGS, KING und GURDON an Fröschen	161
7.3	Kerntransfer bei Säugetieren	165
7.4	Molekulare Mechanismen der Reprogrammierung durch Kerntransfer	167
7.5	Kerntransfer beim Menschen: therapeutisches versus reproduktives Klonen	169
8	Induzierte pluripotente Stammzellen	175
8.1	Gewinnung von iPS-Zellen	176
8.2	Andere Möglichkeiten der Reprogrammierung	184
8.3	Verbesserungen der iPS-Zell-Technologie	184
8.4	Anwendungsoptionen von iPS-Zellen	186
8.5	Gezielte Transdifferenzierung oder direkte Reprogrammierung	193
9	Rechtliche Aspekte der Stammzellforschung	196
9.1	Ethische Argumente in der Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen	196
9.2	Das deutsche Embryonenschutzgesetz	200
9.3	Das Stammzellgesetz	201
9.4	Internationale Regelungen	202
9.5	Rechtliche Aspekte zur Klonierung vom Menschen	204
10	Anhang	207
10.1	Meilensteine der Stammzell- und Regenerationsbiologie	207
10.2	Glossar	209
	Register	215

Vorwort

Die Stammzellbiologie ist eine hochaktuelle Teildisziplin der Biologie. Sie eröffnet bis vor Kurzem noch ungeahnte Möglichkeiten in der Forschung sowie im Bereich der regenerativen Medizin. Bereits heute haben die neuesten Ergebnisse der Stammzellbiologie unser Verständnis fundamentaler biologischer Prozesse grundlegend verändert. Dieses Buch legt in verschiedenen Kapiteln die Eigenschaften von embryonalen und adulten Stammzellen dar. Auch werden die Möglichkeiten zur Generierung individueller, körpereigener Stammzellen mithilfe von Reprogrammierung und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) vorgestellt. Ein gesondertes Kapitel geht auf Regenerationsprozesse im Tierreich ein. Die ethischen und rechtlichen Aspekte der Stammzellforschung in Deutschland und in anderen Ländern werden in einem eigenen Kapitel betrachtet. Abschließend dient ein Serviceteil mit Register, Zeittafel und Glossar dem Leser zur leichteren Orientierung. Wir hoffen, dass dieses Buch eine derzeit bestehende Lücke im Angebot von Lehrbüchern schließen kann.

Dieses Buch beruht auf verschiedenen Lehrveranstaltungen, die wir seit einigen Jahren für Bachelorstudenten der Studiengänge Molekulare Medizin, Biologie und Biochemie sowie für Studenten der Humanmedizin an der Universität Ulm halten. Weitergehende Lehrbücher, Übersichtsartikel und Originalarbeiten, die uns bei der Zusammenstellung unserer Lehrveranstaltungen inspiriert haben, sind in den Literaturangaben zu den einzelnen Kapiteln wiedergegeben. Den interessierten Lesern seien sie zur weiteren Lektüre empfohlen.

Einer ganzen Reihe von Kollegen möchten wir besonders danken, da ihr Beitrag, ob Fotos oder Anmerkungen zu den Texten, wesentlich zum Gelingen dieses Buches beigetragen hat. Fotos für die Abbildungen haben freundlicherweise bereitgestellt: Kerstin Bartscherer (Münster), Daniel Wehner, Chi-Chung Wu und Gilbert Weidinger (Ulm), Thomas Holstein (Heidelberg), Lenhard Rudolph und Tobias Sperka (Ulm), Stefan Liebau (Ulm) sowie die aktuellen oder ehemaligen Mitglieder unseres Institutes Petra Pandur und Purushotama T. Rao. Weiterhin gilt unser Dank den Kollegen und Kolleginnen, die einzelne Kapitel auf Fehler und Verständlichkeit geprüft haben und deren Hinweise sehr hilfreich waren: Thomas

Hollemann (Halle), Annemarie Hempel, Wiebke Cizelsky, Alexander Kleger, Stefan Liebau, Hans und Angelika Kestler sowie Alpaslan Tasdogan (alle Ulm). Fehler, die sich trotz aller Bemühungen eingeschlichen haben sollten, gehen einzig und allein auf unser Konto. Abschließend sei Frau Sabine Mann und Frau Alessandra Kreibaum vom Ulmer Verlag gedankt, welche die Vorbereitung für dieses Buch freundlich und kompetent begleitet haben.

Den Lesern und Leserinnen unseres Buches wünschen wir viel Spaß bei der Lektüre. Wir hoffen, den Stoff übersichtlich und verständlich dargestellt zu haben.

Ulm, Januar 2012

Dr. Susanne Kühl, Prof. Dr. Michael Kühl

Einführung: einige Grundlagen der Entwicklungs- und Molekularbiologie

1

Inhalt

Die Vorgänge, die für die Stammzellbiologie relevant sind, ähneln in vielen Aspekten denen während der Embryonalentwicklung. Daher ist ein Grundwissen an entwicklungsbiologisch relevanten Prozessen für ein Verständnis der Stammzellbiologie essenziell. In diesem einführenden Kapitel werden Vorgänge wie die Differenzierung von Zellen, die Bildung der Keimblätter und auch ausgewählte intrazelluläre Signalwege vorgestellt, die in die frühe Entwicklung involviert sind.

Unter regenerativer Medizin versteht man allgemein den Ersatz und die Reparatur verloren gegangener bzw. beschädigter Gewebe zur Erhaltung oder Wiedererlangung der Funktionalität des betroffenen Gewebes oder Organs. Insbesondere erhofft man sich von der regenerativen Medizin, die Folgen einer Erkrankung so zu mildern, dass die Lebenszeit der Betroffenen verlängert und insbesondere deren Lebensqualität verbessert wird. Von zentraler Bedeutung für die regenerative Medizin sind Zellen mit herausragenden Eigenschaften, die Stammzellen. Prinzipiell unterscheidet man zwei Typen von Stammzellen, die adulten und die embryonalen Stammzellen.

Adulte Stammzellen (**Kapitel 4 bis 6**) kommen, wie der Name schon sagt, in Geweben/Organen adulter Organismen vor. Besonderes Charakteristikum dieser Stammzellen ist ihre Fähigkeit, abhängig von ihrer Lokalisation, unterschiedliche Gewebe kontinuierlich zu erneuern oder nach Verletzung zu ersetzen. Des Weiteren können sie *in vivo*, als auch *in vitro* in verschiedene Zelltypen differenzieren. Von besonderem Interesse für die regenerative Medizin sind auch Stammzellen mit embryonalem Charakter, die embryonalen Stammzellen (**Kapitel 3**).

Aus diesen Gründen richtet sich ein besonderes Augenmerk der wissenschaftlichen Gemeinschaft wie auch der breiten Öffentlichkeit auf diese Stammzellen. So könnte der Ersatz von verloren gegangenen, funktionellem Herzgewebe infolge eines Herzinfarkts mithilfe von Stamm-

zellen zu einer verbesserten Herzfunktion und damit einer gesteigerten Lebensqualität überlebender Patienten beitragen. Auch beim *Diabetes mellitus* vom Typ I (juveniler Diabetes) könnten Insulin-produzierende β -Zellen des Pankreas, die durch die Krankheit verloren gegangen sind, durch differenzierte Stammzellen ersetzt werden. Andere Einsatzgebiete der regenerativen Medizin sind der Ersatz verloren gegangenen Nerven-, Haut- oder Knochengewebes.

Zur Beantwortung der Frage, wie solche geschädigten Strukturen und Organe in der Therapie ersetzt werden könnten, lohnt sich auch ein Blick ins Tierreich. Dort stoßen wir auf eine Vielzahl von Organismen, die in der Lage sind, verlorene Gewebeteile zu regenerieren. Beispiele hierfür werden in [Kapitel 2](#) vorgestellt. Einige dieser Regenerationsprozesse involvieren auch Stamm- oder Vorläuferzellen.

Weiterhin werden wir erfahren, dass die Prozesse und Signalwege während der Regeneration und in der Stammzellbiologie denen ähneln, welche wir auch aus der Embryonalentwicklung kennen. Ein tieferes Verständnis der Stammzellbiologie setzt daher grundlegende Kenntnisse aus der Entwicklungsbiologie voraus, wie sie in einführenden Lehrbüchern der Entwicklungsbiologie vermittelt werden. In diesem einführenden Kapitel sollen einige Grundbegriffe der Entwicklungsbiologie erklärt und wiederholt werden, um die wichtigsten Aspekte dieses Buches verstehen zu können. Der vorgebildete Leser kann dieses Kapitel überspringen und sogleich mit der Lektüre bei [Kapitel 2](#) beginnen. Anderen Lesern sei das Studium dieses einführenden Kapitels empfohlen.

1.1 | Differenzierung

Der Begriff Differenzierung (lat. *differe*, sich unterscheiden) bezeichnet ganz allgemein die Unterscheidung zwischen zwei Zuständen. In der Entwicklungsbiologie beschreibt die Differenzierung jenen Prozess, in welchem eine weniger spezialisierte Zelle, auch Vorläuferzelle genannt, in eine spezialisierte Zellen umgewandelt wird ([Abb. 1.1A](#)). Dieser Vorgang, der sich während der embryonalen Entwicklung ständig wiederholt, ist die Grundlage für die Entwicklung einer befruchteten Eizelle (Zygote) in einen komplexen Organismus mit vielen unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen. Auf molekularer Ebene äußert sich dieser Prozess unter anderem in der differentiellen Genaktivität, d.h. in der unterschiedlichen Expression von Genen in verschiedenen Zelltypen. Weiterhin bedeutet dies, dass nicht in jeder Zelle das gesamte Genom transkribiert und translatiert wird, d.h. in Protein übersetzt wird (Details siehe [Info-box 1.1](#)), sondern, dass je nach Zelltyp ganz unterschiedliche Gene aktiv

exprimiert werden. Somit wird gewährleistet, dass jede Zelle durch ihre Proteinausstattung ihre vorgesehene Funktion übernehmen kann. Die Entscheidung in eine bestimmte Entwicklungsrichtung wird über interne und externe Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise die Aktivität von bestimmten Transkriptionsfaktoren, der Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen oder die Interaktion mit benachbarten Zellen.

Die Differenzierung einer Zelle kann in drei aufeinander folgende Teilschritte gegliedert werden: die Spezifikation, die Determinierung und die terminale Differenzierung. Durch die Spezifikation und Determinierung wird das zukünftige Schicksal einer Zelle festgelegt. Eine determi-

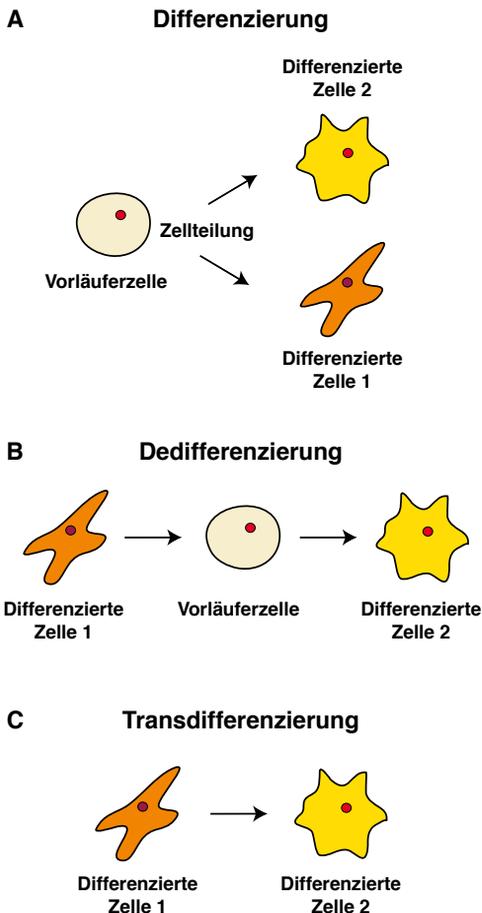


Abb. 1.1

Differenzierung, Dedifferenzierung und Transdifferenzierung

A. Die Differenzierung beschreibt die Entwicklung von einer weniger spezialisierten in stärker spezialisierte Zellen. Durch Proliferationsprozesse können aus einer Vorläuferzelle auch verschiedenen spezialisierte Zellen entstehen. **B.** Die Dedifferenzierung beschreibt die Umkehr des Differenzierungsprozesses von einer differenzierten Zelle. Gegebenenfalls kann die Dedifferenzierung so weit voranschreiten, dass wieder eine Vorläuferzelle entsteht, aus der auch ein unterschiedlicher Zelltyp differenzieren kann. **C.** Bei der Transdifferenzierung geht eine differenzierte Zelle direkt in einen anderen differenzierten Zelltyp über.

nierte Zelle behält ihr programmiertes Entwicklungsziel bei, auch wenn sie aus ihrer ursprünglichen Umgebung in eine neue verpflanzt wird. Im Gegensatz hierzu würde sich eine nicht determinierte Zelle an die neue Umgebung anpassen. Sie würde ein der neuen Umgebung entsprechendes Entwicklungsschicksal eingehen. Eine spezifizierete Zelle behält ihr Entwicklungsschicksal nur dann bei, wenn sie aus ihrem ursprünglichen Gewebeverband herausgenommen und isoliert weiter kultiviert wird. Durch den Einfluss äußerer Faktoren wäre noch eine Änderung der Entwicklung möglich. Diese Beispiele veranschaulichen, dass je nach Entwicklungsstand Zellen auf äußere Einflüsse reagieren oder nicht. Die terminal differenzierte Zelle stellt letztlich den funktionellen Zelltyp dar, dessen Entwicklung abgeschlossen ist.

Infobox 1.1

Genexpression und deren Regulation

Die DNA (engl. *desoxyribonucleic acid*) ist die Trägerin der gesamten Erbinformation eines lebenden Organismus. In RNA-Viren kann die Erbinformation auch in Form von RNA (engl. *ribonucleic acid*) gespeichert sein. Streng genommen gehören Viren allerdings nicht zu den Lebewesen, da sie ohne Wirtszelle nicht lebens- und vermehrungsfähig sind.

Die Bausteine der DNA sind die Nukleotide, die sich jeweils aus einem Phosphatrest, einem Zucker (aus 2-Desoxy-D-ribose) und einer Base zusammensetzen. Der Zucker und der Phosphatrest bilden das sog. Zuckerphosphatrückgrat, während die Basen am Zucker gebunden sind. Man unterscheidet die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T). Die Aneinanderreihung durch eine Phosphodiesterbindung einzelner Nukleotide ergibt einen DNA-Strang. In einer DNA sind zwei solcher Stränge gegenläufig (revers-komplementär) aneinandergelagert und zu einer Doppelhelix umeinander gewunden, wobei dies über Wechselwirkung (Wasserstoffbrückenbindungen) der Basen von je zwei Nukleotiden erfolgt: A bildet Wasserstoffbrücken mit T aus, G solche mit C.

Um die Verpackung der gesamten DNA auf kleinstem Raum (des Zellkerns) zu ermöglichen, ist die DNA in Form von Chromatin angeordnet. Dabei ist die negativ geladene DNA-Doppelhelix um positiv geladene Histonproteine gewickelt. Zudem spielen Modifikationen der Histone und der DNA selbst eine Rolle in der Verpackungsdichte des Chromatins (siehe dazu auch Kapitel 3.4.2).

Ein Gen wird durch einen bestimmten Abschnitt auf einem der beiden DNA-Stränge und eine spezifische Kombination der vier Basen, der Sequenz des Gens definiert. Die Gene werden durch die Transkription erst in RNA-Moleküle und später mithilfe der Translation in Proteine überscriben, die unter anderem für die Struktur und Funktion einer Zelle verantwortlich sind.

Neben den protein-codierenden Genabschnitten befinden sich auf den DNA-Strängen auch regulatorische Bereiche, durch welche das Ablesen der Gene gesteuert wird: die Promotor- und Enhancer-Regionen. Sogenannte Transkriptionsfaktoren (Proteine) können mit ihrer DNA-Bindedomäne an diese DNA-Abschnitte (engl. *response elements*) sequenzspezifisch binden und so die Expression von Genen positiv (Aktivatoren) oder negativ (Repressoren) regulieren. Die Aktivierung wie auch die Hemmung der Transkription erfolgt über die Rekrutierung weiterer Proteine und deren Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie.

Durch die Kombination verschiedener regulatorischer DNA-Abschnitte in den Promotor- und Enhancerbereichen, an welche entsprechende Transkriptionsfaktoren binden, gelingt es, die Expression einzelner Gene gewebespezifisch zu steuern. Oft liegen diese regulativen Elemente in einem kürzeren DNA-Abschnitt gehäuft (geclustert) vor, welcher als *cis-regulatives Modul* (CRM) bezeichnet wird. Mithilfe dieser Module kann die Expression sowohl räumlich als auch zeitlich genau gesteuert werden. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren steht zusätzlich häufig unter der Kontrolle äußerer Signale, die intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und so den Transkriptionsfaktor über posttranslationale Modifikationen verändern können.

posttranslational:
zeitlich nach der
Translation

Nach Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren wird ein protein-codierendes Gen mithilfe der RNA-Polymerase II abgelesen und in eine hnRNA (heterogene nukleäre RNA; auch Prä-RNA) umgeschrieben, ein Vorgang der als Transkription bezeichnet wird. Beim Ablesen der DNA muss daher zunächst die Chromatinstruktur der DNA gelockert werden, um den entsprechenden DNA-Bereich für die RNA-Polymerase zugänglich zu machen. Dies wird durch Chromatin-Remodellierungsfaktoren wie z.B. *Histon-Acetyltransferasen* (HAT) und *Histondeacetylasen* (HDAC) erreicht.

Die hnRNA beinhaltet neben den protein-codierenden Abschnitten, auch Exons genannt, sog. Introns, welche im Allgemeinen nicht-codierende Abschnitte darstellen. Diese Introns werden in einem folgenden Schritt durch den Vorgang des Spleißens entfernt und die Exons aneinandergefügt. Mithilfe des differenziellen Spleißens können aus einem Primärtranskript durch das Aneinanderfügen alternativer Exons verschiedene mRNA-Spezies (Spleißvarianten) eines Gens erzeugt werden, die für unterschiedliche Proteine codieren. Die Anzahl der Proteine eines Organismus ist daher deutlich größer als die Anzahl seiner protein-codierenden Gene.

Neben dem Spleißen werden durch Prozessierung die beiden Enden der hnRNA modifiziert (Cap-Struktur und Poly-A-Schwanz), wobei schlussendlich das mRNA Molekül (engl. *messenger RNA*) hervorgeht. Dieses verlässt den Zellkern durch Poren in der Kernmembran und steht im Zytoplasma für die anschließende Translation (Proteinsynthese) an den Ribosomen zur Verfügung. Die Kombination dreier Basen (Triplet) auf Ebene der DNA/RNA codiert hierbei für eine Aminosäure auf Ebene der Proteine. Der ganze Prozess wird auch als Proteinbiosynthese bezeichnet.



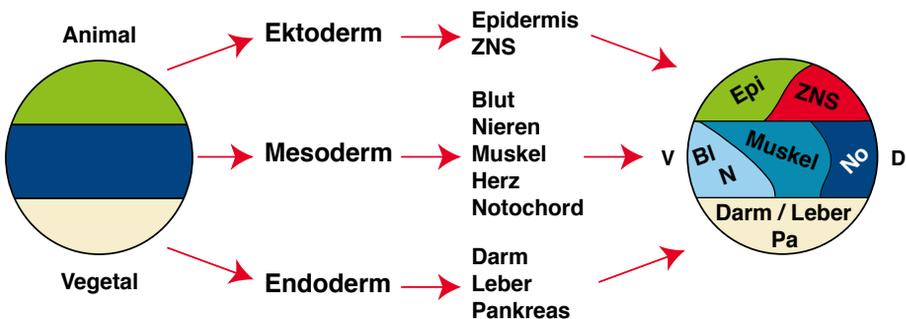
1.2 | Frühe Entwicklung: Konzept der drei Keimblätter

Bereits kurz nach der Befruchtung kommt es während der Entwicklung zu einer Aufteilung des Embryos in die drei verschiedenen Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Durch die Aktivierung definierter Transkriptionsfaktoren und deren gegenseitige Regulierung kommt es zunächst zu einer gegenseitigen Abgrenzung der Keimblätter innerhalb des Embryos. Während der weiteren Entwicklung differenzieren die Zellen der drei Keimblätter in verschiedene Derivate. So bildet sich aus dem Ektoderm einerseits das Nervensystem und andererseits die Epidermis, also die äußere Schicht des Organismus. Das Mesoderm unterteilt sich weiter in unter anderem die Skelettmuskulatur, das Knochensystem, die Niere, das Herz und das Blut. Das Endoderm schließlich bildet die inneren Verdauungsorgane wie den Darm, die Leber und das Pankreas aber auch die Lunge und die Schilddrüse aus (Abb. 1.2). Während die Einteilung in die drei Keimblätter im Rahmen der extrakorporalen Entwicklung wie beispielsweise bei *Xenopus laevis* oder *Danio rerio* relativ einsichtig ist, verläuft die Entwicklung bei Säugetieren deutlich komplizierter, da sich aus der befruchteten Eizelle auch extraembryonale Gewebe entwickeln. Diese sind für die Entwicklung des Embryos essenziell, später jedoch nicht Bestandteil des adulten Organismus.

Differenzierungsprozesse sind durch zwei Merkmale charakterisiert: Einerseits kommt es währenddessen zu einer immer stärkeren Spezialisierung der Zellen, die letztlich in der Übernahme einer ausgewählten Funk-

Abb. 1.2

Keimblätter und Zellschicksalskartierung in *Xenopus*. Links: Im *Xenopus*-Embryo im Blastulastadium sind die drei Keimblätter Ektoderm (animaler Pol), Mesoderm (Marginalzone) und Endoderm (vegetaler Pol) festgelegt. Mitte: Derivate des jeweiligen Keimblatts sind angegeben. Rechts: Innerhalb jedes Keimblatts sind die Zellen, die zu den unterschiedlichen Organen beitragen, von dorsal (D) nach ventral (V) schon früh in der Entwicklung angeordnet. Man spricht von einer Schicksalskarte. Abkürzungen: Bl, Blut; Epi, Epidermis; N, Niere; No, Notochord; Pa, Pankreas; ZNS, zentrales Nervensystem.



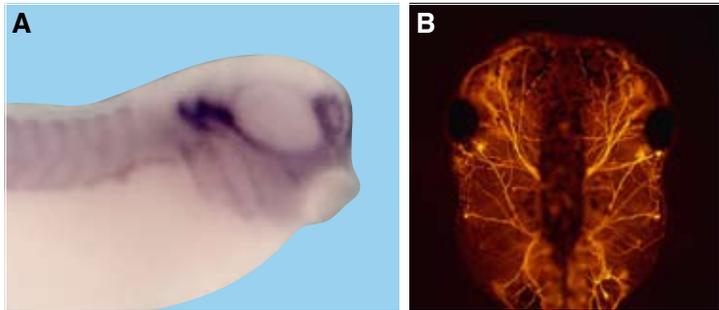
tion mündet. In diesem Zusammenhang spricht man von einer terminal differenzierten Zelle, die in der Regel den Zellzyklus verlassen hat und sich damit nicht mehr teilt. Gleichzeitig nehmen die Differenzierungsmöglichkeiten einer Zelle kontinuierlich ab. Andererseits sind terminale Differenzierungszustände relativ stabil. Unter normalen physiologischen Bedingungen kommt es nicht zu einer Umkehr der Differenzierung, bei der eine differenzierte Zelle in eine weniger differenzierte Zelle übergeht. Auch gibt eine terminal differenzierte Zelle nicht ihre Funktionen auf und nimmt einen anderen Differenzierungszustand ein. Wissenschaftlich ausgedrückt kommt es unter physiologischen Bedingungen in der Regel weder zu einer Dedifferenzierung noch zu einer Transdifferenzierung (Abb. 1.1 B, C). Wie wir sehen werden, können aber gerade solche Mechanismen bei Regenerationsvorgängen (siehe Kapitel 2) beobachtet werden.

Methoden zum Nachweis der differenziellen Genaktivität | 1.3

Wie in den vorangegangenen Absätzen erläutert, beruht die Entwicklung auf der gewebe-spezifischen Aktivierung von Genen, die einerseits für die Entwicklung in ein bestimmtes Derivat, andererseits aber auch für die Funktion einer terminal differenzierten Zelle unabdingbar sind. Die Aktivität solcher Gene kann durch verschiedene Methoden verfolgt werden, welche auf dem Nachweis des mRNA-Intermediates oder des eigentlichen Genprodukts, dem Protein, beruhen. Diese beinhalten einerseits die RT-PCR (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*), die sowohl semi-quantitativ als auch quantitativ durchgeführt werden kann. Bei dieser Methode wird die Aktivität von Genen durch die Gegenwart von definierten mRNA-Molekülen dargestellt. Dabei wird das Gen von Interesse durch Amplifikation mithilfe von gen-spezifischen Desoxyoligonukleotiden (Primer) und einer geeigneten DNA-Polymerase erfasst. Diese Methode erlaubt insbesondere eine Quantifizierung der Expressionsstärke. Ein geübter Wissenschaftler kann mit dieser Methode zu späteren Zeitpunkten der Entwicklung auch die gewebespezifische Expression eines Gens durch das Isolieren bestimmter Gewebe und Organe analysieren.

Für den einfachen Nachweis der gewebespezifischen Expression eines Gens bedient man sich der sog. *whole mount In-situ*-Hybridisierung (Abb. 1.3 A). Bei dieser Methode generiert man zunächst ein RNA-Molekül, welches revers-komplementär zum nachzuweisenden endogenen mRNA-Molekül ist. Diese Sonde paart entsprechend den Basenpaarungsregeln (siehe Infobox 1.1) mit einer endogen gebildeten mRNA. Durch den Einbau modifizierter Desoxyoligonukleotide ist der Nachweis dieses Hybrids mithilfe geeigneter Antikörper möglich.

Abb. 1.3



Ausgewählte Methoden zur Visualisierung der Genexpression. **A.** Durch die Methode der *whole mount In-situ-Hybridisierung* kann die räumliche Expression eines Gens auf RNA Ebene durch das Einsetzen einer *antisense* RNA-Sonde und einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Dargestellt ist der Kopf eines *Xenopus*-Embryos (laterale Ansicht, anterior rechts) in Stadium 30. Die Expression des Transkriptionsfaktors Six1 (engl. *SIX homeobox 1*) wurde durch eine Blaufärbung sichtbar gemacht. Six1 ist in den kranialen Plakoden exprimiert, aus denen sich die späteren Hirnnerven entwickeln (siehe B). **B.** Mithilfe einer Antikörperfärbung kann die Expression eines Gens auf Proteinebene visualisiert werden. Dargestellt ist der Kopf einer *Xenopus*-Kaulquappe (dorsale Ansicht, anterior oben). Verwendet wurde der Antikörper 3A10, der spezifisch an Neurofilamente bindet und dadurch alle Ganglien sichtbar macht. Zu sehen sind im Speziellen die Hirnnerven von *Xenopus*.

Darüber hinaus ist die Darstellung der Expression eines Gens auch durch den Nachweis des Genproduktes, des Proteins, möglich (Abb. 1.3B). Diese Methode allerdings ist nur dann möglich, wenn gegen das betreffende Protein spezifische Antikörper erhältlich sind. Diese primären Antikörper können in der Regel über sekundäre Antikörper, welche mit einem Enzym oder einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, detektiert werden. Auf diese Weise lässt sich die Expression eines Proteins und somit die Aktivität eines Gens in Zellen oder aber auch im ganzen Embryo nachweisen.

1.4 | Regulation der Entwicklung: extrazelluläre Wachstumsfaktoren

Die gewebespezifische Aktivierung von Genen, die für die Entwicklung essenziell ist, wird insbesondere durch den Einfluss von extrazellulären Wachstumsfaktoren reguliert. Wachstumsfaktoren können aufgrund ihrer proteinbiochemischen Zusammensetzung und Struktur in verschiedene Familien eingeteilt werden. Für ein besseres Verständnis der biochemischen Vorgänge, die der regenerativen Biologie und der Stammzellbiologie zugrunde liegen, sollen an dieser Stelle ausgewählte Wachstumsfaktorfamilien und deren Signaltransduktionswege vorgestellt werden (Abb. 1.4). Dabei beschränken wir uns auf diejenigen, die in den weiteren Kapiteln angesprochen werden.

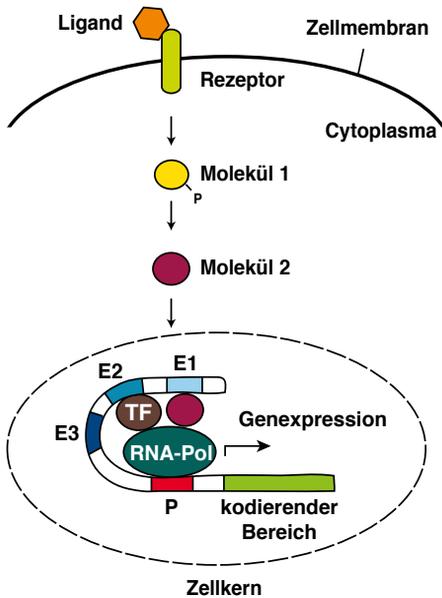


Abb. 1.4

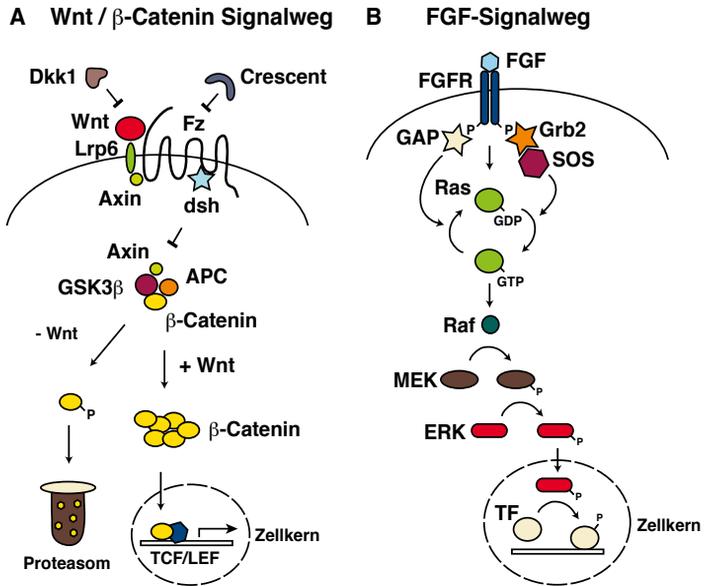
Signaltransduktion. Ein Ligand bindet an einen Rezeptor, der auf der Oberfläche einer Zelle präsentiert wird. Dieser Rezeptor wird in der Folge aktiviert (z.B. durch Autophosphorylierung). Innerhalb der Zelle können nun weitere Moleküle aktiviert werden (z.B. über Phosphorylierung). Moleküle am Ende der Kaskade wandern in den Zellkern ein und binden dort mit spezifischen Transkriptionsfaktoren (TF) an regulatorische Elemente (Enhancer, E; Promotor, P) auf der DNA. Im Zusammenspiel mit der RNA-Polymerase (RNA-Pol) wird so die Genexpression moduliert.

Der Wnt-Signalweg

Wnt-Proteine sind extrazelluläre Glycoproteine, von denen in höheren Vertebraten 19 Familienmitglieder bekannt sind. Zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege binden Wnt-Proteine an Rezeptoren der Frizzled-Familie und an eine Reihe verschiedener Co-Rezeptoren wie LRP-5/6, *ror2* oder *ryk* (Abb. 1.5 A). Intrazellulär kommt es durch die Aktivierung der unterschiedlichen Rezeptoren zu verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden. Der am besten charakterisierte, sogenannte kanonische Wnt-Signalweg wird durch die Stabilisierung des zytosmatischen Proteins β -Catenin charakterisiert. In Abwesenheit von Wnt-Liganden wird β -Catenin im Zytoplasma kontinuierlich abgebaut. Hierfür ist die Wirkung des *Destruction-Komplexes* essenziell, der aus den Proteinen APC, Axin und GSK3 β besteht. GSK3 β ist in der Lage, β -Catenin zu phosphorylieren und damit für die durch Ubiquitin vermittelte Degradation vorzubereiten. In Gegenwart eines Wnt-Liganden zerfällt der *Destruction-Komplex*, β -Catenin wird im Zytoplasma nicht mehr abgebaut und damit stabilisiert. Es kann anschließend in den Kern eindringen und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (engl. *T-cell factor*, *lymphoid enhancer factor*), um ausgewählte Zielgene zu aktivieren.

1.4.1

Abb. 1.5



Alternative Namen für Kinasen der MAPK-Kinase-Kaskade:

MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) = **ERK** (engl. *extracellular signal regulated kinase*)

MAPKK (engl. *mitogen activated protein kinase kinase*) = **MEK**

MAPKKK (engl. *mitogen activated protein kinase kinase kinase*) = **Raf** (engl. *ras activated factor*)

Ausgewählte Signalwege I. A. Der kanonische oder Wnt/β-Catenin-Signalweg. Details siehe Haupttext. APC, Axin und GSK3β bilden den *Destruction-Komplex*. **B.** Der FGF-Signalweg. Details siehe Haupttext. Abkürzungen: APC, *Adenomatöses Polyposis Coli*; ERK, *extrazellulär regulierte Kinase*; Dkk1, *Dickkopf 1*; FGF, *fibroblast growth factor*; FGFR, *fibroblast growth factor receptor*; Grb2, *growth factor receptor-bound protein 2*; GSK3β, *Glycogen-Synthase-Kinase-3β*; LEF, *lymphocyte enhancer factor*; LRP6, *lipoprotein-related protein receptor 6*; Sos, *son of sevenless*; TCF, *T-cell factor*; TF, *Transkriptionsfaktor*.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass der kanonische Wnt-Signalweg durch die pharmakologische Inhibition der GSK3β aktiviert werden kann. Ein häufig verwendeter GSK3β-Inhibitor in diesem Zusammenhang ist die Substanz BIO (6-Bromoindirubin-3'-oxim). Auch Lithiumchlorid wird häufig als Inhibitor der GSK3β verwendet, doch ist die Spezifität von Lithiumionen als GSK3β-Inhibitor sehr viel geringer. Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, dass auch von β-Catenin unabhängige Wnt-Signalwege beschrieben werden konnten.

1.4.2

Der FGF-Signalweg

FGF-Proteine (engl. *fibroblast growth factor*) bilden die Familie der fibroblasten-ähnlichen Wachstumsfaktoren. Diese aktivieren einen intrazellulären Signaltransduktionsweg durch Bindung an den FGF-Rezeptor (Abb. 1.5 B). Bei diesem handelt es sich um einen Tyrosinkinaserzeptor, der anschließend intrazellulär eine Kaskade verschiedener Kinasen akti-

vieren kann, sodass es letztlich zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren kommt, die ihrerseits Zielgene aktivieren können.

Der BMP- oder TGFβ-Signalweg

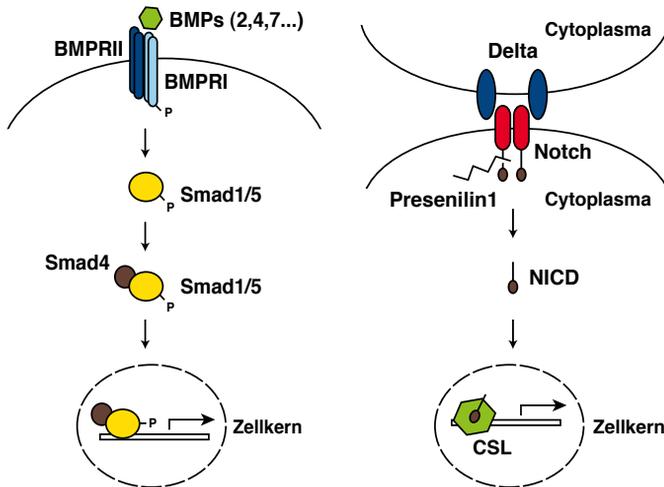
1.4.3

Wachstumsfaktoren der BMP-Familie (engl. *bone morphogenetic protein*) gehören in die große Familie der TGFβ-ähnlichen Wachstumsfaktoren (engl. *transforming growth factor*). Diese Faktoren aktivieren durch die Bindung an Rezeptoren der Serin-Threonin-Kinasefamilie einen intrazellulären Signaltransduktionsweg, in den verschiedene Smad-Proteine involviert sind (Abb. 1.6A). Durch die Aktivierung des BMP-Rezeptorkomplexes kommt es zur Phosphorylierung intrazellulärer Smad-Proteine, der Rezeptor-Smads oder R-Smads, die nachfolgend mithilfe eines weiteren Smad-Proteins, dem Co-Smad Smad4, in den Zellkern einwandern und dort durch die Bindung an regulatorische Bereiche auf der DNA direkt die Genexpression regulieren können. Um die Signalspezifität verschiedener Mitglieder der TGFβ-Familie extrazellulärer Wachstumsfaktoren sicherzustellen, binden diese an verschiedene Rezeptoren und verwenden teilweise unterschiedliche intrazelluläre Smad-Proteine.

A BMP-Signalweg

B Notch/Delta-Signalweg

Abb. 1.6



Ausgewählte Signalwege II.

A. BMP-Signalweg. **B.** Notch/Delta-Signalweg. Details siehe Haupttext. Abkürzungen: BMP, *bone morphogenetic protein*; BMPRI, *bone morphogenetic protein receptor*; CSL, *CBF1/RBPJ-k/Su(H)/Lag1*; NICD, *notch intracellular domain*.

1.4.4 | Der Notch-Signalweg

Von besonderer Bedeutung ist darüber hinaus der Notch/Delta-Signalweg (Abb. 1.6 B). Dabei bildet Notch den Rezeptor auf der empfangenden Zelle. Liganden für den Notch-Rezeptor werden durch Mitglieder der Delta-Familie repräsentiert. Im Gegensatz zu den vorher genannten Wachstumsfaktoren, die alle sezerniert werden und damit im Extrazellulärraum frei diffundieren können, wird Delta als ein Transmembranprotein auf einer benachbarten Zelle präsentiert. Somit kommt es nur durch einen direkten Zell/Zell-Kontakt zur Übertragung eines Signals auf die notch-exprimierende Nachbarzelle. Durch Bindung des Delta-Liganden an den Notch-Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung des letzteren, wobei die intrazelluläre Domäne abgespalten wird. Diese intrazelluläre Domäne von Notch (Notch-ICD, engl. *intracellular domain*) wandert in den Zellkern und interagiert dort mit Transkriptionsfaktoren. So wird sichergestellt, dass nach Aktivierung des Notch-Signalwegs Zielgene reguliert werden können. In letzter Zeit haben sich auch Daten ergeben, die auf die Existenz eines weiteren, hiervon abweichenden Notch-Signalwegs hinweisen.

Neben diesen Schlüsselsignalwegen der embryonalen Entwicklung, die auf die Genexpression und damit auf die zelluläre Differenzierung Einfluss nehmen, gibt es noch eine Reihe weiterer Signaltransduktionswege, die, wenn nötig, in den nachfolgenden Kapiteln direkt angesprochen werden. An dieser Stelle sollte man sich jedoch vor Augen halten, dass diese Signalwege neben der Differenzierung von Zellen auch viele andere zelluläre Prozesse beeinflussen können. Dazu gehören die Zellproliferation, das Zellüberleben, die Apoptose oder auch morphogenetische Bewegungen wie Zellwanderungsprozesse.

Apoptose: der programmierte Zelltod

Zusammenfassung

Durch ein besseres Verständnis der Prozesse in der Stammzellbiologie erhoffen sich Wissenschaftler, Ärzte und Patienten die Entwicklung neuer Therapieansätze. In den letzten Jahren hat sich mehr und mehr herausgestellt, dass regenerative Prozesse denen der Entwicklungsbiologie sehr ähnlich sind. Dabei spielen Vorgänge wie die Differenzierung von Zellen eine entscheidende Rolle. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Wachstumsfaktoren wie Wnts, FGFs, BMPs und Notch nicht nur während der embryonalen Entwicklung essenziell sind, sondern auch in der Stammzellbiologie wichtige Aufgaben übernehmen.

Fragen

- 1 Was versteht man unter der Differenzierung einer Zelle?
- 2 Was bedeuten die Begriffe Dedifferenzierung und Transdifferenzierung?
- 3 Was sind Transkriptionsfaktoren? Was ist deren Aufgabe?
- 4 Wie kann die Aktivität von Genen im Embryo nachgewiesen werden? Beschreiben sie drei unterschiedliche Methoden.
- 5 Beschreiben sie die Signaltransduktionswege des kanonischen Wnt-, des FGF-, des BMP- und des Notch/Delta-Signalwegs.

Referenzen

Als Referenzen zur weitergehenden Lektüre seien für dieses einführende Kapitel grundlegende Lehrbücher der Entwicklungsbiologie, Molekularbiologie und Zellbiologie genannt, die über den hier behandelten Stoff weit hinausgehen:

- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERT, P. WALTER (2008): *Molecular Biology of the Cell*. 5. Auflage, Garland Science, Abingdon UK.
- DAVIDSON, E.H. (2008): *The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, Niederlande.
- GERHART, J., M. KIRSCHNER (1997) *Cells, Embryos, and Evolution*. Blackwell Science, Massachusetts, USA.
- GILBERT, S.F. (1994): *The Conceptual History of Modern Embryology*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.
- GILBERT, S.F. (2010): *Developmental Biology*. 9. Auflage, Sinauer Associates Massachusetts, USA.
- JANNING W., KNUST E. (2008): *Genetik*. 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- KÜHL, M., S. GESSERT (2010): *Entwicklungsbiologie*. UTB Basics, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- WILKINS, A.S. (2002): *The Evolution of Developmental Pathways*. Sinauer Associates Massachusetts, USA.
- WOLPERT, L. (2006): *Principles of Development*. 2. Auflage, Oxford University Press, Oxford.

2 | Regeneration im Tierreich

Inhalt

Verschiedene Organismen weisen unterschiedliche Fähigkeiten zur Regeneration nach Verletzungen auf. Bei diesem Vorgang der reparativen Regeneration beobachtet man unterschiedliche zelluläre Mechanismen: einerseits ein Ersatz von Gewebe ausgehend von bereits spezialisierten, terminal differenzierten Zellen, andererseits die Neubildung ausgehend von undifferenzierten Stammzellen. Letztere spielen auch bei der zyklischen Regeneration von Geweben, dem *Turnover*, eine besondere Rolle.

Unter dem Begriff „Regeneration“ versteht man im biologischen Kontext wörtlich übersetzt die „Wiedererzeugung“ von Geweben. Die erste Beschreibung zur Regeneration des Schwanzes bei Eidechsen datiert bis ins Jahr 1686 zurück, als MELCHISÉDECH THÉVENOT vor der Pariser Akademie der Wissenschaften von diesen Fähigkeiten berichtete. Erste Arbeiten zur Regenerationsfähigkeit von Invertebraten reichen gut 250 Jahre zurück. Dabei wurden im Wesentlichen die zweikeimblättrige Hydra und dreikeimblättrige Planarien untersucht. Mittlerweile wurden die Arbeiten zur Regeneration auch auf Amphibien, Fische und Mäuse ausgeweitet.

Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Formen der Regeneration unterscheiden: Einerseits die reparative Regeneration, andererseits die physiologische oder zyklische Regeneration. Die reparative Regeneration ist der Ersatz von verloren gegangenem Gewebe eines Körpers, beispielsweise in Folge einer Verletzung. Wesentliches Ziel dieses regenerativen Vorganges ist die Wiederherstellung eines Gewebes inklusive Struktur, Form und Funktionalität. Hier seien die auch beim Menschen bekannte Wundheilung oder die Neubildung von Blutzellen nach Blutverlust genannt. Im Tierreich hingegen gibt es sehr viel weiter reichende Fähigkeiten zur reparativen Regeneration. Bereits erwähnt ist die Fähigkeit einer Eidechse, einen verloren gegangenen Schwanz nachwachsen zu lassen. Auch sind Molche in der Lage, ganze Extremitäten nach einer Amputation zu regenerieren; ganz offensichtlich eine Fähigkeit, die den

zweikeimblättrige (diploblastische) Organismen: Organismen mit zwei Keimblättern (Ektoderm und Endoderm)

dreikeimblättrige (triploblastische) Organismen: Organismen mit den drei Keimblättern Ektoderm, Mesoderm, Endoderm