



Seminarfacharbeit

Wie können Stammzellen gegen Muskeldystrophie helfen?

Autoren:

Nick Schachtebeck

Antonio Noack

Richard Berk

Maximilian Kirchhof

Seminarfachlehrer: Fr. Stahl

Innenbetreuer: Fr. Westhus

Außenbetreuer: Fr. Dr. Julia von Maltzahn

Abgabetermin: 02.10.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Danksagung.....	2
2	Vorwort.....	3
3	Stammzellen.....	4
3.1	Allgemeines zu Stammzellen.....	4
3.2	Embryonale und adulte Stammzellen.....	4
3.3	Stammzellen im Tier- und Pflanzenreich.....	6
4	Muskeldystrophie.....	8
4.1	Geschichtlicher Hintergrund von Muskeldystrophie.....	8
4.2	Symptome von Muskeldystrophie.....	8
4.3	Molekulare Ursachen der Muskeldystrophie.....	9
4.4	Therapiemaßnahmen zu Typ Duchenne (DMD).....	10
4.5	Muskeldystrophie Typ Becker Knie.....	11
4.6	Therapiemaßnahmen zu Typ Becker Knie.....	12
4.7	Die mdx Maus als Modellorganismus für DMD.....	12
5	Experimentelle Durchführung.....	13
5.1	Aufbau und Durchführung des Experiments.....	13
5.2	Zählung mit dem Programm ImageJ.....	14
5.3	Generierung eines Programms zur automatischen Auswertung von Muskelschnitten.....	14
5.4	Auswertung der erhaltenen Daten.....	17
5.5	Diskussion der gewonnenen Ergebnisse.....	19
6	Gesellschaftliche Grundlagen der Stammzellenforschung.....	21
6.1	Rechtliche Grundlagen der Stammzellenforschung.....	21
6.2	Ethnische Vorstellungen der Stammzellenforschung.....	22
7	Nutzen und Zukunftsaussichten für Menschen und Patienten.....	24
8	Anhang.....	1
9	Quellenverzeichnis.....	12
10	Glossar.....	15
11	Eidesstattliche Erklärung.....	16

1 Danksagung

Wir möchten uns bei all unseren Lehrern bedanken, die uns auf diese Arbeit vorbereitet haben. Insbesondere möchten wir Frau Stahl und Frau Westhus danken, die uns während unserer Arbeit mit Ratschlägen zur Verfügung standen. Besonderer Dank gebührt unserer Außenbetreuerin Frau Dr. Julia von Maltzahn und ihrem Labor, die uns während unserer Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit der wir zusammen am Leibniz Institut für Altersforschung experimentieren durften.

2 Vorwort

Unheilbare Krankheiten zu behandeln, dass ist die Vorstellung von Therapien mit Stammzellen. Die Stammzellen gelten als wahre Alleskönner unter den Zellen. Viele unterschiedliche Ansätze zur Behandlung verschiedenster Krankheiten werden zurzeit erforscht, z.B. die Behandlung von Arthrose in den Gelenken oder die Regeneration geschädigter Nerven und des Gehirns selbst. Die Muskeldystrophie ist eine weitere Krankheit, die viele verschiedene Formen aufweist und bei deren Behandlung die Stammzelltherapie eine entscheidende Rolle spielen könnte. Es gibt viele betroffene Menschen, so ist durchschnittlich jeder 3500ste Junge von Duchenne'scher Muskeldystrophie betroffen. Bislang gibt es noch keine wirksame Therapie zur Heilung oder Verlangsamung der Erkrankung. Das Krankheitsbild ist durch eine kurze Lebenserwartung, Muskelschwäche und damit oftmals ein Leben im Rollstuhl und frühen Tod geprägt. Sind die Stammzellen geeignet, um gegen eine noch unheilbare Krankheit zu helfen? Wann kann man auf erste gute Ergebnisse in der Humanmedizin hoffen? In dieser Arbeit betrachten wir die Stammzellen und die Krankheit der Muskeldystrophie näher und wollen Möglichkeiten der Heilung dieser Krankheit mit Stammzellentherapie aufzeigen.

3 Stammzellen

3.1 Allgemeines zu Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die bestimmte Charakteristika erfüllen. Sie haben eine praktisch unendliche Teilungsrate, die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und können in ein bestimmtes oder in verschiedene Gewebe differenzieren. Stammzellen werden allgemein in zwei Gruppen unterteilt; in die embryonalen Stammzellen und adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind Stammzellen, die im Embryo vorkommen und omnipotent/totipotent in Bezug auf ihre Differenzierungsmöglichkeiten sind. Die embryonalen Stammzellen werden aufgrund ihrer Gewinnung in drei Gruppen unterteilt: ES-Zellen (engl. embryonic stem cells) diese werden aus frühen embryonalen Stadien gewonnen, EC-Zellen (engl. embryonic carcinoma cells) welche aus Tumorzellen (zum Beispiel Hodentumorzellen) gewonnen werden und die EG-Zellen (engl. embryonic germ cells) diese werden aus Keimzellen des Fötus gewonnen. Die Forschung an menschlichen Embryonen ist in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz verboten, aus diesem Grund werden das mdx Maus Modell und weitere Tiermodelle sowie adulte menschliche Stammzellen verwendet.

3.2 Embryonale und adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind Stammzellen, die im ausgewachsenen Mensch oder Tier vorkommen. Die adulten Stammzellen sind jedoch nur multi-, oligo- oder unipotent und können nicht in die Derivate aller drei Keimblätter differenzieren, sondern nur bestimmtes Gewebe bilden. Die drei Keimblätter sind Ektoderm, Mesoderm und Endoderm, aus denen sich alle Gewebe des Körpers bilden. Die adulten Stammzellen kommen in verschiedenen Geweben vor, so zum Beispiel im Muskelgewebe oder im Rückenmark. Darin jedoch nur in sogenannten Stammzellnischen. Diese Stammzellnischen sind bestimmte Areale im Gewebe, in welchem die adulten Stammzellen ihren Stammzellcharakter aufrechterhalten können. Bei Absterben oder Beschädigung von Gewebezellen können die adulten Stammzellen zu diesem Gewebe mittels des Homing oder interstitieller Migration neue Gewebezellen bilden, um auf diese Weise das Beschädigte zu ersetzen. Die Gewinnung von adulten Stammzellen ist einfacher und ethisch weniger umstritten als die Gewinnung embryonaler Stammzellen. Adulte Stammzellen sind jedoch nicht so differenzierbar wie embryonale Stammzellen. Sie können aber durch Dedifferenzierung (Reprogrammierung) in eine pluripotente Stammzelle umgewandelt werden und anschließend erfolgreich in den gewünschten Gewebetyp differenziert werden. Mit adulten Stammzellen wurden schon Therapieansätze durch verschiedene Untersuchungen an den Stammzellen geschaffen, so zum Beispiel die Knochenmarktransplantation zur Heilung von Leukämie. Dennoch sehen die Forscher das größere Potenzial bei ES-Zellen, da diese pluripotent sind und somit in jedes Gewebe differenzieren können. Ein Ansatzpunkt der

Forscher ist es adulte Stammzellen aus somatischen Zellen des Patienten zu gewinnen, indem man mittels eines Virus (als Transportvehikel) Gene hineinbringt, die zu einer Dedifferenzierung/Reprogrammierung in adulte Stammzellen führt. Die eingebrachten Gene (Yamanaka-Faktoren) werden normalerweise nur in embryonalen Stammzellen exprimiert. Die dabei entstehenden Stammzellen sind sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen), die sehr ähnliche Merkmale aufweisen, wie die ES-Zellen. Außerdem kann man durch Nukleustransfer die DNA eines Spenders in entkernte Zygoten einbringen. Diese Zellen werden dann kultiviert und man lässt sie in Zellen des Zielgewebes differenzieren. Dies ist das sogenannte therapeutische Klonen, da die entstehenden Zellen dieselbe genetische Information haben wie der Spender. Bei dieser Methode zeigen jedoch die neusten Forschungserkenntnisse, dass trotz der Tatsache, dass die undifferenzierte Zelle die gleiche DNA wie der Spender hat, es bei der Entkernungsmethode Abstoßungsreaktionen gibt. Dies wurde am Maus-Modell überprüft; dabei wurde die Abstoßungsreaktion auf das Fehlen der mitochondrialen DNA zurückgeführt. Dies war bis dato die Hoffnung der Forscher, dass durch die gleiche DNA der Empfänger keine Abstoßungsreaktionen zeigt. Wenn diese Probleme nicht gelöst werden können, muss wie bei anderen Transplantationen das Immunsystem des Empfängers durch eine Therapie unterdrückt werden. An dieser Stelle sei ein besonderer Augenmerk auf zwei Stammzelltypen der Muskulatur gelegt, die Satellitenzellen und die MDSCs (engl: muscle-derived-stem-cells). Die Satellitenzellen verfügen nur über die Fähigkeit, die Produkte des Mesodermalen Keimblatts zu bilden, also Muskelzellen. Es gibt zwei Arten von Satellitenzellen, die ruhenden und die aktiven. Die Ruhenden zeichnen sich durch geringe Aktivität des Transkriptionsfaktors Myf5 aus, während die aktiven Satellitenzellen eine hohe Aktivität des Transkriptionsfaktors Myf5 aufweisen. Bei beiden Typen konnte eine Aktivität der Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass bei der asymmetrischen Zellteilung die ruhenden Satellitenzellen zur Erhaltung der Satellitenpopulation dienen, während die Aktiven die Differenzierung in Muskelfasern übernehmen. Die MDSCs dagegen sind multipotent und haben dadurch ein höheres therapeutisches Potential, da sie auch in glatte Muskulatur wie Herzmuskelzellen differenzieren können. Die MDSCs wurden schon erfolgreich gegen die Krankheit Muskeldystrophie im Mausmodell wie auch bei Menschen angewandt. Dabei ist das Ziel der Forschung dem Patienten die MDSCs mit dem fehlerhaften Gen zu entnehmen und diese zu reparieren, also das fehlerhafte Gen zu ersetzen. Diese körpereigenen reparierten MDSCs werden dem Patienten dann wieder transplantiert, sodass die MDSCs nun gesunde Muskelzellen bilden können und somit die Krankheit gestoppt wird. Es gibt jedoch auch andere Ansätze: so wurde bei Patienten, die durch Makuladegeneration oder Morbus Stargard ihr Augenlicht langsam verloren, embryonale Stammzellen in Zellen der Netzhaut differenziert und anschließend transplantiert. Bei den Patienten wurde dadurch die Zerstörung der Netzhautzellen gestoppt oder gar rückgängig gemacht. Die Methode, die hinter diesen Versuchen steckt, funktioniert

folgendermaßen: Es werden ES-Zellen aus frühen embryonalen Stadien gewonnen. Diese ES-Zellen werden nun mit einem speziellen Nährmedium unter speziellen Bedingungen kultiviert. Dabei wird ein Inhibitor dazugegeben, um zu verhindern, dass die pluripotenten ES-Zellen spontan in anderen Zellen differenzieren. Es wird versucht, die ES-Zellen in das gewünschte Gewebe differenzieren zu lassen. Die differenzierten ES-Zellen werden in das betroffene Gewebe injiziert, wo sie sich unter Idealbedingungen ansiedeln und die Funktion des betroffenen Gewebes übernehmen. Die Differenzierung ist schwierig, da man mittels Transkriptionsfaktoren die Expression bestimmter Differenzierungsgenen erreichen muss. Ein Beispiel wäre: wenn man eine pluripotente ES-Zelle ohne Inhibitor in einem Nährmedium kultiviert, würde sie spontan zum Beispiel in Leberzellen differenzieren. Bei der zielgerichteten Differenzierung von ES-Zellen gibt es neben dem Problem, dass man Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren finden muss, die die Zellen in den gewünschten Zelltyp differenzieren lassen, auch das Problem, dass die Differenzierung ebenfalls von dem Nährmedium und anderen Faktoren abhängig ist. Um die zielgerichtete Differenzierung erfolgreich anwenden zu können, muss man zunächst erforschen, wie die Genexpression durch die Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren abläuft und wie die Signalwege in der Zelle ablaufen. Zum Beispiel wie der Faktor Wnt7a die Zellen zur besseren Zellteilung und zum besseren Wachstum anregt. Diese Signalwege sind noch nicht komplett erforscht. Einige weitere Probleme bei dieser Methode sind, dass nach der Transplantation die ES-Zellen in Mäusen nicht zwangsläufig das gesuchte/angestrebte Gewebe gebildet haben, sondern es zur Tumorbildung kommt. Abschließend kann man sagen, dass sowohl embryonale Stammzellen wie auch adulte Stammzellen Potenzial für neue Therapien zur Heilung von Krankheiten und Verletzungen besitzen. Welche dieser Stammzellen bei einer Behandlung zum Einsatz kommen, wird die Forschung in den nächsten Jahren zeigen.

3.3 Stammzellen bei Tieren und Pflanzen

Die drei Keimblätter sind die erste Differenzierung des Embryos in verschiedene Zellschichten. Die bilateralsymmetrischen (lat. „bis latus“ = zweiseitig) Tiere sind triploblastisch, bestehen in diesem Stadium also aus drei Keimblättern. Nahezu alle Tiere sind triploblastisch, nur wenige, wie z.B. einige Stämme der Nesseltiere und die Rippenquallen sind diploblastisch. Aus dem inneren, ektodemalen Keimblatt differenzieren sich später der Verdauungstrakt (außer Mundhöhle und After) inklusive seiner Drüsen, Leber, Pankreas, Schilddrüse, Thymus, Atmungstrakt, Harnblase und Harnröhre. Das mittlere, mesodermale Keimblatt differenziert, beim Menschen in der dritten Entwicklungswoche, in die Knochen, die Skelettmuskulatur, Bindegewebe, die glatte Muskulatur der Eingeweide, Herz, Blutgefäße und Blutkörperchen, Milz, Lymphknoten, Lymphgefäße, Nebennierenrinde, Nieren, Keimdrüsen, innere Geschlechtsorgane und Mikroglia. Aus dem endodermalen Keimblatt entstehen Haut, Nervensystem, Sinnesorgane und Zähne. Bei den meisten Pflanzen spielen Stammzellen eine

geringere Rolle als bei den Tieren, da aus fast jeder Zelle ein vollständiger neuer und lebensfähiger Organismus werden kann. Stark diskutiert sind hingegen die fetalen Stammzellen. Sie sind multipotente Stammzellen, also zwischen adulten und embryonalen Stammzellen. Dadurch sind die bisherigen genetischen Schäden noch gering und ein hohes Wachstumspotential vorhanden. Sie können relativ einfach aus abgetriebenen Feten isoliert werden, was jedoch Probleme aufwirft; die Kritiker an der Abtreibung, sowie die Kritiker an der Gewinnungsweise. Doch bisher sind die fetalen Stammzellen die einzige Hoffnung Regionen mit wenigen adulten Stammzellen, wie z.B. das Gehirn zu behandeln. Vor allem werden im Moment zu neuro-degenerativen Krankheiten, wie Parkinson oder Chorea Huntington Studien durchgeführt. Für eine einzige Behandlung braucht man etwa zwei bis acht Feten aus der fünften bis zwölften Schwangerschaftswoche. Da diese Stammzellen sehr schwer zu vermehren und schwierig zu bekommen sind, wird man versuchen, diese Krankheiten auch mit den iPS oder den embryonalen Stammzellen zu behandeln.

4 Muskeldystrophie

4.1 Geschichtlicher Hintergrund von Muskeldystrophie

Im Jahre 1868 wurde die Duchenne'sche Muskeldystrophie von dem französischen Neurologen und Namensgeber „Guillaume Benjamin Amand Duchenne de Boulogne“ (*1806-† 1875) erstmals beschrieben. Er bezeichnete sie als „Paralysie Musculaire Pseudo-hypertrophique“, was frei übersetzt so viel wie „Pseudo-Paralyse des Muskels“ heißt.

Ende der 80er Jahre konnte das Dystrophin-Gen erfolgreich entschlüsselt werden und nur wenig später konnte auch das Produkt des größten menschlichen Gens entschlüsselt werden, das Dystrophin. Mit rund 2,4 Megabasen besteht eine große Wahrscheinlichkeit von Fehlern bei der Replikation. Bis heute ist die Duchenne'sche Muskeldystrophie die am besten erforschte Muskeldystrophie.

4.2 Symptome von Muskeldystrophie

Deutschlandweit sind etwa 2000 Fälle bekannt, d.h. einer von 3500 Jungen hat Duchenne'sche Muskeldystrophie. Die Betroffenen haben diese Krankheit von Geburt an. Ihr Leben ist von der Muskeldystrophie beeinflusst, schon früh machen sich erste Symptome bemerkbar. Bei dem Typ Duchenne ist ihre grobmotorische Entwicklung verzögert. Sie fallen häufig und haben Probleme sich zu fangen. Sobald sie anfangen zu laufen, beginnt ihr Wadenumfang größer zu werden. Dies wird als „Pseudohypertrophie“ bezeichnet. „Hypertrophie“ bedeutet ein verstärktes Wachsen oder eine verstärkte Ausprägung des Gewebes. „Pseudo“ zeigt dabei auf, dass dies nur so scheint. Etwa ab dem vierten Lebensjahr richtet ein gesundes Kind den Oberkörper aus der Rückenlage auf, während ein Kind mit Muskeldystrophie sich in die Bauchlage dreht, um in den Vierfüßler-Stand zu gelangen. Aus dieser Lage führt es die Hände von den Unterschenkeln zu den Oberschenkeln, um sich aufzurichten („Gowers' Zeichen“). Dies ist eine Folge der Muskelschwäche im Beckengürtel. Ebenfalls ab etwa dem vierten Lebensjahr folgt auf eine Kontraktur der Achillessehne ein Gang auf den Zehenspitzen, welcher später in Spitzfüßen endet. Durch eine schwache Bauch- und Rückenmuskulatur kommt es zu einem Hohlkreuz. In ihren Bewegungen sind sie durch Kontrakturen an Hüfte und Fußgelenk eingeschränkt. Durch ihre Schwäche im Schultergürtel kommt es zu abstehenden Schulterblättern (Scapulae alatae). Schwierigkeiten den Kopf aus der Rückenlage nach vorn zu beugen ergeben sich durch schwächere Muskulatur im vorderen Halsbereich. Es kann Skoliose auftreten, eine Verbiegung der Wirbelsäule, welche möglicherweise auch zu einer Verformung des Brustkorbs führt. Zusätzlich haben Betroffene eine schwache Atemmuskulatur und Herzmuskulatur, was zu Problemen beim Abhusten bei Erkältungen führen kann. Aus der schwachen Herzmuskulatur hingegen resultieren kaum offensichtliche Beschwerden. Etwa 1/3 der Erkrankten¹ haben eine

verminderte Lernfähigkeit, da Dystrophin auch im Hirngewebe vorkommt, nur in abgewandelter Form. Dadurch ist auch ihre Sprachentwicklung verzögert. Die Probleme durch das Fehlen des Dystrophin im Hirngewebe sind aber nicht fortschreitend wie die anderen Symptome. Ohne eine Behandlung sind die Jungen im Alter von acht bis zwölf Jahren bewegungsunfähig. Wenig Bewegung kann außerdem zu Übergewicht führen. Zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr kommt es schließlich zum Tod, aufgrund der ausfallenden Herz- oder Atemmuskulatur.

4.3 Molekulare Ursachen der Muskeldystrophie

Muskeldystrophie ist eine genetisch bedingte Krankheit, welche durch ein defektes Gen auf dem X-Chromosom der Mutter verursacht wird. Frauen haben zwei X-Chromosome Männer hingegen ein X- und ein Y-Chromosom. Durch ein zweites, „gesundes“ Gen auf dem zweiten X-Chromosom, welches sich gegen das defekte Gen durchsetzt, ist die Mutter in der Regel gesund. Da Männer aber nur ein X-Chromosom haben, sind sie von dieser Krankheit betroffen, sollten sie ein defektes Gen von ihrer Mutter erhalten haben. Trotzdem können auch bei der Frau Krankheitszeichen auftreten, aber nicht so signifikant wie bei einem Mann.

Muskeldystrophie ist damit eine X-Chromosomal rezessive Genmutation, das heißt, das betroffene Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und würde sich gegen ein „gesundes“ Gen nicht durchsetzen. Durch dieses defekte Gen wird das Protein Dystrophin nicht gebildet, welches zur Stabilisierung der Membran von Muskelfasern dient. Etwa 96 % der Muskeldystrophien² sind sogenannte „Frameshift“-Mutationen. Das englische Wort „frame“ bedeutet Rahmen, das Wort „shift“ bedeutet verlagern oder verschieben. Zum besseren Verständnis sollte man wissen, dass der genetische Code, also die DNA, eine Doppelhelix ist, die aus Tripletten besteht. Diese Tripletten bestehen wiederum aus drei Nukleotiden, welche aus einem Phosphorsäurerest, einem Zucker und einer Nukleobase (A, T, C oder G) bestehen. Durch die Triplets kann eine DNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt werden. Dadurch kann die Struktur eines Proteins abgelesen werden, wie z.B. die Struktur des Dystrophin. Ein Triplet bildet somit einen Rahmen („frame“). Würde man nun eine Base austauschen, würde dieses Triplet falsch abgelesen werden, die nachfolgenden Basen würden aber unverändert bleiben. Würde man hingegen eine Base entfernen, so verschiebt sich der Rahmen („shift“), da er nicht mehr durch drei teilbar ist. Somit wäre nicht nur ein Triplet falsch abgelesen, sondern alle nachfolgenden auch (siehe Bsp. „frameshift“). Etwa 30 % der Muskeldystrophien³ sind Neumutationen, das heißt sie treten erstmals bei diesem Individuum auf, wurden also nicht vererbt.

Bsp. "frameshift"

(Die eingeklammerten Sätze sind nur Beispiele zur Anschaulichkeit)

Korrekt : |TTC| |ATC| |GCG| |CCT| ...

(oder : ICH MAG DAS EIS)

Vertausch einer Base : |CTC| |ATC| |GCG| |CCT| ...

(oder : HCH MAG DAS EIS)

Fehlen einer Base : |_TC| |A TC| |G CG| |C CT| ...

(oder : |_CHM AGD ASE IS)

(Quelle von ^{1,2,3} Dr. Carsten Schröter , Dystrophinopatienten – Einleitung , <http://www.muskeldystrophie.de/duchenne/> ; leicht abgewandelt)

4.4 Therapie Maßnahmen zu dem Typ Duchenne

Eine mögliche Therapiemaßnahme bietet Kreatin. Kreatin ist eine organische Säure, die in Wirbeltieren u. a. zur Versorgung der Muskeln mit Energie beiträgt. Sie wird schon lange eingesetzt, um damit die maximale Leistungsfähigkeit des Muskels zu verlängern und die Erholungszeit nach einer Muskel Anstrengung zu verkürzen. Das Präparat könnte auch bei neuromuskulären Erkrankungen unterstützende Effekte zeigen. In Anbetracht der wenigen Nebenwirkungen kann Kreatin zusätzlich mit anderen Therapien gleichzeitig eingesetzt werden. Doch in höheren als den für das jeweilige Alter und Körpergewicht empfohlenen Dosen kann es zu Auskristallisierungen in der Blutbahn und dadurch zu Nierenschäden kommen.

Physiotherapie ist eine andere Variante, um die Muskulatur funktionsfähig zu erhalten. Das Hauptziel der Behandlung ist erst einmal das Aufrechterhalten der Symmetrie, das Vermeiden der Spitzfußstellung durch Verkürzung der Achillessehne und generell die Vermeidung der Verkürzung der Muskelbänder. Passives Dehnen und zur Nacht das Tragen von Sprunggelenksorthesen unterstützen diese Bemühungen. Orthesen sind Hilfsmittel die Korrigierend als auch entlastend für die betroffene Körperregion wirken. Im weiteren Verlauf sind ausgedehntere Orthesen, die Sprunggelenke und Knie betreffen notwendig um die Phase der Gehfähigkeit zu verlängern. Eine weitere Therapiemaßnahme wäre das Operieren, Ziel einer Operation ist, ein Streckdefizit der unteren Extremitäten in Hüft-, Knie- und Sprunggelenken sowie eine Adduktionseinschränkung der Hüftgelenke zu beheben. Unter Adduktion versteht man die seitliche Heranführung bzw. das Anlegen eines Körperteils zur Körpermitte oder der Längsachse einer Extremität hin. Auch bei Skoliosen besteht die Möglichkeit eines operativen Eingriffs. Als Skoliose versteht man die Seitenabweichung der Wirbelsäule von der Längsachse. Im Gegensatz zu der Physiotherapie hat das Training grundsätzlich das Ziel der Funktions- und Ausdauerverbesserung, nicht primär das Ziel der Kräftigung. In Anbetracht der verminderten Stabilität der Membran der Muskelfasern sind sogenannte exzentrische Bewegungen zu vermeiden. Exzentrische Bewegungen sind das

genaue Gegenteil zu konzentrischen Bewegungen und konzentrische Bewegungen sind Bewegungen bei denen die Muskelzellen im Inneren anschwellen. Durch Training mit leichter bis mäßiger Anstrengung ist je nach Belastbarkeit des Patienten eine Verbesserung der muskulären Ausdauer und der Leistungsfähigkeit des Herz-Kreislauf-Systems zu erreichen. Training hilft Schmerzen durch Fehlbelastungen zu mindern, durch die Steigerung der Leistungsfähigkeit. Um dies genau zu kontrollieren sind jedoch regelmäßige Untersuchungen notwendig. Auch in Hinsicht auf die Leistungsfähigkeit der Herzmuskulatur sind regelmäßige Verlaufsuntersuchungen notwendig, um bei einer Einschränkung der Funktionen eine medikamentöse Behandlung einleiten zu können, damit das Risiko eines Herzversagens so gering wie möglich gehalten wird. Sogenannte ACE-Hemmer und beta-Blocker haben sich als effektiv in der Verbesserung der Herzfunktion bei Patienten mit Muskeldystrophie vom Typ Duchenne gezeigt. Doch außer auf Medikamentöse Hilfsmittel ist man auch auf andere Hilfsmittel angewiesen. Diese können die Bewältigung der Beeinträchtigungen durch die Krankheit unterstützen oder erst ermöglichen. Beispielsweise gehören dazu Duschstuhl, Badewannen-Lifter, Toilettensitzerhöhungen, Rollstuhl, Rampen für den Rollstuhl, aber auch kleine Hilfen wie Greifzangen.

4.5 Muskeldystrophie Typ Becker Kiener

Die häufigste Form der Muskeldystrophie ist der Typ Duchenne, weit seltener ist der Typ Becker-Kiener. Dieser Typ wurde von dem deutschen Neurologen und Humangenetiker Peter Emil Becker zusammen mit Franz Kiener, einem deutschen Psychologen, entdeckt und beschrieben. Bei der Muskeldystrophie vom Typ Becker ist der Mangel an funktionsfähigem Dystrophin weniger ausgeprägt als bei dem Typ Duchenne, trotzdem aber immer noch vorhanden. Die Schwäche der Skelettmuskulatur ist wie bei der MD Duchenne an Schulter- und Becken-Gürtel betont. Dem entsprechend ist auch der Verlauf erheblich leichter. Die Vererbung verläuft hierbei wie bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne X-chromosomal rezessiv, dies bedeutet dass hauptsächlich Männer von der Erkrankung betroffen sind. Die Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener zeigt allerdings einen sehr unterschiedlichen Beginn und Verlauf. Schwächen können jederzeit beginnen. Schwierigkeiten beim Rennen und beim Treppensteigen sind oft die ersten Symptome, oft ist zudem die motorische Entwicklung verzögert. Die Gehfähigkeit kann im späten Jungendalter aufgehoben oder auch bis ins hohe Seniorenalter erhalten bleiben. Kontrakturen der Sprunggelenke kommen vor, müssen aber nicht auftreten. Auch eine Beeinträchtigung der Herzfunktion kann auftreten. Sie kann unabhängig von muskulären Schwächen oder vor ihnen auftreten.

4.6 Therapie Maßnahmen zu dem Typ Becker Kiener

Ähnlich wie bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne ist auch bei der Muskeldystrophie Typ Becker Kiener die Schwäche der Muskulatur ein Problem. Für den Typ Becker Kiener wurde eine Studie durchgeführt, die besagte: „bei langsam fortschreitenden Erkrankungen brachte ein 12-wöchiges Training mit normalen Widerstand eine Zunahme der Kraft um 4 bis 20 % ohne negative Effekte.“¹ Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass dieses Training bei unterschiedlichen neuromuskulären Erkrankungen ebenso unterschiedliche Erfolge aufweist. Es müssen zunächst noch genaue Datenerhebungen erfolgen um diese Hinweise zu bestätigen. Als hauptsächliche Therapiemaßnahme wird das Muskeltraining jedoch trotzdem angesehen, da man durch das Training nicht nur eine Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit erreicht, sondern es trägt auch dazu bei, das ideale Körpergewicht zu halten. Dabei ist aber darauf zu achten, die Muskelgruppen nicht zu überlasten, da dies mögliche unerwünschte Schmerzen der Glieder hervorruft. Als andere Therapiemaßnahme gäbe es genau wie bei dem Typ Duchenne die Möglichkeit, Kreatin dem Patienten zuzuführen. Eine weitere Möglichkeit wäre, den kompletten Ansatz der Therapiemaßnahmen zu verändern. Dazu gibt es viel versprechende Ansätze, die DNA (Desoxyribonukleinsäure), zu „reparieren“ oder innerhalb der Gebärmutter einer schwangeren Frau gestörte Chromosomenregionen zu erkennen und wenn möglich zu beeinflussen. Dies sind zum jetzigen Zeitpunkt aber nur Versuche, die innerhalb von Studien angewandt werden, da mögliche Nebenwirkungen nicht abschätzbar sind.

4.7 Die mdx Maus als Modellorganismus für DMD

Das mdx Maus Modell beschreibt eine Maus, bei der man dieselbe genetische Anomalie verursacht hat, wie bei Muskeldystrophie-Patienten. Das mdx Maus Modell soll verwendet werden, um Therapiemöglichkeiten für genetische Erkrankungen, wie Muskeldystrophie zu finden. MDX steht für murine (von Maus oder Ratte) X-Chromosomale Dystrophie. Für die Experimente werden Mäuse verwendet, da bei ihnen, wie bei den Menschenaffen, die Genpositionen im Vergleich zum Menschen am besten übereinstimmen und sie somit ein „ideales Krankheitsmodell“ darstellen. So konnten zum Beispiel auch schon zu Versuchszwecken Mäuse gezüchtet werden, die menschliche Krebsgene besitzen. Die mdx Maus, eine spezielle transgene Maus, hat einen genetischen Defekt auf dem X-Chromosom, der zu einer verminderten bis fehlenden Dystrophinproduktion unter anderem in den Muskelzellen führt, was dann zu Muskelschwäche und Fibrose des Gewebes führt. Der Defekt ist durch eine spontane Mutation einer Base entstanden.

¹ Quelle: <http://www.muskel-dystrophie.de/becker-kiener/>

5 Experimentelle Durchführung

Mit dem Experiment soll gezeigt werden, ob die Behandlung mit Wnt7a die Transplantationseffizienz erhöht. Hierzu wurden humane Myoblasten mit Wnt7a oder einer Kontrollsubstanz inkubiert und in Muskeln von mdx Mäusen transplantiert. 3 Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere getötet und ihre Muskeln isoliert. Die Dystrophin-positiven Fasern stammen also alle von humanen Myoplasten.

5.1 Aufbau und Durchführung des Experiments

Um an eine auswertbare Aussage zur Wirksamkeit der getesteten Methode zu gelangen, wird der Anteil Dystrophin positiver Fasern als Prozentsatz aller Fasern (Laminin-positiv) ermittelt. Um diese zu erhalten, muss man das zu untersuchende Genprodukt, also Dystrophin, sehen und auch die Zellen, die sonst nicht erkennbar sind, zählen können. Dafür verwendet man zwei Antikörper, die nur auf dem entsprechenden Stoff „halten“ und man dann mit fluoreszierenden Antikörpern, welche an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt sind, sichtbar machen kann. Diese können selber wieder nur an einem Antikörper angreifen. Die aus der Maus entnommenen Muskeln werden nach dem Tod der Maus in Paraformaldehyd fixiert und danach in einem Gemisch aus Saccharose und Tissue-Tek® (Verhältnis von 1:10) bei - 80°C eingefroren, wodurch sie fast unbegrenzt lagerfähig sind. Von den eingefrorenen Muskeln fertigt man bei - 20°C Kryoschnitte mit einer Dicke von ca. 14µm an, da man mit dieser Dicke die besten Schnitte erhält. Anschließend werden auf einen beschichteten Objektträger jeweils 3 Schnitte gelegt. Durch die Beschichtung haften sie am Objektträger. In einer feuchten Kammer werden danach die Schnitte mit 100%igem Ethanol, 1ml / Objektträger, für fünf Minuten fixiert und dann zweimal für fünf Minuten mit PBS, 0,2 ml / Objektträger gewaschen. Anschließend wurde mit Pferdeserum (5 % in PBS-) blockiert, da in diesem, wie auch in Eselserum oder Ziegenserum, so gut wie alle Proteine enthalten sind. Das Blockieren verhindert unspezifische Bindungen der Antikörper an Stoffen, an denen der Antikörper sonst haften würde. Dies geschieht, indem der Antikörper an Proteine in der Blockierungsflüssigkeit bindet und daher keine weiteren unspezifischen Bindungen mehr mit der Probe eingehen kann. Nach einer Stunde, einem empirisch ermittelten Wert, wird der erste Antikörper auf die Objektträger aufgetragen. Dieser besteht aus unverdünntem Mandra1 (Dystrophin-Antikörper), das sich an dem Dystrophin anlagert und 1:500 verdünnten Laminin-Antikörper, einem aus einem Hasen gewonnenen Antikörper. Nun werden die Objektträger einen Tag bei 4°C aufbewahrt, und dann dreimal mit PBS- für je fünf Minuten gewaschen. Darauf wird erneut eine 5 %ige (Pferdeserum in PBS) Blockierungslösung mit darin enthaltenem zweitem fluoreszierendem Antikörper auf die Objektträger aufgetragen. Dieser besteht aus dem Stoff Alexa 488, einem Esel-anti-Hase-Antikörper und dem Alexa 546, einem Esel-anti-Maus-Antikörper. Esel-anti-Hase bzw. Esel-anti-Maus heißt, dass die Antikörper aus einem Esel gewonnen wurden und spezifisch an

Proteine des Hasen oder der Maus binden. Die Zahl hinter Alexa gibt die Wellenlänge in nm an, bei der der Stoff fluoresziert. 488 nm entspricht grün und 546 nm entspricht rot. Anschließend wurde wieder dreimal mit PBS- für je fünf Minuten gewaschen. Darauf folgte die Dapi-Färbung. IN welcher wir Dapi im Verhältnis 1:8000 auf die Muskelschnitte gegeben haben. Das 4',6-Diamidin-2-phenylindol=Dapi färbt DNA blau. Danach wird zweimal mit PBS- gewaschen und anschließend mit Permafluor „eingedeckelt“, ein durchsichtiger Stoff, der bei Luftkontakt fest wird. Da das Permafluor bei Zimmertemperatur schneller fest wird, werden die Gläser nicht wieder eingefroren. Dann konnten wir uns die eigenen Färbungen unter speziellen Filtern und dem richtigem Licht unter einem Mikroskop bei 2000-facher Vergrößerung betrachten. Die Kamera, die die Bilder zum Auszählen erstellt, ist eine schwarz-weiß-Kamera, da diese eine höhere Lichtempfindlichkeit als Farbkameras aufweist. Die Farbe wird dann „eingerechnet“, damit man direkt alle Färbungen übereinander erkennen kann.

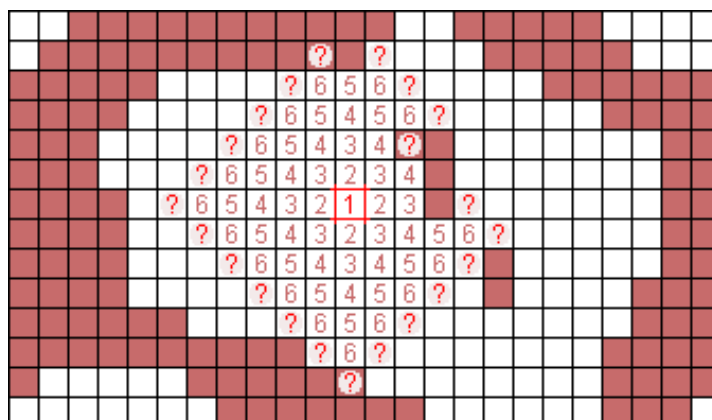
5.2 Zählung mit dem Programm ImageJ

Wir haben ein frei verfügbares Programm von dem Institut, welches es selbst verwendet, bekommen. Mit dem Programm zählen wir verschieden gefärbte Zellen (Lamini-positiv und Dystrophin-positiv) um die Proben auswerten zu können. Hierzu wählt man ein Bild aus, fügt es in dieses Programm ein, anschließend ist es für dieses konvertiert. Es standen verschiedene Operationen zur Verfügung, wir wählten eine mit dem Namen RGB-Stack, dieses wandelte das Bild in drei Farbkanäle, wobei jeder einzeln angezeigt wurde. Die drei Farbkanäle waren ein blauer Kanal, welcher irrelevant für uns war, da es die Zellkerne in Graustufen zeigte, welche wir vorher mit dem Farbstoff Dapi färbten, ein grüner Kanal, welcher uns durch Graustufen anzeigte wie viele Zellen das Laminin beinhalteten und ein roter, welcher uns Auskunft darüber gab, wie viele Zellen noch Dystrophin gebildet hatten. Wir wechselten zwischen rot und grün. Es erfolgte dann eine Auszählung per Hand. Dabei half uns das Programm ImageJ, denn damit konnten wir in die positiv gefärbte Zelle hineinklicken und das Programm zählte für uns, wie oft wir geklickt haben und zeigte uns die Stellen an, damit wir nicht eine Zelle doppelt zählten. Die erhaltenen Ergebnisse tauschten wir dann unter uns aus und verglichen.

5.3 Generierung eines Programms zur automatischen Auswertung von Muskelschnitten

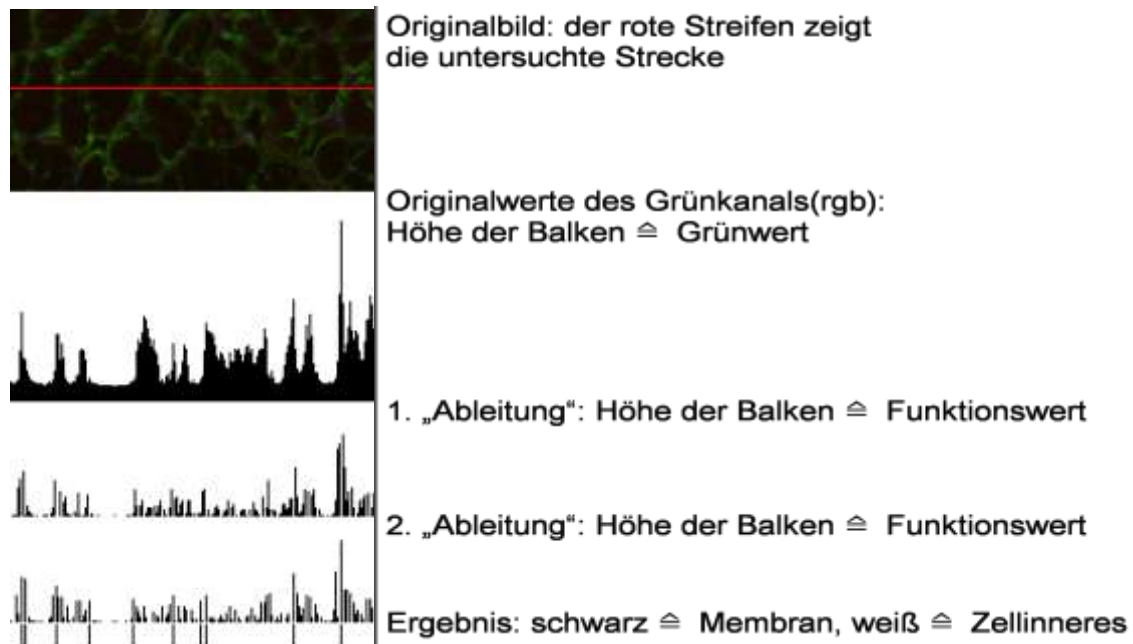
Um die aus dem Experiment erhaltenen, gefärbten Zellen auswerten zu können, muss man den Anteil der Dystrophin-positiven Zellen bestimmen. Dazu muss man die Dystrophin-positiven Zellen zählen und durch die Gesamtzahl (Lamini-positiv) teilen, die man ebenfalls zählen muss. Die Laminin positiven Zellen sind gegenüber den kaum zählbaren Dystrophin-positiven, relativ leicht zählbar (Abbildung von einem Muskelquerschnitt, nur grün), doch es sind sehr viele

Zellen zu zählen, sodass wir uns überlegt haben, ob es nicht möglich sei, ein Programm dafür zu entwickeln. Wie kann man Zellen zählen, die nur rot-grün-blau-Werte in einer Bilddatei sind? Um das zu verwirklichen, stellen wir uns das Bild als eine zweidimensionale Platte vor, aus der in die dritte Dimension die Farbwerte hervor „stechen“. Die erste Idee, um zu zählen, die wir ausprobiert haben ist die, aus dem Bild nur die richtige Farbe – also den Grünkanal – herauszunehmen und an einer bestimmten Grenze zu unterscheiden, ob diese Stelle zu einer grün leuchtenden Zellmembran gehört oder nicht. Die Zellen wollten wir zählen, indem man danach zu jedem Punkt geht und die zusammen gehörenden Zellen findet, indem man mit dem ersten Nachbarn des Punktes, z.B. dem linkem, wenn er ebenfalls grün ist, weiter zählt und der wieder seinen ersten Nachbarn und so weiter, bis dieser „Arm“ nichts mehr findet und dann zum nächsten Nachbarn, z.B. dem unterem, geht. Das Problem an dieser Methode ist, dass zum Einen es auf dem Bild Farbverläufe gibt, die durch unterschiedlich gut gefärbte Stellen auf dem Muskelquerschnitt entstanden sind, die Wände nicht alle gleich hoch sind und drittens die Methode per Armzählung Bereiche nur teilweise findet. Nach ein paar Überlegungen kamen wir auf die Idee, man könnte die zusammengehörenden Zellen herausfinden, indem man einen Wegfinder-Algorithmus verwendet, da dieser in einigen Fällen alle Wegmöglichkeiten absucht, und längere Wege, beispielsweise um einen Punkt, der gerade noch zur Membran zählt, auch wenn er sie nicht mehr berührt, oder wenn die Zelle oben eingedellt ist, sodass man eine weitere kleine „Wand“ sieht, wo eigentlich „Decke“ ist, auszuschließen. Die Idee unseres Wegfinders ist es, um den Punkt, den man testet, wenn er nicht zur Membran gehört, alle Punkte seiner Art um ihn herum mit der 1 zu markieren. Dann zählt man von 2 bis zu einer bestimmten Zahl, die das Maximal-„Volumen“ der Zelle angibt. In jedem Durchlauf testet man in einem bestimmtem Bereich, alle Zellen, die mit der Zahl des Durchlaufes markiert sind und prüft ihre Nachbarn: sind sie noch nicht markiert und keine Membran? Dann sollen sie mit dem Nachfolger unserer Zahl markiert werden, damit sie bei dem nächsten Versuch überprüft werden.



Die erste Idee, um das Problem mit den verschiedenen großen Membranhöhen zu lösen, die jedoch nicht das Problem der Farbverläufe effizient umgeht, ist es für jeden Bereich die Grenze auf einen bestimmten Anteil $mx+n$ der maximal vorkommenden Höhe in diesem Bereich

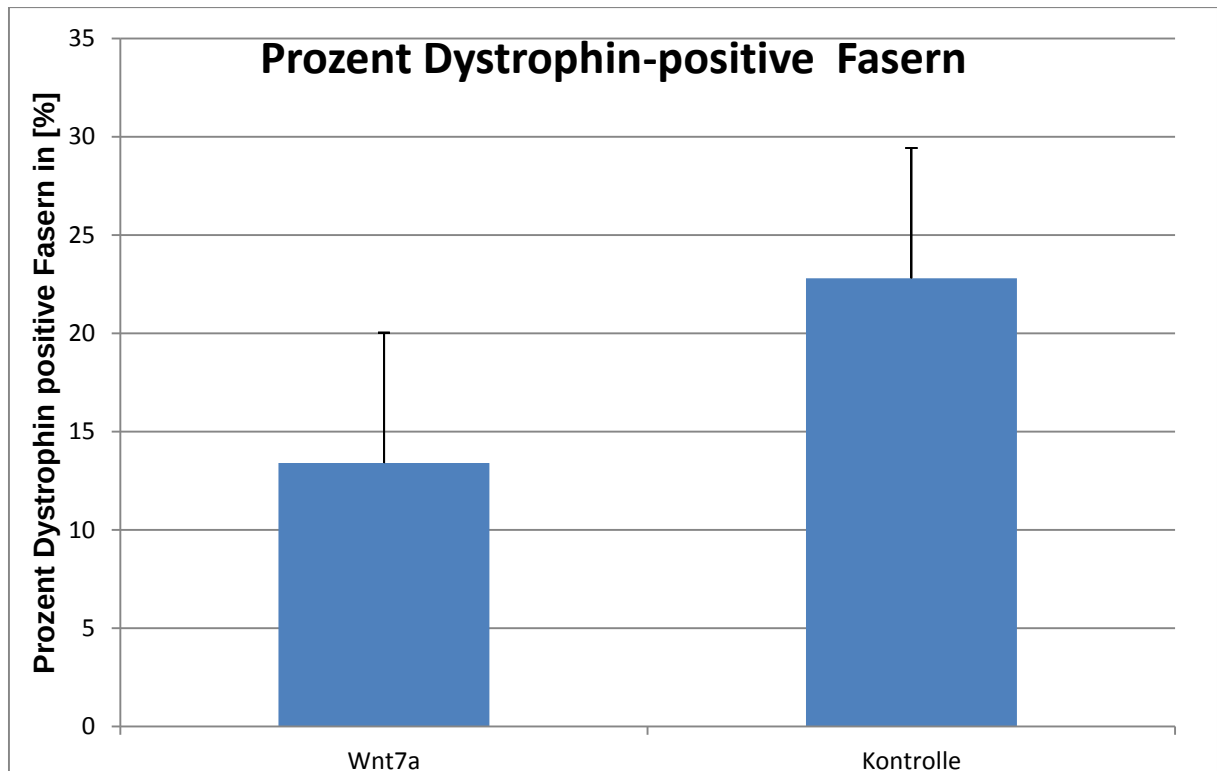
festzulegen, doch wie sich zeigte, löste dies eben nicht das Problem der Farbverläufe. Nach ein paar Tagen Nachdenkzeit sind wir auf die Idee gekommen, man könne die starken Gefälle der Membranen herausbekommen, indem man die erste Ableitung des Bildes bildet: je zu den Abstand zum höchstem Punkt – kleiner als 0 ist in dem Fall 0. Durch ein weiteres Ableiten verschwinden auch die Farbverläufe, da lineare Funktionen in der zweiten Ableitung nur noch 0 sind, größere „Anstiege“ hingegen bestehen bleiben.



Endlich hatte man relativ akzeptable Ergebnisse, doch es bestand ein weiteres Problem: zum einen wollte man noch die Dystrophin-positiven Zellen zählen und zum Anderem gab es teilweise Lücken in den Membranen, da die Zellen an der Stelle sich zum Beispiel gerade teilten, sie abstarben, oder es nicht so gut gefärbt war. In den Dystrophin-positiven Zellbildern gab es außerdem Lücken und ähnliches, was ein korrektes Zählen unmöglich macht. Unser letzter Zellzähler bestand nun auf der Idee, eine Zelle sei das, was keinen Kontakt zum Bildrand hat und einen relativ großen Abstand von Zellmembranen. Diese Methode auszurechnen dauert leider so lange wie menschliches Zählen, jedoch ergibt sie nahezu perfekte Ergebnisse, also solche, die kein Mensch besser beurteilen kann, als die Maschine. Das Bild wird immer noch zweifach abgeleitet, dann die Entfernung jedes Zellpunktes zu seinen Nachbarmembranen bestimmt, der Schnitt zu Membran oder Zelle in einer bestimmten Schicht platziert und es werden nach dem Wegfindersystem die einzelnen Zellen gekennzeichnet und durchgezählt. Das Problem die Dystrophin-positiven Zellen zu zählen konnten wir noch nicht lösen.

5.4 Auswertung der erhaltenen Daten (Versuchsauswertung)

<u>Kennung</u>	<u>Behandlung</u>	<u>Dystrophin</u>	<u>Laminin</u>	<u>Prozent positive Fasern</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>T-test</u>	<u>Standardab- weichung</u>
8407C1	Kontrolle	280	1814	15,4356			
8408C1	Kontrolle	607	2342	25,918	22,770		8,1485
8409C1	Kontrolle	860	3190	26,959			
8410Wnt Out	Wnt7a	355	1732	20,497			
8411Wnt Out	Wnt7a	336	2070	16,232	13,448		8,7775
8412Wnt Out	Wnt7a	83	2295	3,617		0,10871	



Um die Daten, die wir durch das Zählen erhalten haben, auszuwerten, ist es wichtig zu erklären, was in der Tabelle zu sehen ist. In der Spalte Behandlung erkennt man, welche der Proben mit Wnt7a behandelt wurden und welche nicht. Die Wirkungsweise von Wnt7a wird später erläutert, da wir hier in erster Linie die Tabelle und das Diagramm betrachten. Die Spalten Anzahl Dystrophin-positiver Fasern und die Anzahl der Laminin-positiven Fasern geben die Anzahl an, die wir gezählt haben. Die Gleichung für die Spalte lautet $100 / \text{Anzahl positiver Lamininfasern} \times \text{Anzahl positiver Dystrophinfasern}$. Der Mittelwert wird dann entsprechend aus den 3 Proben der jeweiligen Gruppe gebildet. Die Originalwerte benutzt man dann für den sogenannten T-Test. Dieser Test bestimmt, ob die Werte statistisch signifikant sind und nicht dadurch zustande gekommen sind, weil die Werte zufällig unterschiedlich sind. Das bedeutet, dass die Anzahl der gezählten Zellen in der Kontrollgruppe immer größer war als die Anzahl der mit Wnt7a behandelten Gruppe. Bei der Standardabweichung wurde geprüft, wie stark die einzelnen Werte vom Mittelwert abweichen. Bei einer zu hohen Standardabweichung deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Proben nicht richtig funktioniert haben und sie fehlerhaft sind. Die Standardabweichung ist gleichzusetzen mit den Fehlerbalken, die in dem Diagramm zu sehen sind. Durch den T-Test wie auch durch die Standardabweichung hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse keineswegs zufällig waren. Dieses Experiment würde nun theoretisch aussagen, dass die Behandlung der Mäuse mit dem Protein Wnt7a einen negativen Effekt auf das Wachstum der Zellen hätte. Wie jedoch viele andere Experimente gezeigt haben, wirkt Wnt7a eher positiv auf das Zellwachstum und die Migration der Zelle. Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass bei unserem Experiment ein Faktor vorhanden war, der es scheitern ließ.

Im weiteren Verlauf des Textes werden wir nun verschiedene Ansatzpunkte für das Fehlschlagen des Experiments erläutern.

5.5 Diskussion der gewonnenen Ergebnisse

Das Experiment hat ein anderes Ergebnis hervorgebracht als wir erwartet haben. Unsere Erwartung war, dass die Mäuse, welche mit dem Wnt7a behandelt wurden, eine deutlich höhere Anzahl an Dystrophin positiven Fasern besitzen als die Kontrollgruppe. Die Ergebnisse unseres Experiments waren jedoch das genaue Gegenteil. Nach unseren Ergebnissen hatte die Kontrollgruppe ein sehr viel besseres Zellwachstum als die Gruppe, die mit dem Wnt7a behandelt wurde. Bei dem Experiment gibt es verschiedene Fehlerquellen. Zu allererst könnte etwas mit dem Wnt7a nicht gestimmt haben. Dieses wird von einer externen Firma bezogen und in einer fertigen Lösung geliefert. Die Mäuse werden dann mit dieser Lösung behandelt. Es könnten Lösungsmittel oder andere Verunreinigungen in der Wnt7a-Lösung enthalten sein, die zu einer Verringerung der Migration der Zellen oder zu einer verringerten Zellteilung führen können. Wie bereits im vorangegangenen Text erwähnt, ist bisher noch nicht vollständig geklärt, wie der Signalweg von Wnt7a abläuft. Was man jedoch weiß ist, dass Wnt7a eine Verstärkung der Wachstumsrate der Muskelzellen sowie der Stammzellen bedingt. Dabei dockt Wnt7a an der Zelle an und löst eine Signalkaskade aus, die die Zelle dazu veranlasst, sich vermehrt zu teilen und zu migrieren. Dies führt dazu, dass sich die Anzahl Dystrophin positiver Fasern erhöht, da sich die gesunden (Dystrophin exprimierenden) Stammzellen teilen und mit den kranken (Dystrophin negativen) Fasern fusionieren. Wnt7a ist ein Protein, welches zur Gruppe der Wnt Gene gehört. Ein Wnt Signalweg funktioniert im Allgemeinen, indem das Wnt Protein an die Zellmembran andockt und an einen spezifischen Rezeptor bindet. Dies führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, die zusammen mit Transkriptionsfaktoren die Transkription ganz bestimmter Abschnitte der DNA, die ein spezielles Protein codiert, fördert. Nach der Transkription erfolgt die Translation, an deren Ende das Protein in der Zelle seine Aufgaben übernimmt. Bei dem Protein Wnt7a verläuft der Signalweg folgendermaßen: Wnt7a bindet an die Zellmembran und an den Rezeptor Frizzled7. Dieser Rezeptor aktiviert wiederum das Protein Dishevelled (Dvl2), welches ein weiteres Protein aktiviert, nämlich Rac1. Diese Proteine führen zu einer erhöhten Migration der Zelle zusammen mit einer Veränderung des Zytoskeletts. Das Zytoskelett der Zelle besteht aus verschiedenen Proteinen und sorgt neben der Stabilität der Zelle auch für einen Signalaustausch sowie die Bewegung der Zelle. Dabei ist noch zu erwähnen, dass der Signalweg von Wnt7a ein nicht kanonischer Wnt-Signalweg ist, da hierbei keine Aktivierung des Proteins β -Catenin festzustellen ist. Eine weitere Fehlerquelle bei unserer experimentellen Durchführung ist das Zählen an sich. Wir haben mit zwei unterschiedlichen Methoden gezählt. Zum einen haben wir ein Programm namens ImageJ

verwendet und zum anderen haben wir selbst ein Zählprogramm geschrieben. Bei beiden Methoden mussten wir einen Schwellenwert festlegen, um zwischen einer positiv gefärbten Zelle und der sogenannten Hintergrundstrahlung zu unterscheiden. Die Hintergrundstrahlung kommt dadurch zustande, dass der zweite Antikörper mit dem wir inkubiert haben auch ein wenig unspezifisch bindet. Dadurch emittieren bei bestimmten Lichtverhältnissen auch die Teile der Probe, an die der zweite Antikörper unspezifisch gebunden hat. Dabei ist es möglich, dass wir den Schwellenwert zu hoch oder zu niedrig angesetzt haben und deswegen ungenaue Zählergebnisse die Folge waren. Da wir die Proben mit zwei verschiedenen Antikörper behandelt haben, um die Zellteile zu färben, die wir benötigen, sind die Antikörper selbst natürlich ebenfalls eine Fehlerquelle. Bei diesem Experiment ist ebenfalls zu beachten, dass wir die fertigen Bilder der Proben von unserer Außenbetreuerin bekamen, deswegen ist es möglich, dass es zu einer Verwechslung innerhalb der Gruppen der Mäuse gekommen ist, dies ist jedoch eher unwahrscheinlich und wird hier nur erwähnt, um alle möglichen Fehlerquellen aufzuzeigen. Des Weiteren ist es möglich, dass bei der Beschriftung der Proben ein Fehler passiert sein könnte. Zusammenfassend ist zu sagen, dass dieses Experiment uns nicht die erwarteten Ergebnisse hervorbrachte, wir jedoch neue Kenntnisse gewonnen haben und durch dieses Experiment haben wir „hautnah“ miterlebt, wie in der Forschung gearbeitet wird. Die Proteine, die zurzeit erforscht werden, wie zum Beispiel das Wnt7a könnten wertvolle Hinweise liefern, wie man die Zellen auf molekularer Ebene beeinflussen kann, um der Krankheit Muskeldystrophie dadurch entgegenzuwirken. Mit Hilfe solcher Proteine könnte in Kombination mit den Stammzellen eine wirksame Behandlung entwickelt werden.

6 Gesellschaftliche Grundlagen der Stammzellenforschung

Die gesellschaftlichen Grundlagen der Stammzellenforschung lassen sich in verschiedene Teilbereiche untergliedern. Die rechtlichen Grundlagen beziehen sich auf die derzeitigen Gesetze und Regelungen und betreffen die Internationale Ebene, aber auch insbesondere Deutschland. Die ethischen Vorstellungen dagegen beziehen sich auf gesellschaftlich anerkannte Regelungen.

6.1 Rechtliche Grundlagen

Die rechtlichen Grundlagen für die Stammzellenforschung und die Nutzung embryonaler Zellen sind eng mit den ethischen Überlegungen verbunden. So spielen einige Grundgesetze wie die Menschenwürde (Art. 1 Abs.1 GG) oder auch im besonderem Maße das Recht auf Leben und körperliche Unversehrtheit (Art.2 Abs.2 GG) eine große Rolle. Ein Grundgesetz, worauf vor allem die Forscher großen Wert legen, ist die Freiheit der Forschung (Art.5 Abs.3 GG). Deshalb gibt es auf verschiedenen Ebenen auch unterschiedliche Gesetze und sie unterscheiden sich auch länderspezifisch teilweise sehr stark voneinander. Als erstes betrachten wir die Gesetze in Deutschland näher. In Deutschland gibt es zum einen das Embryonenschutzgesetz (ESchG) und zum anderen das Stammzellgesetz (StZG). Das Embryonenschutzgesetz sagt aus, dass Embryonen nur erzeugt werden dürfen, um eine Schwangerschaft herbeizuführen. In diesem Gesetz, welches 13 Paragraphen umfasst, wird die Embryonenforschung wie auch die in vitro Fertilisation geregelt. Es untersagt, einen Embryo zu erzeugen, wenn nicht mit dem Zweck seiner Erhaltung. Des Weiteren untersagt es einen Embryo mit der gleichen Erbinformation wie der eines anderen Menschen zu erzeugen, also einen Klon zu erschaffen. Das Embryonenschutzgesetz untersagt also zusammengefasst die Erzeugung von Chimären, von Klonen und Embryonen zur Gewinnung totipotenter Stammzellen. Dadurch ist Forschung an humanen embryonalen Stammzellen nur möglich, wenn diese von außerhalb Deutschlands eingeführt werden. Um diese Einfuhr zu kontrollieren, gibt es verschiedene Kontrollinstanzen und das Stammzellgesetz. Das Stammzellgesetz regelt die Einfuhr und den Umgang mit totipotenten humanen embryonalen Stammzellen. Dies besagt erstens, dass man eine behördliche Genehmigung für das Einführen und Verwenden humaner embryonaler Stammzellen benötigt. Dabei wurde festgelegt, dass nur embryonale Stammzellen verwendet werden dürfen, die vor einem Stichtag erzeugt wurden. Der erste Stichtag war der 01.01.2002, jedoch wurde dieser Stichtag auf den 21.05.2007 verschoben, da man argumentierte, dass die

alten embryonalen Stammzell-Linien durch verschiedene Faktoren zu verfälschten Forschungsergebnisse führen würden. Des Weiteren müssen die embryonalen Stammzellen aus überschüssigen Embryonen stammen und es müssen vorher alle anderen Möglichkeiten ausgeschöpft worden sein, mit anderen Versuchen dieses Forschungsziel zu erreichen. Für das Durchsetzen und Bestimmen der vorliegenden Tatsachen und der anwendbaren Gesetze ist das Robert-Koch Institut seit einer Verordnung vom 18. Juli 2002 verantwortlich. Dieses holt sich bei einer Anfrage eine Stellungnahme der Zentralen Ethikkommission für Stammzellforschung. Es folgt die Überprüfung der Anfrage auf ihre ethische Vertretbarkeit. International auf der Ebene der Vereinten Nationen gibt es keine konkreten Gesetze dazu. Die Ethikkommissionen sollen in jedem Land selbst entscheiden. Auf europäischer Ebene wurde am 14.11.2000 beschlossen, dass es jedem Land selbst überlassen sein sollte, jedoch die Würde des Menschen nicht verletzt werden darf und die Stammzellen nur aus überschüssigen Embryonen stammen dürfen. Der Europäische Gerichtshof hat am 18. Oktober 2011 entschieden, dass alle Verfahren, die auf humanen embryonalen Stammzellen beruhen, nicht patentierbar sind, was die wirtschaftliche Nutzung ausschließt. Es gibt also auf internationaler Ebene viele verschiedene Meinungen, während andere Verfahren, die die Stammzellen und Embryonen betreffen, einheitlich anerkannt sind. So ist zum Beispiel das reproduktive Klonen von Menschen weltweit geächtet und wird in allen Ländern strafrechtlich verfolgt. Das therapeutische Klonen dagegen ist bisher international noch nicht klar geregelt, da es in Ländern wie zum Beispiel England rechtlich erlaubt ist. Die Regelungen zum Umgang mit Stammzellen und Embryonen sind also besonders in Deutschland sehr streng und werden kontinuierlich kontrolliert.

6.2 Ethische Grundlagen

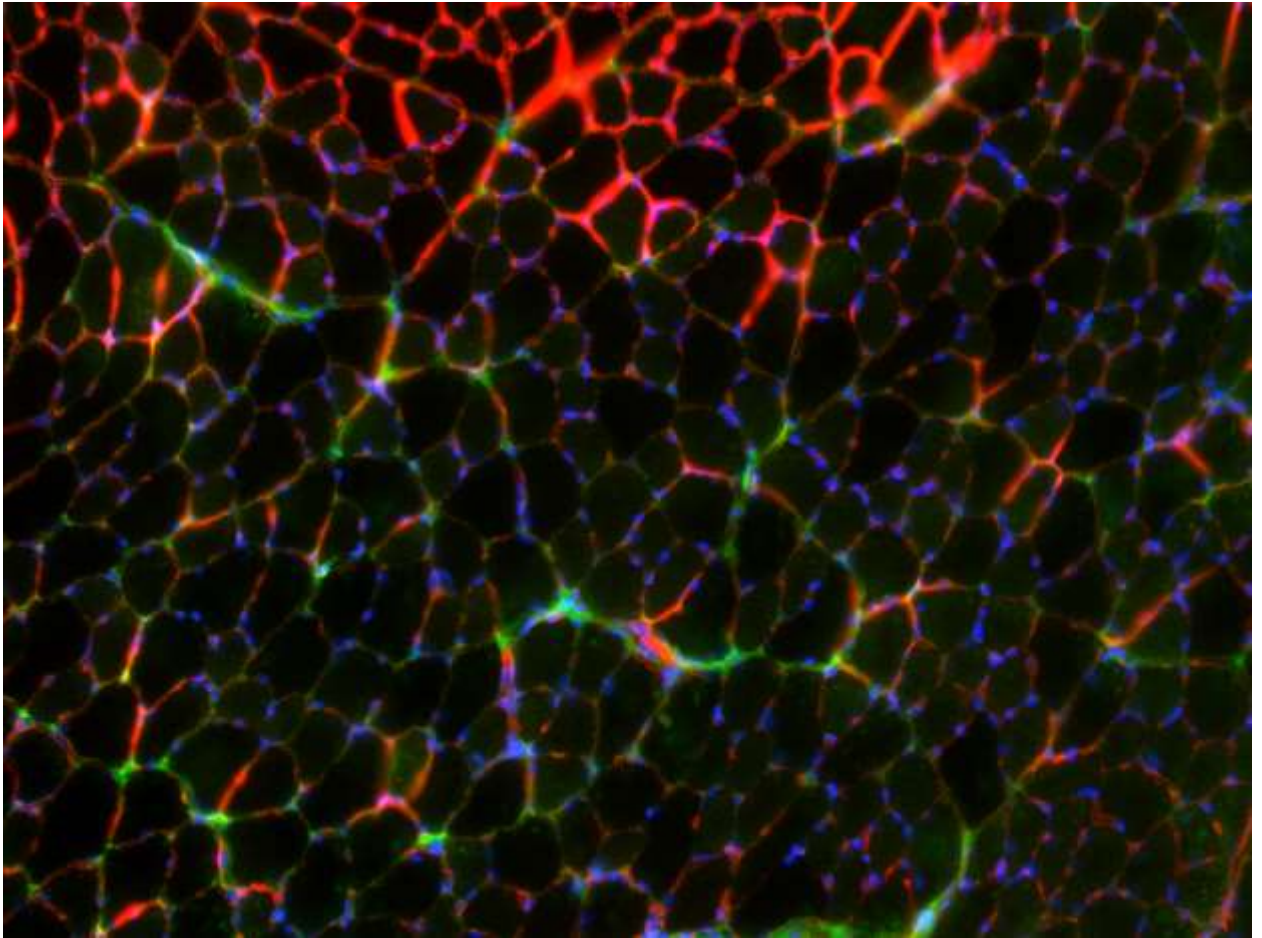
Die ethischen Grundlagen sind im Vergleich zu den gesetzlichen Grundlagen noch deutlich komplexer und schwieriger darzulegen. Die verschiedenen Ansichten und Meinungen, die international über dieses Thema existieren, würden den Rahmen der Seminarfacharbeit sprengen. Aus diesem Grund werden wir uns auf einige vorherrschende Meinungen beschränken. Um zu klären, ob die Stammzellforschung ethisch vertretbar ist, muss man einige grundsätzliche Fragen klären wie zum Beispiel, ab wann ist ein Embryo lebendig? Darf man, um Leiden zu verhindern oder zu verringern Leben töten? Noch viele weitere solcher Fragen sind zu beantworten. Es gibt viele verschiedene Ansätze die versuchen den Sachverhalt darzulegen. So gibt es die Ansicht, dass sobald eine Eizelle befruchtet ist, es den gleichen Stellenwert besitzt, wie ein ausgewachsener Mensch. Eine andere Meinung richtet sich nach einer Zeitgrenze. So gilt in verschiedenen Religionen wie zum Beispiel dem Judentum, der Embryo erst nach dem 40. Tag nach der Befruchtung als Mensch. Sowohl die Religionen wie

auch viele Forscher sind sich nicht einig, ab wann der Embryo den gleichen „Stellenwert“ wie ein Mensch besitzt. Die Frage, ob man diese Embryos für Forschungszwecke verwenden darf, wird sehr viel diskutiert. Verschiedene Länder haben deswegen auch verschiedene Regelungen für die Stammzellforschung. Die Frage, die sehr oft gestellt wird, ist, ob diese Art der Forschung denn unumgänglich und nötig ist. Die Antwort der Forscher lautet ganz klar ja, da ihrer Meinung nach alle Alternativen ausgeschöpft sind, und es nur diese Möglichkeit gibt, um neue Erkenntnisse zu gewinnen, um später Menschen, die zurzeit an einer solchen Krankheit leiden, helfen zu können. Die Frage, auf die auch die Forscher keine Antwort kennen ist, was könnte dies für Folgen haben. Einerseits könnte die Forschung zur Heilung vieler verschiedener Krankheiten beitragen, doch könnte ebenso langsam die Hemmschwelle abgebaut werden, die uns davor schützt, immer gefährlichere und riskantere Experimente zu wagen. Ist es möglich, dass wenn wir der Forschung zu viel Freiraum gewähren, sie irgendwann keine Hemmnisse mehr hat und vielleicht sogar bereit ist, Menschen zu klonen, um ihnen zu helfen? Diese Fragen beschäftigen die Menschen, die mit diesem Gebiet in Verbindung stehen. Beantworten kann sie nur die Zukunft.

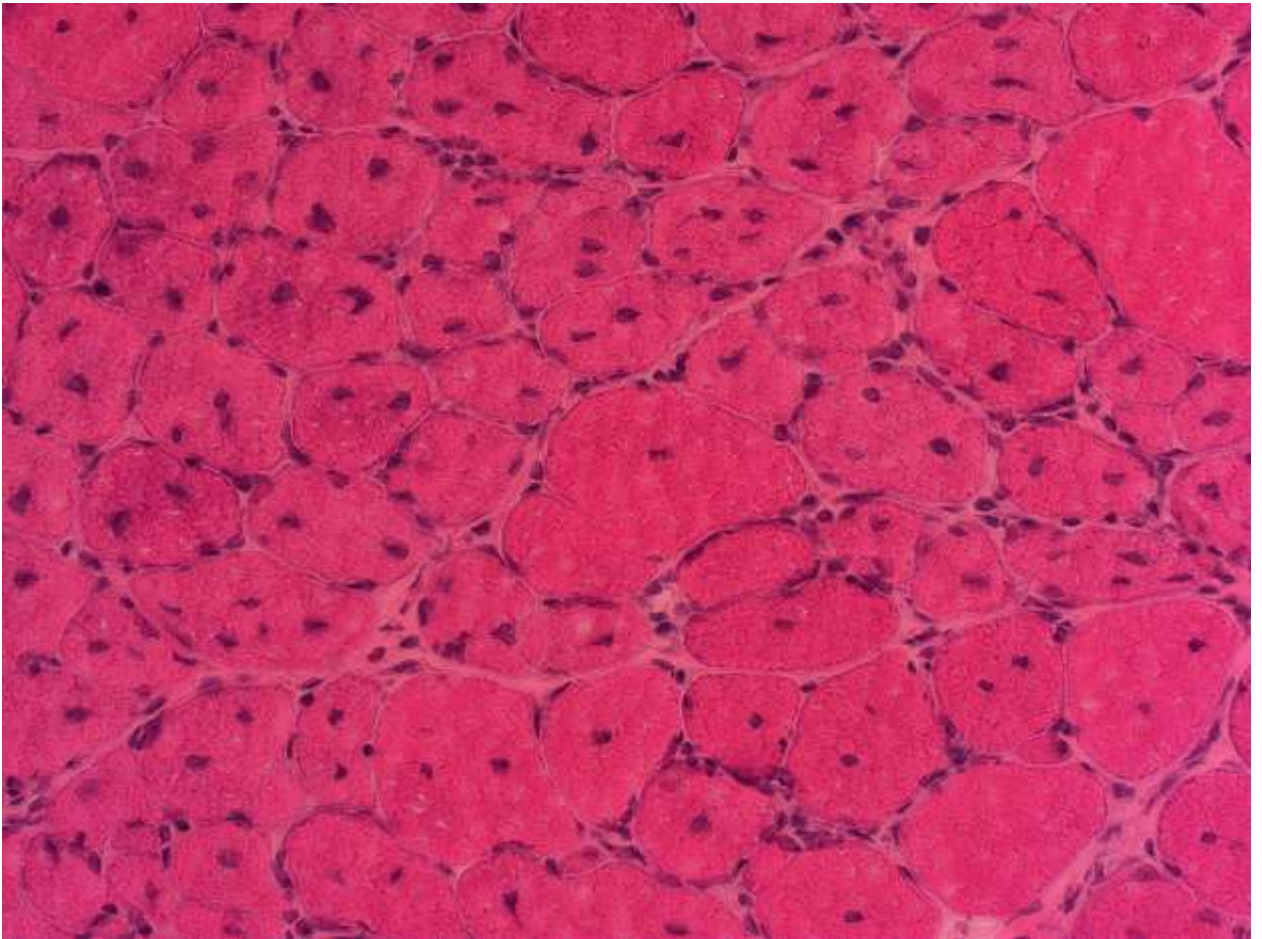
7 Nutzen und Zukunftsaussichten für Menschen und Patienten

Das Ziel unserer Arbeit war es in erster Linie zu zeigen, dass Krankheiten wie Muskeldystrophie durch die aus der Stammzellenforschung folgenden Möglichkeiten in Zukunft behandelbar sein können. Unsere Arbeit zeigt deutlich, dass eine Behandlung möglich ist, wenn diese Möglichkeiten weiter erforscht werden. Während Muskeldystrophie derzeit nicht im Ursprung behandelbar ist und somit nur die Symptome abgeschwächt werden, könnte die Krankheit in näherer Zukunft vollständig behandelbar sein und so das Leben vieler Patienten erleichtert oder sogar gerettet werden. Ein Mittel zur Behandlung der Muskeldystrophie könnte Wnt7a sein. Dieses Protein führt zu einem erhöhten Muskelaufbau, durch die Stimulierung der Satellitenstammzellen. Dadurch sind diese Stammzellen angeregt, sich in neue Muskelzellen zu differenzieren und folglich findet eine Stärkung der Muskulatur statt. Da der häufigste Grund für den Tod eines an Muskeldystrophie erkrankten Patienten der Ausfall der für das Leben wichtigen Muskulatur ist, stellt Wnt7a hier eine gute Möglichkeit zur Behandlung dar. Somit wird dem Patienten nicht nur das Leben weiterhin ermöglicht, er/sie ist auch nicht mehr auf Hilfe angewiesen, die durch die schlechte Beweglichkeit aufgrund der schwachen Muskulatur nötig gewesen wäre. Zusätzlich kann dieses Protein auch zur Behandlung einzelner Muskelgruppen eingesetzt werden, um so Probleme bei der Atmung oder Herzproblemen vorzubeugen. Da aus ethischen Gründen diese Experimente nicht an Menschen durchgeführt werden können, ist es folglich nicht genau absehbar, wie die Behandlung des Menschen aussehen könnte. Die bisherigen Ergebnisse in diesem Gebiet zeigen aber klar eine positive Wirkung des Wnt7a. Aufgrund der ständigen Weiterentwicklung auf diesem Forschungsgebiet könnte die Muskeldystrophie bald heilbar sein.

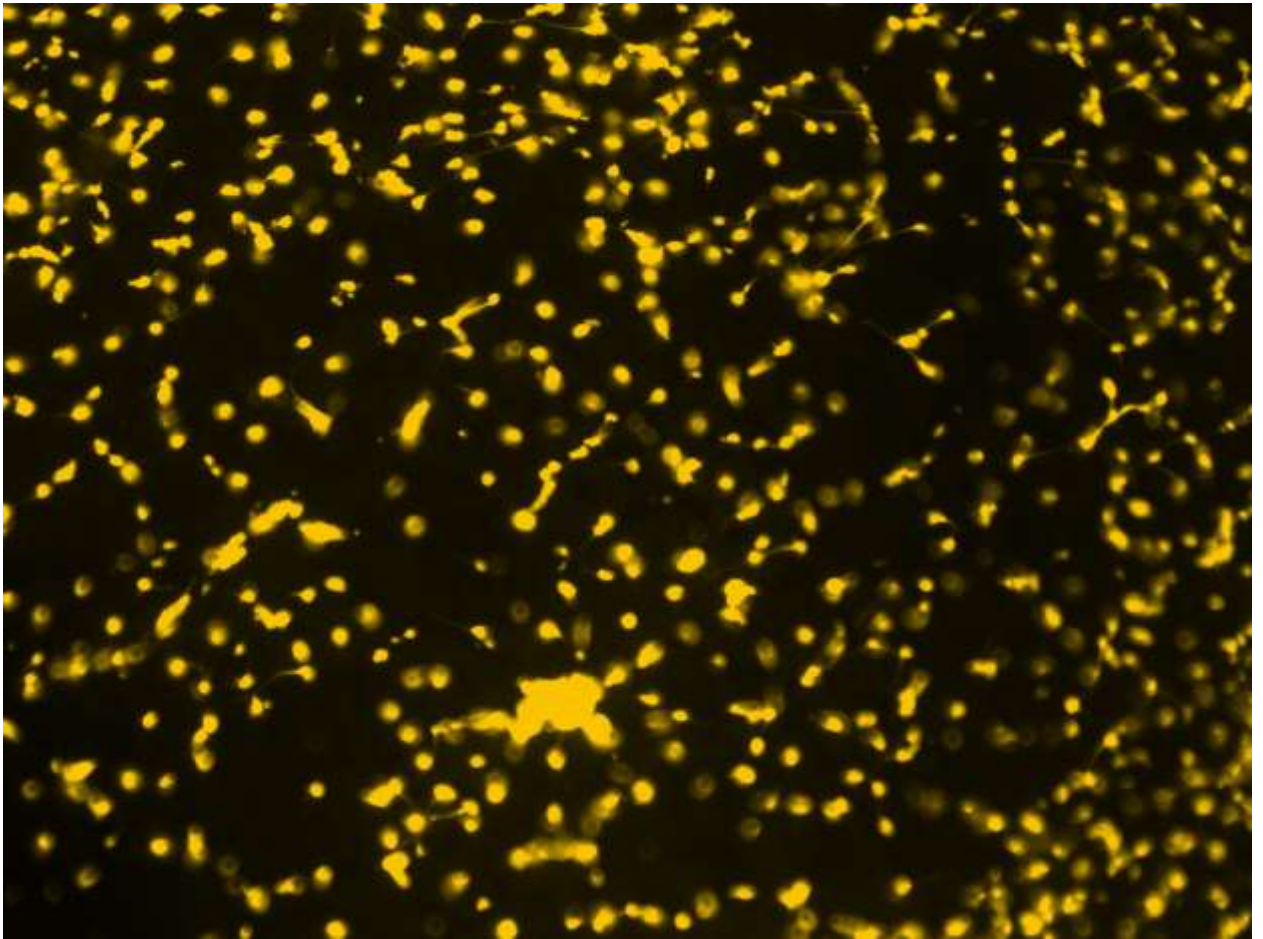
Anhang



Mikroskopische Aufnahme Rot = Laminin, Blau = Zellkerne, Grün = Dystrophin



Querschnitt eines Mausmuskels dunkelblau = Zellkerne, rosa = Bindegewebe mit HE-Färbung



gefärbte DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop



Die Versuchstiere



Vorbereitung der Maus



Freigelegter Oberschenkelmuskel mit deutlicher Verfärbung



Geöffnete Maus mit Verfärbung des Gewebes infolge der Behandlung



Muskeln aus denen Querschnitte angefertigt werden



Schneiden der Proben auf Mikrometer genau



Lagerung der Schnitte bei -80°C



Behandlung der Schnitte mit Antikörpern



Waschen der Schnitte



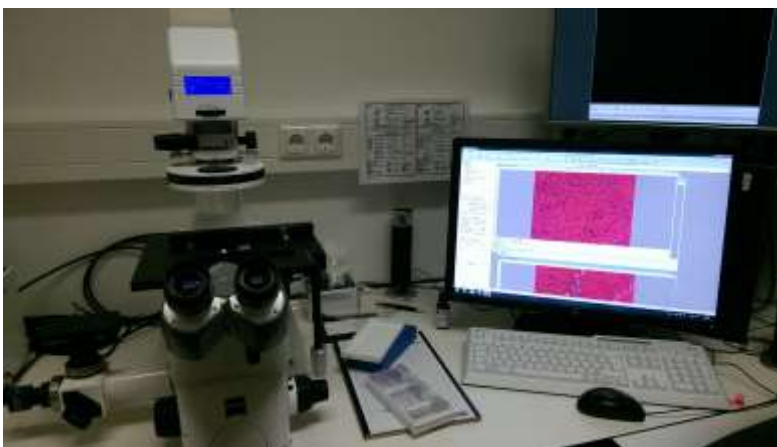
Lagerung der behandelten Schnitte während die Antikörper wirken



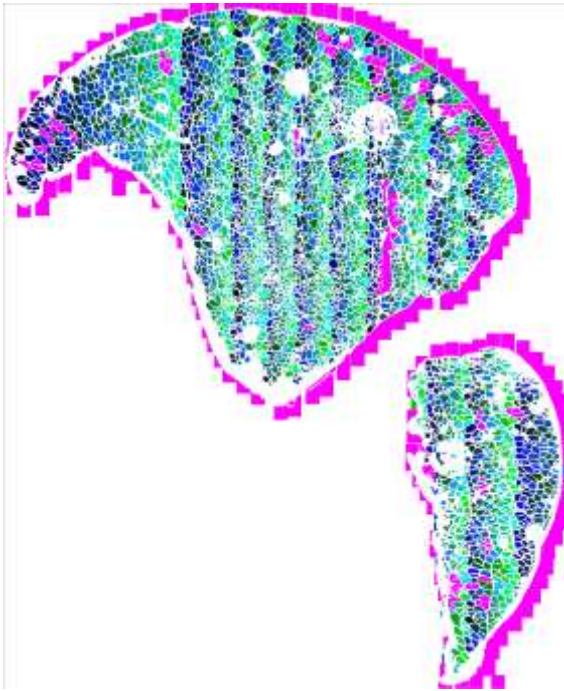
Färbung der Schnitte



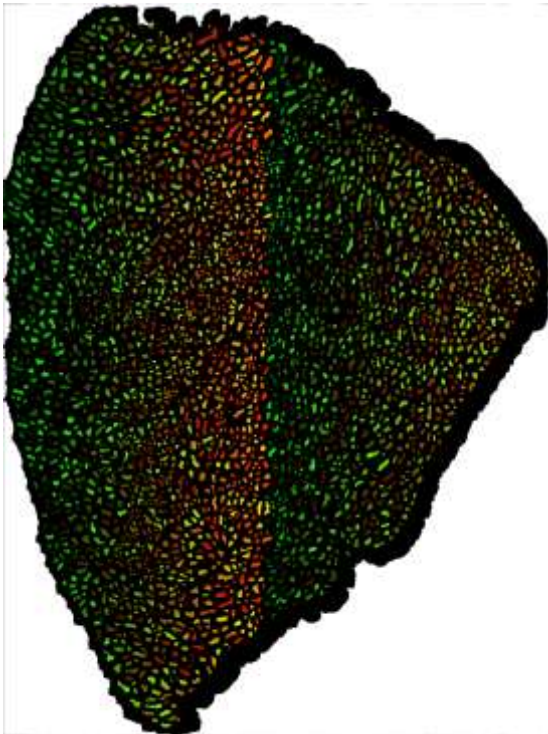
Fixierung der Schnitte



Auswertung der gefärbten Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop



Die Entdeckung der Farbverläufe bei der Erstellung unseres Programms



Durch eigenes Programm gezählte Probe

9 Quellenverzeichnis

Literaturquellen

Prof.Dr. Michael Hühl, Dr. Susanne Kühl „Stammzellbiologie“ Band 1 Eugen Ulmer KG 2012

Volker Wulf „Analysen zur Expression und Funktion von Connexinen während der Skelettmuskelentwicklung und in adulten Skelettmuskelfasern der Maus“ Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2010

Julia Freiin von Maltzahn „Erzeugung und Untersuchung neuer transgener Mausmutanten zur Expression und Funktion der Connexine während der Myogenese“ Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2008

Stem cells and muscle diseases: advances in cell therapy strategies. von Negroni E, Gidaro T, Bigot A, Butler-Browne GS, Mouly V, Trollet C*

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UM76, INSERM U974, Institut de Myologie, CNRS FRE3617, 47 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

GENE AND CELL-MEDIATED THERAPIES FOR MUSCULAR DYSTROPHY von Patryk Konieczny, PhD1,2,* , Kristy Swiderski, PhD1,3,* , and Jeffrey S. Chamberlain, PhD1
1Department of Neurology, The University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA, published May 2013

Florian Bentzinger, Julia von Maltzahn and Michael A Rudnicki „Extrinsic regulation of satellite cell specification“ 2010

Florian Bentzinger, Julia von Maltzahn, Nicolas A. Dumont, Danny A. Stark, Yu Xin Wang, Kevin Nhan, Jérôme Frenette, DDW Cornelison, and Michael A. Rudnicki „Wnt7a stimulates myogenic stem cell motility and engraftment resulting in improved muscle strength“ Published April 7, 2014

Julia von Maltzahn, Jean-Marc Renaud, Gianni Parisse, and Michael A. Rudnicki „Wnt7a treatment ameliorates muscular dystrophy“ published 11. Dezember 2012

Internetquellen

Abrufdatum	URL der Internetquelle
26.01.15	http://www.stammzellen.nrw.de/ueber-stammzellen.html
26.01.15	http://www.nationalgeographic.de/aktuelles/muskelstammzellen-alsjungbrunnen
30.01.15	http://www.focus.de/gesundheit/ratgeber/zukunftsmedizin/news/stammzellen-lebenslange-kraft-fuer-die-muskeln_aid_570662.html
28.01.15	http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/stammzellen/63289
27.01.15	http://www.spektrum.de/thema/klone-und-stammzellforschung/611231
29.01.15, 06.02.15 15.02.15, 17.02.15, 12.03.15	http://www.muskel-dystrophie.de/duchenne/
30.01.15	http://flexikon.doccheck.com/de/Stammzelle + Verlinkte Seiten erster Ordnung auf der Domain 15°°
30.01.15	http://flexikon.doccheck.com/de/Hämatopoese
30.01.15	http://de.wikipedia.org/wiki/Keimblatt
30.01.15	http://de.wikipedia.org/wiki/Bilateria
01.02.15	http://www.drze.de/im-blickpunkt/stammzellen/module/abbildung-3
01.02.15	http://www.spektrum.de/news/stammzelltherapie-im-langzeittesterfolgreich/1313212
01.02.15	http://www.wissensschau.de/stammzellen/fetale_stammzellen.php
01.02.15	http://www.wissensschau.de/stammzellen/fetale_zellen_medizin.php auch um 15°°
01.02.15	http://www.dzd-ev.de/forschung/biologie-derbetazelle/stammzellen/stammzelltypen/
01.02.15	http://www.reha-klinik.de/informationsforum/muskeldystrophie-vom-typduchenne.html
02.02.15	http://www.spektrum.de/news/humane-stammzellen-aus-

	kloniertenembryonen/1194616
03.02.15	http://mda.org/disease/duchenne-musculardystrophy/research#stem_cells
04.02.15	http://edocs.fuberlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_00000005111/Diss_110209_final_eVersion.pdf
05.02.15	http://www.welt.de/politik/article1670177/Wie-StammzellenforschungLeben-rettet.html
05.02.15	http://www.nabelschnurblut-info.de/stammzellen/
07.02.15, 13.03.15	http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/duchennemuskeldystrophie/3059
08.02.15, 17.02.15, 12.03.15	https://www.dgm.org/muskelerkrankungen/muskeldystrophieduchenne-becker
08.02.15	http://de.wikipedia.org/wiki/Multiple_Sklerose
08.02.15	http://www.planetwissen.de/natur_technik/forschungszweige/Stammzellen/index.jsp
10.02.15	http://www.dict.cc/deutschenglisch/murin+%5Bdie+Maus+bzw+Ratte+betreffend%5D.html
10.02.15	http://www.vetmed.unimuenchen.de/downloads/promotion/ws_97_98/kraemer_r.txt
28.02.15	http://www.scinexx.de/wissen-aktuell-18273-2014-11-21.html
13.03.15	http://mda.org/disease/duchenne-muscular-dystrophy/overview
23.06.15	http://www.rki.de/DE/Content/Gesund/Stammzellen/Materialien/Gesetze/gesetze-inhalt.html
23.06.15	http://www.gesetze-im-internet.de/stzg/index.html
23.06.15	http://www.gesetze-im-internet.de/eschg/index.html
23.06.15	http://www.drze.de/im-blickpunkt/stammzellen/gesetze-und-regelungen
23.06.15	http://www.eurostemcell.org/de/factsheet/embryonalestammzellforschung-ein-ethisches-dilemma

10 Glossar

Dedifferenzierung: eine spezialisierte Zelle zurück in eine undifferenzierte Zelle durch verschiedene Faktoren zurückverwandeln

multipotent: Fähigkeit einer Zelle Zelltypen eines Organs zu bilden

Neuromuskulär: bedeutet in diesem Zusammenhang, die Muskeln und die Nerven betreffend

Nukleustransfer: bezeichnet einen Vorgang, bei dem der Nukleus des Spenders in eine entkernte Zygote eingebracht wird, die sich dann mit den eingebrachten Erbinformationen beginnt zu entwickeln

omnipotent/totipotent: Fähigkeit einer Zelle alle Zellen eines Organismus bilden kann inklusive Keimzellen

oligopotent: Fähigkeit einer Zelle Zelltypen eines Gewebes zu bilden

pluripotent: Fähigkeit einer Zelle alle Derivate der 3 Keimblätter zu bilden

unipotent: Fähigkeit einer Zelle einen Zelltyp zu bilden

Zytoskelett: eine die Zelle umgebendes „Skelett“ aus verschiedenen Proteinstrukturen

Eidestattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich bei der Erstellung der Seminarfacharbeit keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen habe und keine anderen als der angegebenen Hilfsmittel genutzt habe.

Jena, den