

Dominik Lermen

Vom Fachbereich VI
Geographie/Geowissenschaften
der Universität Trier
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

**Isolation, Charakterisierung, Differenzierung und Kryokonservierung adulter
Stammzellen aus der Haut am Modell
*Sus scrofa domestica***

Naturwissenschaftliche und juristische Implikationen
zum Betrieb einer Genbank als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität

Betreuender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. mult. Paul Müller
Berichterstattende: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. mult. Paul Müller
Univ.-Prof. Dr. jur. Reinhard Hendler

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 29.01.2010

Trier, 2010

Dominik Lermen

Vom Fachbereich VI
Geographie/Geowissenschaften
der Universität Trier
zur Verleihung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

**Isolation, Charakterisierung, Differenzierung und Kryokonservierung adulter
Stammzellen aus der Haut am Modell
*Sus scrofa domestica***

Naturwissenschaftliche und juristische Implikationen
zum Betrieb einer Genbank als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität

Betreuender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. mult. Paul Müller
Berichterstattende: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. mult. Paul Müller
Univ.-Prof. Dr. jur. Reinhard Hendler

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 29.01.2010

Trier, 2010

Dank

Mein Dank gilt allen, die mich während dieser Arbeit mit Rat, Hilfe und Wohlwollen unterstützt haben. Ganz besonders danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. mult. Paul Müller für die Anregung zu diesem interessanten Thema und die kontinuierliche Begleitung und Förderung der Arbeit durch Ratschläge und Diskussionen.

Ebenso danke ich besonders Herrn Univ.-Prof. Dr. jur. Reinhard Hendler, der mit verständnisvollen und fördernden Ratschlägen die Ausarbeitung der juristischen Fragestellungen begleitet hat.

Ferner danke ich sehr Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Brunhilde Blömeke, die durch die großzügige Bereitstellung von Laborgeräten des Institutes für Umwelttoxikologie und Toxikologie der Universität Trier die Umsetzung dieser Arbeit förderte.

Für die andauernde Bereitschaft zur Diskussion und die inspirierenden Ratschläge bedanke ich mich besonders bei Frau Dr. rer. nat. Michaela Kalmes.

Mein großer Dank gilt auch Prof. Dr. rer. nat. Günter Fuhr vom Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik, der es mir ermöglichte, wichtige Versuche in den Laboren des Fraunhofer IBMT umzusetzen. Zudem danke ich Herrn Dr. rer. nat. Erwin Gojup und Herrn Dr. rer. med. Thomas Fixemer für ihre Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Dirk Moser und Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Breuer danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und die fördernden kritischen Diskussionen.

Nicht zuletzt danke ich Elmars Metzgerei GmbH & Co.KG (54306 Kordel) für die großzügige Bereitstellung der Schweinehautbioplate.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern Bärbel und Karl-Heinz Lermen, an meine Tante Prof. Dr. phil. Birgit Lermen und an meine Freunde, deren permanente Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beitrug.

I Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Kapitel I: Juristische Implikationen

CBD und CITES als Instrumente des Zugangs zu und des Handels mit Proben gefährdeter Tierarten

1. Problemaufriss 10

2. Einführung 12

 Strategien zur Erhaltung der biologischen Diversität 12

 2.1. *In situ*-Strategie zur Erhaltung biologischer Ressourcen 12

 2.1. *Ex situ*-Strategien zur Erhaltung biologischer Ressourcen 13

3. Internationale Rechtslage 19

 3.1 Das Übereinkommen über die biologische Vielfalt (Convention on Biological Diversity, CBD) 20

 3.1.1 Ziele der Konvention 22

 3.1.2 Geltungsbereich der Konvention 22

 3.1.3 Definition der Begriffe "biologische Vielfalt", "biologisches Material", "biologische Ressourcen" und "genetische Ressourcen" nach CBD 23

 3.1.4 Die Strategien zur Erhaltung der biologischen Diversität im Kontext des CBD 25

 3.1.4.1 *In situ*-Erhaltung und CBD 25

 3.1.4.2 Die *in situ*-Erhaltung nach Art. 8 CBD 26

 3.1.4.3 Die *ex situ*-Erhaltung und das CBD: Bedeutung für den Betrieb von Genbanken zoogenetischer Ressourcen 26

 3.1.4.4 Die *ex situ*-Erhaltung nach Art. 9 CBD 27

 3.1.5 Das CBD als Schlüssel zum Zugang zu genetischen Ressourcen 29

 3.1.5.1 Zugang zu genetischen Ressourcen im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank zoogenetischer Ressourcen (Art. 15 CBD) 30

 3.1.5.2 Technologietransferbestimmungen im Hinblick auf den Zugang zu genetischen Ressourcen (Art. 16 CBD) 36

3.1.5.3 Umgang mit Biotechnologien und Verteilung der daraus resultierenden Vorteile (Art. 19 CBD)	37
3.1.6 Die Bonner Richtlinien – Möglichkeit zur nationalen Umsetzung der Vertragsstaaten	39
3.1.6.1 Ziel der Bonner Richtlinien	40
3.1.6.2 Rollen und Verpflichtungen der Akteure.....	40
3.1.6.3 Teilnahme von Interessengruppen.....	41
3.1.6.4 Schritte im Prozess des Zugangs und der Gewinnverteilung	41
3.1.6.5 Regulierung des PIC-Verfahrens nach den Bonner Richtlinien	42
3.1.6.6 Regulierung der einvernehmlich festgelegten Bedingungen (MAT's) durch die Bonner Richtlinien	43
3.1.6.7 Verteilung der Gewinne nach den Bonner Richtlinien	43
3.1.7 Würdigung des CBD und der Bonner Richtlinien im Hinblick auf <i>ex situ</i> -Genbanken	44
3.2 Übereinkommen über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) – Handel mit genetischen Ressourcen	47
3.2.1 Das Schutzgut des Washingtoner Artenschutzübereinkommens	48
3.2.2 Die Regulierung des Handels durch CITES	49
3.2.3 Zusammenfassende Betrachtung im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank ..	56
3.2.4 Die Umsetzung von CITES auf der Ebene der Europäischen Gemeinschaft ...	57
3.2.4.1 Verordnung (EG) Nr. 338/97: Über den Schutz von Exemplaren wildlebender Tier- und Pflanzenarten durch Überwachung des Handels. .	58
3.2.4.2 Resümierende Betrachtung: wissenschaftlicher Austausch vs. kommerzielle Nutzung	64
4. Zusammenfassende Betrachtung des CBD und des CITES im Hinblick auf den Betrieb von Genbanken zoogenetischer Ressourcen	68

Kapitel II: Naturwissenschaftliche Implikationen

Isolation, Charakterisierung, Differenzierung und Kryokonservierung adulter Stammzellen aus der Haut am Modell *Sus scrofa domestica*

5. Einführung in die Thematik der Stammzellen	72
5.1 Embryonale Stammzellen	73
5.2 Adulte Stammzellen	78
5.3 Die Haut als Quelle adulter Stammzellen	83
5.3.1 Epidermale Stammzellen.....	85
5.3.2 Multipotente Stammzellen der Dermis	86
6. Ziel dieser Studie	89
7. Material	92
7.1 Materialien und Lösungen für die Zellkultur	92
7.1.1 pSSC Isolation und Zellkultur	92
7.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur	92
7.1.2.1 Transportmedium	92
7.1.2.2 Proliferationsmedium (PM)	92
7.1.2.3 Neurogenes Differenzierungsmedium (NDM)	93
7.1.2.4 Adipogenes Differenzierungsmedium (ADM)	93
7.2 Lösungen und Reagenzien für die Gen-Expressionsanalysen.....	93
7.2.1 Puffer und Lösungen für die RNA Isolation.....	93
7.2.2 Enzyme, Puffer und Lösungen für die cDNA Synthese.....	94
7.2.3 Enzyme, Puffer und Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	94
7.2.4 Oligonukleotide.....	94
7.2.5 Materialien und Lösungen für die Gel-Elektrophorese	95
7.3 Lösungen für die Immunocytochemie und Durchflusszytometry	95
7.3.1 Lösungen und Reagenzien zur Zellpreparation	95
7.3.2 Antikörper	96
7.3.2.1 Primäre Antikörper.....	96
7.3.2.2 Sekundäre Antikörper	96
7.4. Gebrauchswaren.....	97
7.5 Ausstattung	97
8. Methoden.....	98
8.1 Biopsie und Probentransport.....	98
8.2 Isolation primärer Zellen.....	98

8.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität	99
8.4 Zellaufreinigung und Zellkultur.....	99
8.5 Kryokonservierung	100
8.6 Proliferationsrate und Verdopplungszeit	101
8.7 Messung des Zelldurchmessers	101
8.8 Assay zur Ermittlung koloniebildender Einheiten	102
8.9 Gen-Expressionsanalyse.....	102
8.9.1 RNA-Isolation	102
8.9.2 DNase I Verdauung	103
8.9.3 cDNA Synthese	104
8.9.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	104
8.10 Differenzierungsassays	106
8.10.1 Neurogene Differenzierung.....	106
8.10.2 Adipogene Differenzierung	106
8.11 Methoden zur Untersuchung der Proteinexpression	107
8.11.1 Immunocytochemie	107
8.11.2 Durchflusszytometrie	107
8.12 Oil Red O Färbung	108
9. Ergebnisse.....	109
9.1 Isolation und Zellkultur	109
9.2 Charakterisierung der isolierten pSSCs.....	110
9.2.1 Morphologie, Zellgröße und Proliferationsverhalten.....	110
9.2.2 Assay zur Ermittlung koloniebildender Einheiten	112
9.2.3 Phänotypische Charakterisierung der pSSCs	115
9.2.3.1 Untersuchungen zur Expression von Oberflächenproteinen	115
9.2.3.2 Untersuchungen zur Ko-Expression von Nestin und Fibronectin.....	119
9.2.3.3 Quantifizierung der Nestin-Expression.....	120
9.2.3.4 Untersuchung zur Expression stammzell- und vorläuferassoziierter Gene	121
9.3 Differenzierungs-Assays.....	124
9.3.1 Neurogene Differenzierung.....	124
9.3.1.1 Morphologische Auswirkungen der Differenzierung	125
9.3.1.2 Immunocytochemischer Nachweis von Proteinen neuronaler Zellen und Muskelzellen in differenzierten pSSCs.....	126
9.3.1.3 Untersuchungen zur differenzierungsbedingten Regulation zelltypspezifischer Markerproteine	131
9.3.2 Adipogene Differenzierung	141

10. Diskussion	143
10.1 Isolation und Zellkultur	143
10.2 Ähnlichkeiten der pSSCs mit MSCs	144
10.2.1 Morphologie der pSSCs.....	144
10.2.2 Untersuchungen zum Proliferationsverhalten	145
10.2.3 Untersuchungen zur Expression stammzellassoziierter Proteine.....	146
10.2.3.1 Auswirkungen der Expansion und der Kryokonservierung auf die Expression von Oberflächenproteinen.....	148
10.2.3.2 Expression von Nestin und Fibronectin.....	149
10.2.4 Expression stammzellassoziierter Gene	150
10.2.5 Auswirkungen der Expansion und der Kryokonservierung auf die Expression stammzellassoziierter Gene	151
10.3 Untersuchungen zum Differenzierungspotential der pSSCs	153
10.3.1 Neurogene Differenzierung.....	153
10.3.1.1 Auswirkungen der Expansion auf die Regulation von Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA während der neuronalen Differenzierung	156
10.3.1.2 Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Regulation von Nestin, β -III- Tubulin, GFAP und α -SMA während der neuronalen Differenzierung....	157
10.3.2 Adipogene Differenzierung	158
11. Zusammenfassung	160
Zusammenfassende Gesamtbetrachtung	162
Literatur	164
Erklärung	185
Lebenslauf	186
Publikationen	189

II Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Stammzellhierarchie. Die Zygote und Zellen früher embryonaler Entwicklungsstadien bis zum Morulastadium gelten als Totipotent, da sie sich zu einem komplexen Organismus entwickeln können. Im Stadium der Blastozyste sind nur noch die Zellen der inneren Zellmasse (IZM) dazu fähig, *in vivo* in Zellen aller drei Keimblätter und in männliche und weibliche Keimzellen (PKZ: Primordiale Keimzelle; EKZ: Embryonale Keimzellen) zu differenzieren. Embryonale Stammzellen (ESZ) sind somit pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse isoliert werden. Auch *in vitro* besitzen sie die Fähigkeit, in Zelltypen aller drei Keimblätter und in Keimzellen zu differenzieren. Abbildung modifiziert nach Wobus & Boheler 2005. 74
- Abb. 2: Interleukin (IL)-6 Signalgebung über den Jak-Stat-Signalweg. IL-6 führt zu Dimerisation des gp130 Moleküls. Assoziierte Jaks werden aktiviert und phosphorylieren den intrazellulären Teil von gp130, wodurch Andockstellen für Stat1 und Stat3 geschaffen werden. Diese werden ebenfalls phosphoryliert, bilden Homo- oder Heterodimere und wandern in den Zellkern. Dort wirken sie als Transkriptionsfaktoren und regulieren die Gentranskription. Darstellung aus Heinrich et al. 1998. 75
- Abb. 3: Schematische Darstellung eines möglichen Modells des transkriptionellen Netzwerks zur Regulation der Pluripotenz muriner ES-Zellen, das durch Oct3/4 und Sox-Faktoren reguliert wird. Sox2 und weitere Sox-Faktoren regulieren redundant Oct-Sox-Enhancer abhängige Gene, wobei nur Sox2 multiple Transkriptionsfaktoren reguliert, die sich sowohl positiv als auch negativ auf die Oct3/4-Expression auswirken können. Grafik modifiziert nach Masui et al. 2007. 77
- Abb. 4: Stammzellen des Haarfollikels und ihre Differenzierungswege. Modifiziert nach Alonso & Fuchs 2003. 86
- Abb. 5: (A) Primäre Zellkultur 1-2 Tage nach dem initialen Aussähen. (B, C) Zellkultur nach 2-4 Tagen. (D) Ablösen der Zielzellen durch kurzzeitige Inkubation mit Trypsin/EDTA. (E, F) Morphologisch einheitliche pSSC-Kultur nach 2-4maliger Wiederholung der Aufreinigung. Größenbalken: 200µm 110
- Abb. 6: pSSCs erscheinen als spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Zellen. Größenbalken: (A) 200µm, (B) 100µm, (C) 50 µm 110
- Abb. 7: Repräsentative CASY-Messung des Zelldurchmessers. 111
- Abb. 8: Mittlerer Durchmesser undifferenzierter pSSCs in frühen (P2-P5; weiße Balken) und späten (P10-P15; graue Balken) Passagen aller sechs pSSC-Linien. 111
- Abb. 9: Kumulative Populationsverdopplung als Funktion zur Zeit in Kultur. Diagramm zeigt die Mittelwerte (\pm SEM) von vier unabhängigen pSSC-Linien über einen Zeitraum von 126 Tagen. 112
- Abb. 10: pSSCs besitzen die Fähigkeit zur Koloniebildung. (A) Einzelne Zelle unmittelbar nach dem Adhären an der Wachstums oberfläche. (B) Zellkolonie nach vier Tagen in Proliferationsmedium. (C) Zellkolonie nach 11 Tagen. (D-F) Repräsentative Bilder gefärbter Zellkolonien der drei untersuchten pSSC-Linien. Größenbalken (A, B) 100 µm, (C) 500µm, (D-F) 1 cm. 113

Abb. 11: (A-C) Größe und Anzahl der entstandenen Zellkolonien dreier untersuchter pSSC-Linien (#1, #3, #4) in Passage 5 (entspr. CPD 22). Daten sind dargestellt als Mittelwerte dreier Experimente \pm SEM. (D) CFU-Effektivität der drei untersuchten pSSC-Linien, dargestellt als prozentualer Anteil der koloniebildenden Zellen zur Gesamtzellzahl \pm SEM. 114

Abb. 12: Repräsentative Histogramme der gemessenen Expression stammzellassoziierter Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105. Grüne bzw. rote Kurve zeigt die gemessene Fluoreszenz des jeweiligen Proteins. Schwarze Kurve zeigt die gemessene Fluoreszenz der Isotypenkontrolle als Referenzwert. 116

Abb. 13: (A-F) Expression der stammzellassozierten Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 in frühen Passagen (P2-P5) der sechs untersuchten pSSC-Linien. 117

Abb. 14: (A-F) Expression der stammzellassozierten Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 in späten Passagen (P10-P15) der sechs untersuchten pSSC-Linien. 118

Abb. 15: (A-F) Expression der stammzellassozierten Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 in frühen Passagen (P2-P5) von den pSSC-Linien #1-#4 nach Kryokonservierung. 119

Abb. 16: Ko-Expression der intrazellulären Proteine Nestin und Fibronectin. (A, D) Grün: Nestin, Blau: Zellkerne. (B, E) Rot: Fibronectin, Blau: Zellkerne. (C, F) Überlagerung der beiden vorherigen Bilder A, B bzw. D, E zeigt die Ko-Expression von Nestin und Fibronectin in pSSCs. 120

Abb. 17: Relative Anzahl Nestin exprimierender Zellen der sechs untersuchten pSSC-Linien in frühen Passagen (P2-P5, dunkel graue Balken) und späten Passagen (P10-P15, hell graue Balken) 121

Abb. 18: (A) Ergebnis der RT-PCR-Analyse der Expression von mit Stammzeleigenschaften assoziierter Gene in pSSCs früher Passagen (P2-P5). (B) Ergebnis der RT-PCR-Analyse der Expression von mit Stammzeleigenschaften assoziierter Gene in pSSCs später Passagen (P12-P15). Interne PCR-Kontrolle: HPRT. 123

Abb. 19: Ergebnis der RT-PCR-Analyse der Expression von mit Stammzeleigenschaften assoziierter Gene in pSSCs früher Passagen nach Kryokonservierung (P2-P5). Interne PCR-Kontrolle: HPRT. 124

Abb. 20: Während der Kultivierung der pSSCs in NDM bilden sich dreidimensionale Strukturen. In der Peripherie dieser Cluster befinden sich Zellen mit ähnlichen Morphologien wie neuronale Zelltypen (A, B weiße Pfeile) und glatte Muskelzellen (A,B schwarze Pfeile) Größenbalken: A, B: 200 μ m, C: 100 μ m. 125

Abb. 21: Subpopulationen der in NDM differenzierten pSSCs entwickelten Morphologien, die der neuronaler Zelltypen und der glatter Muskelzellen ähneln. (A) Teil des in Abb. 27 gezeigten Netzwerkes. Größenbalken: 500 μ m. (B) Vergrößerung des markierten Ausschnittes in (A). (B, C) Unterschiedliche Morphologie der differenzierten pSSCs. Weiße Pfeile markieren neuronale Zelltypen, schwarze Pfeile den muskulären Zelltyp. Größenbalken: 50 μ m. (D-F) Deutliche Ausprägung langer Axone (weiße Pfeile) der neuronärenähnlichen Zellen bis zum Ende der induzierten Differenzierung. Größenbalken 100 μ m (G-I). Deutliche Zunahme der unterschiedlichen Zelltypen bis zum Ende der induzierten Differenzierung. Größenbalken: G: 200 μ m, H, I: 100 μ m. 126

- Abb. 22: Expression spezifischer intrazellulärer Proteine differenzierter Zelltypen in den entstandenen Zellclustern. (A-C): Nachweis des Proteins β -III-Tubulin. Grün: β -III-Tubulin, blau: Zellkerne. (D-F) Nachweis des Astrozyten- und Gliazellenmarkers GFAP. Grün: GFAP, blau: Zellkerne. (G-I) Nachweis von α -SMA, eines Markers für glatte Muskelzellen. Grün: α -SMA, blau: Zellkerne. Größenbalken: 50 μ m..... 127
- Abb. 23: Immunocytochemischer Nachweis des Neuronen spezifischen Proteins β -III-Tubulin in Subpopulationen differenzierter pSSCs mit neuronaler Morphologie. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μ m..... 128
- Abb. 24: Immunocytochemischer Nachweis des Astrozyten- und Gliamarkers GFAP in Subpopulationen differenzierter pSSCs. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μ m..... 128
- Abb. 25: Immunocytochemischer Nachweis des mittleren Neurofillaments NF-M in differenzierten pSSCs. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μ m. 129
- Abb. 26: Immunocytochemischer Nachweis des Proteins α -SMA in Subpopulationen differenzierter pSSCs. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μ m. 129
- Abb. 27: Strukturiertes Zellnetzwerk nach 30 Tagen Differenzierung der pSSCs (Linie #4) in NDM. Größenbalken: 500 μ m..... 130
- Abb. 28: (A-C) Deutliche Ausprägung eines neuronalen Netzwerkes der pSSC-Linie #4 in NDM. Größenbalken: A: 500 μ m, B: 200 μ m, C: 100 μ m. (D-E) Immunocytochemischer Nachweis von β -III-Tubulin. (D) Zellkerne, (E) Protein, (F) Überlagerung der beiden Bilder D und E. Größenbalken: 50 μ m..... 130
- Abb. 29: Repräsentative Histogramme der gemessenen Expression der Proteine Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA vor (undiff; obere Reihe) und nach 30-tägiger Differenzierung (diff 30t; untere Reihe) unter neurogenen Kulturbedingungen. Schwarze Kurve: Isotypenkontrolle, grüne Kurve: Protein. 132
- Abb. 30: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung Nestin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5)..... 132
- Abb. 31: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung β -III-Tubulin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5). 133
- Abb. 32: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung GFAP positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5)..... 134
- Abb. 33: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung α -SMA positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5)..... 134
- Abb. 34: Mittelwerte der relativen Anzahl Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA positiver Zellen aller sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung \pm SEM. Sterne

- verweisen auf die statistische Signifikanz der Mittelwerte des relativen Anteils positiver Zellen. $P \leq 0.05$ (*) und $P \leq 0.005$ (**). 135
- Abb. 35: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung Nestin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15). 135
- Abb. 36: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung β -III-Tubulin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15). 136
- Abb. 37: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung GFAP positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15). 136
- Abb. 38: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung α -SMA positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15). 137
- Abb. 39: Mittelwerte der relativen Anzahl Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA positiver Zellen aller sechs untersuchten pSSC-Linien später Passagen (P12-P15) vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung \pm SEM. Sterne verweisen auf die statistische Signifikanz der Mittelwerte des relativen Anteils positiver Zellen. $P \leq 0.05$ (*) und $P \leq 0.005$ (**). 137
- Abb. 40: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung Nestin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung. 138
- Abb. 41: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung β -III-Tubulin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung. 139
- Abb. 42: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung GFAP positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung. 139
- Abb. 43: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung α -SMA positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung. 140
- Abb. 44: Mittelwerte der relativen Anzahl Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA positiver Zellen der vier untersuchten kryokonservierten pSSC-Linien (#1-#4) früher Passagen (P12-P15) vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung \pm SEM. Sterne verweisen auf die statistische Signifikanz der Mittelwerte des relativen Anteils positiver Zellen. $P \leq 0.05$ (*) und $P \leq 0.005$ (**). .. 140
- Abb. 45: (A-C) Positive Oil Red O Färbung intrazellulärer Lipidtropfen in pSSCs nach 30 Tagen induzierter adipogener Differenzierung. (D-F) pSSCs im Kontrollmedium zeigen nahezu keine Oil Red O Inkorporation. Größenbalken: 50 μ m. 142
- Abb. 46: Expression der Leptin mRNA vor (undiff; linke Spalte) und nach induzierter adipogener Differenzierung zum Zeitpunkt der Bildung erster Lipidtropfen (diff; rechte Spalte). Interne PCR-Kontrolle: HPRT. 142

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über momentan bestehende Gen-Banken.	17
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen.....	94
Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper und angewandte Verdünnungen.....	96
Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper und angewandte Verdünnungen	96
Tabelle 5: Verwendete Komponenten des Mastermix zur cDNA Synthese	104
Tabelle 6: Verwendete Komponenten des Mastermix zur PCR.....	105

IV Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	Alpha smooth muscle actin
AAZA	American Association of Zoos and Aquariums
AAZPA	American Association of Zoological Parks and Aquariums
ABCG2	ATB-binding cassette, sub-family G, member 2
ADM	Adipogenes Differenzierungsmedium
ART	Artificial reproductive techniques
BArtSchV	Bundesartenschutzverordnung
Bcrp1	Breast cancer resistant protein 1
β -III-Tubulin	Beta-III-Tubulin
bFGF	Basic fibroblast growth factor
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1
BM-MSCs	Bone marrow mesenchymal stem cells
BNatSchG	Bundesnaturschutzgesetz
CBD	Convention on Biological Diversity
CBSG	Conservation breeding specialist group
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFU-F	Colony forming unit fibroblasts
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
CoP	Conference of the Parties
CPD	Cumulative population doubling

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Rec.	Recombinant
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAZA	European Association of Zoos and Aquariums
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEP	Europäisches Erhaltungszuchtprogramm
EG	Europäische Gemeinschaft
EGF	Epidermal growth factor
Erw.	Erwägung
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FFH	Flora Fauna Habitat
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
gp130	Glycoprotein 130
GRB	Genome Ressource Bank
hBM-MSCs	Human bone marrow mesenchymal stem cells
HBSS	Hank's balanced salt solution
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
hSCP	Human scalp tissue stem cells
HSCs	Hematopoietic stem cells
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICM	Inner cell mass
Ig	Immune globulin
IL	Interleukin
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
IUCN	International Union for Conservation of Nature
IZM	Innere Zellmasse
Jak	Janus kinase
LIF	Leucemia inhibitory factor
LIFR β	Leucemia inhibitory factor receptor β
MAT's	Mutual agreed terms
MSCs	Mesenchymal stem cells
NDM	Neurogenes Differenzierungsmedium

IV Abkürzungsverzeichnis

NF-M	Mittleres Neurofillament
Oct3/4	Octamere binding transkription factor 3/4
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Population doubling
PDGF	Platelet derived growth factor
PIC	Prior informed consent
POU5F1	POU class 5 homoeobox 1
pSSCs	Porcine skin-derived stem cell-like cells
Rn.	Randnummer
R-PE	R-Phycoerythrin
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean
SKP's	Skin-derived precursors
Sox2	Sex determining region Y-box 2
SSP	Species survival plan
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	Transforming growth factor β
UN	United Nations
UNCED	United Nations Conference on Environment and Development
UNEP	United Nations Environment Programme
VO	Verordnung
WAZA	World Association of Zoos and Aquariums
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

17 Jahre nach der Ratifizierung des Übereinkommens über die Biologische Diversität (Convention on Biological Diversity, CBD) in Rio de Janeiro wird deutlich, dass das 2010 Millennium Target der Vertragsparteien, mit dem Ziel der Reduktion des Verlustes an biologischer Diversität auf regionaler, nationaler und globaler Ebene (CoP 6 Decision VI/26), kaum erfüllt werden kann. Während generell die prekäre Situation der großen "Flaggschiffe" des internationalen Artenschutzes wie den großen Pandas, Gorillas und Orang Utans bekannt ist, sind viele andere, weniger bekannte Arten, in z.T. bedrohlicheren Situationen. Bei Betrachtung der Roten Liste der gefährdeten Tierarten der IUCN von 2007 zeigt sich, dass derzeit von allen bisher untersuchten Arten 43% der Süßwasserfische, 32,2% der Amphibien, 23% der Säugetiere und 12% der Vögel als gefährdet eingestuft sind. Diese Gefährdung resultiert hauptsächlich aus der zunehmenden Zerstörung und dem Verlust von Lebensräumen, bedingt durch das fortwährende Bevölkerungswachstum, durch Überfischung, Industrialisierung, aber auch durch auftretende Wildtierkrankheiten und andere sich ändernde Faktoren, die sich nachhaltig auf Wildtierpopulationen auswirken können, wie etwa Klimawandel und zunehmende Dominanz konkurrenzstarker "Allerweltsarten".

Mit dem Verlust an Arten geht unweigerlich ein Verlust an bedeutendem biologischem Wissen verloren. Dies bezieht sich sowohl auf grundlegende biologische Fragestellungen als auch auf Wissen, das zum Wohle der Menschheit beitragen kann. Dies wird deutlich, wenn man die Vielzahl an biologischen Ressourcen bedenkt, die für die Entwicklung neuer Medikamente und im Rahmen biotechnologischer Prozesse bereits Verwendung fanden.

Zur Erhaltung gefährdeter Arten bedarf es eines intensiven Managements. Hierbei müssen sowohl *in situ*- (Erhaltung der Arten in ihrem Lebensraum) als auch *ex situ*- (Erhaltung von Arten außerhalb ihres Lebensraumes) Maßnahmen Anwendung finden. Dies erfordert einen kooperativen, multidisziplinären Ansatz, der einen großen Bereich biologischer, aber auch rechtswissenschaftlicher Disziplinen umfasst.

Ziel des Artenschutzes ist die Erhaltung und Förderung der Biodiversität. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die Unterschutzstellung und Pflege natürlicher und naturnaher Habitate die ideale Maßnahme. Allerdings sind diese sogenannten *in situ*-Maßnahmen oft nicht ausreichend zur Erhaltung kleiner Populationen und zur Aufrechterhaltung einer regionaltypischen genetischen Diversität. Somit ist es von großer Bedeutung, oben genannte *in situ*-Maßnahmen durch weitere Strategien der *ex situ*-Erhaltung, wie z.B. durch

Nachzüchtungen, zu unterstützen. Durch die stetige Weiterentwicklung in verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen ergibt sich durch die sogenannte Kryokonservierung eine weitere, vielversprechende Option der *ex situ*-Erhaltung. Im Hinblick auf die *ex situ*-Erhaltung versteht man unter Kryokonservierung die Konservierung von Zellen oder Geweben gefährdeter Arten durch deren Abkühlen auf Temperaturen von bis zu -196°C . Dies eröffnet theoretisch die Möglichkeit, diese biologischen Materialien über nahezu unbefristete Zeiträume ohne biochemische Veränderungen und unter bestimmten Voraussetzungen auch ohne physikalische Änderungen in Genbanken zu lagern.

Die veränderungsfreie Lagerung biologischer Materialien in Genbanken, auch Kryo- oder Biobanken genannt, ist heute bereits von erheblicher Bedeutung für den Artenschutz und die assoziierte Forschung. Ihr Ausbau wird international zunehmend gefordert (Johnston & Lacy, 1995; Ptak *et al.*, 2002; Schiewe M.C., 1995; Tondreau *et al.*, 2004; Watson & Holt, 2001; Wildt *et al.*, 1997).

Bedeutende aktuelle Beispiele bereits etablierter Genbanken sind der Frozen Zoo der zoologischen Gesellschaft San Diegos (Benirschke, 1984; Ryder *et al.*, 2000), die Frozen Ark der Universität Nottingham (Clarke, 2009) sowie die Bioressourcebank Süd Afrikas (Bartels & Kotze, 2006). Weltweit existieren bereits mehr als 150 Genbanken, die sich die Sammlung und Lagerung zoogenetischer Ressourcen als wichtigen Beitrag zum Schutz der Biodiversität zum Ziel gesetzt haben (Watson & Holt, 2001).

Richtig eingesetzt, haben diese gelagerten Ressourcen das Potential, einen enormen Beitrag zur Erhaltung der biologischen Diversität zu leisten. Genbanken können gleichermaßen die *in situ*- und *ex situ*-Erhaltung unterstützen. Dies vor allem durch die Bereitstellung von wichtigem genetischem Material für die Erhaltungszucht, sowie somatischer Zellen und Stammzellen für die Grundlagenforschung (Holt *et al.*, 1996; Holt, 2008; Lermen *et al.*, 2009; Watson & Holt, 2001).

Für den Betrieb einer Genbank auf internationaler Ebene, mit dem Ziel, Proben gefährdeter Tierarten für Nachzuchtprojekte und assoziierte Forschung bereit zu halten, bleiben juristische Fragen ungeklärt. Diese betreffen überwiegend den Zugang zu genetischen Ressourcen von gefährdeten Tierarten sowie den nachfolgenden internationalen Handel und Austausch der gewonnenen Proben zur wissenschaftlichen, aber auch zur kommerziellen Forschung.

Naturwissenschaftlich stellt sich dagegen vorrangig die Frage nach den am besten geeigneten Zelltypen für die Lagerung in Genbanken und ihre Gewinnung aus den Organismen.

Deshalb beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit zwei wesentlichen Aspekten zum Betrieb von Genbanken. Das erste Kapitel behandelt die juristischen Implikationen im Hinblick auf den Zugang und den Handel mit Proben gefährdeter Tierarten. Das zweite Kapitel bearbeitet aufgrund von Laborversuchen und durch nachfolgende Interpretation und Diskussion der Ergebnisse die naturwissenschaftlichen Implikationen der Gewinnung von Stammzellen aus der Haut des Hausschweins als Modellorganismus. Das Zusammenwirken juristischer und naturwissenschaftlicher Implikationen ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg von Bio-Kryobanken (Genbanken) als wichtiges Standbein für die Erhaltung, aber auch nachhaltige Nutzung der Bioressourcen.

Die meisten *ex situ*-Programme, die zur Unterstützung von *in situ*-Schutzmaßnahmen ins Leben gerufen werden, bedürfen vitaler biologischer Materialien wie Spermien, Eizellen, somatischer Zellen oder Stammzellen gefährdeter Tierarten. Diesbezüglich ist der Zugang zu qualitativ hochwertigen biologischen Proben gefährdeter Tierarten die größte **juristische** Hürde, die es zu überwinden gilt und die den Erfolg dieser Projekte limitieren kann (Lermen *et al.*, 2009).

Oftmals sind es gerade aufwändige nationale und internationale Verwaltungsprozesse, die eine Entnahme von Proben aus der Wildnis erschweren und letztendlich Naturschutzprojekte und die damit assoziierte wissenschaftliche Forschung enorm behindern können.

Bereits 1992 lag das Übereinkommen über die biologische Diversität, als Resultat der Konferenz der Vereinten Nationen für Umwelt und Entwicklung, in Rio de Janeiro zur Unterzeichnung durch die Vertragsstaaten aus. Inzwischen haben 191 Vertragsstaaten das Abkommen unterzeichnet und auch dadurch die Notwendigkeit internationalen Handelns zum Schutz der Biodiversität deutlich unterstrichen.

Das Übereinkommen fordert die Vertragsstaaten durch Art. 8 CBD auf, *in situ*-Maßnahmen zum Schutz ihrer heimischen Wildtiere zu ergreifen und gleichzeitig diese Maßnahmen durch *ex situ*-Projekte zu unterstützen (Art. 9 CBD).

Die Lagerung und Bereithaltung biologischer Proben in Genbanken gilt inzwischen als unerlässlicher, integrativer Bestandteil vieler *ex situ*-Projekte (Johnston & Lacy, 1995; Ptak *et al.*, 2002; Schiewe M.C., 1995; Watson & Holt, 2001; Wild, 2000; Wildt *et al.*, 1997).

Die Bedingungen des Zugangs zu genetischen Ressourcen auf internationaler Ebene werden mit Art. 15 CBD definiert. Doch gerade hierbei bleiben viele Fragen offen und ungeklärt. Dies führt letztlich dazu, dass der Zugang bisher durch mühselige Verhandlungen der Vertragsstaaten, illegal oder gar nicht erfolgte, was in allen Fällen wenig vorteilhaft für die Umsetzung von *ex situ*-Programmen ist.

Da wie oben erwähnt bereits mehr als 150 Genbanken weltweit zur Unterstützung von *ex situ*-Projekten existieren, ist eine Vernetzung dieser und ein Austausch von Proben nicht auszuschließen und in vielen Fällen auch zwingend erforderlich. Hierbei sehen sich die

Betreiber von Genbanken Unklarheiten gegenübergestellt, die hauptsächlich durch unterschiedliche Bewertungen und "Regulierungen" des internationalen Handels mit gefährdeten Arten (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) verursacht sind.

Aus genannten Gründen resultiert die Notwendigkeit der Betrachtung der erwähnten internationalen Übereinkommen (CBD und CITES) und die Auseinandersetzung der durch diese gegebenen Regulierungen des Zugangs zu und des Handels mit Materialien gefährdeter Tierarten im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank zoogenetischer Ressourcen.

Der erste Teil dieser Arbeit verfolgt somit das Ziel, rechtliche Unklarheiten darzulegen, die den Zugang zu und den Handel mit biologischen Materialien gefährdeter Tierarten betrifft.

Im zweiten Teil werden **naturwissenschaftliche** Problemfelder auch in Labortests bearbeitet. Die meisten Genbanken, von denen in der Literatur berichtet wurde, sind hauptsächlich ausgerichtet auf die Lagerung von Gameten (Spermien und Eizellen) und Embryonen (Johnston & Lacy, 1995; Ptak *et al.*, 2002; Wild, 2000). Ihr Hauptziel ist somit, genetische Ressourcen für die Nachzucht gefährdeter Arten durch die Anwendung künstlicher Reproduktionsmethoden (assisted reproductive techniques, ART) bereit zu halten. Zu diesen Methoden gehören u.a. die künstliche Befruchtung, die *in vitro* Fertilisation, sowie der Embryonentransfer.

Die genannten Techniken wurden bisher erfolgreich in der Zucht von Nutztieren eingesetzt (Thibier, 1998) und sind heute zur Erhaltung gefährdeter Arten unverzichtbar. Die Lagerung von Spermien gefährdeter Tierarten ermöglicht z.B. die Erhaltung der genetischen Variabilität durch das Einbringen von neuem genetischem Material in Populationen durch künstliche Befruchtung. Hierdurch können die Generationenintervalle nahezu unendlich gesteigert werden. Ebenso kann auf die erneute Entnahme von Tieren aus der Wildnis zum Zwecke zoobasierter Nachzuchtprogramme verzichtet werden. Gelagerte Spermaproben sowohl von freilebenden als auch in zoologischen Gärten gehaltenen Tieren können jederzeit, egal ob nach wenigen Wochen oder Jahrzehnten, in bestehende Populationen eingebracht werden, auch wenn der Spender bereits verstorben ist. Dies erhöht den genetischen Pool der Population erheblich und trägt somit entscheidend zur Minimierung von Inzuchtdepressionen bei (Roldan *et al.*, 2006).

Trotz vieler noch bestehender Unklarheiten und dem weiteren Bedarf an Untersuchungen zur Kryokonservierung von Keimzellen und der Reproduktionsbiologie konnten schon von einer Vielzahl von Arten Spermien kryokonserviert werden (Andrabi & Maxwell, 2007; Basavaraja N., 2004; Fauvel C., 1998; Fickel *et al.*, 2007; Hammerstedt & Graham, 1992;

Holt, 2000; Johnston & Lacy, 1995; Pukazhenti *et al.*, 2006). Nichtsdestotrotz sind Spermabanken gefährdeter Tierarten bisher nur unzureichend etabliert. Dies resultiert möglicherweise aus Schwierigkeiten bei der Spermagewinnung und dem Mangel an Kryokonservierungsprotokollen, die den Ansprüchen auch artspezifischer Eigenschaften gerecht werden müssen (Holt, 2008; Holt & Pickard, 1999; Watson & Holt, 2001). Weniger aussichtsreich und methodisch deutlich schwieriger ist die Kryokonservierung von Oozyten, da die Sammlung bisher nur von toten oder in Gefangenschaft gehaltenen Tieren möglich ist. Hieraus zeigt sich, dass die Lagerung des kompletten genetischen Pools einer Population dann problematisch ist, wenn bevorzugt oder ausschließlich nur Spermien und Eizellen konserviert werden (Benirschke, 1984; Holt *et al.*, 1996; Leon-Quinto *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 2000; Watson & Holt, 2001).

Grundlegend sollten zusätzlich zu Keimzellen deshalb auch somatisches Gewebe und Zelllinien in Genbanken konserviert werden. Wegen der leichten Zugänglichkeit und der Möglichkeit zu einer minimalinvasiven Biopsie ist die Haut das ideale Zielgewebe zur Gewinnung von Zelllinien. Die Entnahme kann sowohl an lebenden Tieren minimalinvasiv erfolgen, aber auch an toten Tieren, da Hautgewebe auch nach dem Tod noch über mehrere Stunden vital bleibt (Benirschke, 1984). Somit können durch die Sammlung, Aufarbeitung und Kryokonservierung von Hautproben Zelllinien etabliert werden, die bei Bedarf expandiert werden können. Dadurch wird eine nahezu unbegrenzte Menge an Probematerial für eine Vielzahl von Untersuchungen, die zum Populationsmanagement unerlässlich sind, verfügbar. Zur Ermittlung von genetischen Variationen innerhalb von Populationen, Untersuchungen zur Phylogenie, des Genflusses oder auch von Genselektionen, können damit wesentliche Proben gesichert werden.

Gerade die Lagerung von Zelllinien aus Hautbiopsien gefährdeter Arten eröffnet neue Möglichkeiten im Hinblick auf die Anwendung im Rahmen moderner Reproduktionstechniken. Neben der Verwendung somatischer Zellen für die genannten genetischen oder auch epidemiologischen und toxikologischen Studien können somatische Zellen auch zum Kerntransfer, auch bekannt als reproduktives Klonen, als Spender individuellen genetischen Erbgutes Verwendung finden. Dies ist gerade dann von großer Relevanz, wenn Individuen kleiner Populationen ihre reproduktive Phase bereits überschritten haben.

Durch die Möglichkeit des Kerntransfers kann somit die genetische Information des nicht mehr reproduzierenden Tieres erneut in die Population eingebracht werden. Wie auch durch die künstliche Befruchtung kann damit die genetische Variabilität innerhalb der Population erhöht werden, was letztlich zu einer höheren Fitness und Stabilität der Population beitragen kann. Bisher wurde von 16 Tierarten berichtet, bei denen der Kerntransfer erfolgreich

angewandt und vitaler Nachwuchs erzeugt werden konnte (Cibelli, 2007). Neben Nutztieren konnte bisher auch bei Wild-Säugetieren wie dem Gaur (*Bos gaurus*, Lanza *et al.*, 2000), dem europäischen Mufflon (*Ovis orientalis musimon*, Lio P., 2001), der Falbkatze (*Felis sylvestris lybica*, Gómez *et al.*, 2003) und dem Wolf (*Canis lupus*, Kim *et al.*, 2007a) der Kerntransfer erfolgreich umgesetzt werden.

Da generell somatische Zellen in Zellkultur nur eine limitierte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen können und letztendlich der replikativen Seneszenz erliegen, scheint die zur Verfügung stehende Probemenge letztlich limitiert. Um dem weitestgehend vorzubeugen, werden inzwischen adulte Stammzellen als weniger restriktive Quelle genetischer Information gefährdeter Arten betrachtet (Leon-Quinto *et al.*, 2009). Haupteigenschaften von Stammzellen sind die Fähigkeit zur unlimitierten Selbsterneuerung und das Potential zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen (Anderson *et al.*, 2001; Mimeault & Batra, 2008).

Bezüglich des replikativen Klonens konnte gezeigt werden, dass mit aus der Haut isolierten Stammzellen bessere Ergebnisse im Hinblick auf die Embryonalentwicklung erzielt werden konnten als mit dermalen Fibroblasten (Hao *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2004).

Neuere Untersuchungen zeigten interessanterweise, dass auch eine Differenzierung von Stammzellen aus der Haut von Schweineföten hin zu eizell-ähnlichen Zellen möglich ist, die auch für Spermien attraktiv waren (Dyce *et al.*, 2006).

Die Möglichkeit der Reprogrammierung somatischer Zellen zu Zellen, die die Fähigkeiten von embryonalen Stammzellen besitzen (sog. induzierte pluripotente Stammzellen, iPSCs), eröffnet zusätzlich neue Möglichkeiten der Anwendung somatischer Zellen für moderne Reproduktionsmethoden (Takahashi & Yamanaka, 2006; Wernig *et al.*, 2007). Auch diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass adulte Stammzellen einfacher zu reprogrammieren sind als bereits weiter differenzierte Zelltypen (Kim *et al.*, 2008). Hierdurch gewinnen adulte Stammzellen als weiterer Zelltyp neben Spermien und Eizellen mehr und mehr an Bedeutung für die Lagerung in Genbanken als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität durch ihr Potential für zukünftige reproduktionsbiologische Anwendungen.

Da bisher adulte Stammzellen aus der Haut nur von Menschen (Kajahn *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2005; Toma *et al.*, 2005) und von Labortieren (Fernandes *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 2004; McKenzie *et al.*, 2006; Toma *et al.*, 2001) isoliert wurden, besteht das naturwissenschaftliche Ziel dieser Arbeit darin, adulte Stammzellen aus der Haut des Hausschweins als Modellorganismus zu isolieren. Das Hausschwein erlaubt dank zahlreicher physiologischer Arbeiten und seiner phylogenetischen Stellung auch

Rückschlüsse auf eine große Anzahl verwandter Arten und erfüllt somit eine grundlegende Voraussetzung für die Verwendung als Modelltier. Eine detaillierte Beschreibung der Zielsetzung der naturwissenschaftlichen Abhandlung erfolgt nach einer weiteren Einführung über die Thematik der Stammzellen in Kapitel II.

Kapitel I

Juristische Implikationen

CBD und CITES als Instrumente des Zugangs zu und des Handels mit Proben gefährdeter Tierarten

1. Problemaufriss

Aus rechtswissenschaftlicher Sicht stellen sich bezüglich des Betriebes von Genbanken gleich mehrere Fragen. Im Hinblick auf gefährdete Arten zählen Genbanken neben Botanischen und Zoologischen Gärten zur sog. *ex situ*-Erhaltung. Diese wird neben der *in situ*-Erhaltung, dem direkten Schutz der Arten in ihrem natürlichen Lebensraum, auf internationaler Ebene durch das Übereinkommen über die Biologische Vielfalt (Art. 9, Convention on Biological Diversity, CBD) gefordert.

Grundlegend für die Sammlung und Lagerung von zoogenetischen Materialien in Genbanken als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität ist der Zugang zu diesen. Da sich Genbanken nicht unbedingt im Ursprungsland einer Art befinden müssen, ist zu klären, welche völkerrechtliche Regulierungsmechanismen existieren, die den Zugang zu zoogenetischen Materialien international regeln, und inwiefern diese für den Betrieb einer Genbank von Relevanz sind. Weiterhin ist zu klären, inwiefern und zu welchen Zwecken die Betreiber von Genbanken die gesammelten und gelagerten Materialien nutzen dürfen. Das CBD fordert unter anderem bei der Nutzung genetischer Ressourcen eine ausgewogene und gerechte Aufteilung der aus dem Nutzen entstandenen Vorteile unter allen Interessengruppen, die an den Prozessen des Zugangs, der Erforschung, der Entwicklung und der eventuellen kommerziellen Nutzung beteiligt sind (Art. 15 CBD). Gerade diesbezüglich ist unklar, ob und inwiefern die durch die CBD geforderten Regulierungen hinsichtlich des Zugangs und der gerechten Aufteilung der aus dem Nutzen der zoogenetischen Ressourcen entstandenen Vorteile auf Genbanken anwendbar sind und wie diese gegebenenfalls umgesetzt werden können.

Da, wie bereits einleitend erwähnt, weltweit mehr als 150 Genbanken existieren und eine Vernetzung dieser sowohl sinnvoll als auch letztlich nicht auszuschließen ist, stellt sich zudem die Frage, inwiefern die Sammlung und Lagerung sowie der Austausch von zoogenetischen Materialien gerade gefährdeter Arten auf internationaler Ebene dem völkerrechtlichen Übereinkommen über den internationalen Handel mit Arten freilebender Tiere und Pflanzen (Convention on international Trade in Endangered Species, CITES) unterliegt.

Von völkerrechtlicher Relevanz zur Bearbeitung dieser Fragen sind somit das Übereinkommen über die biologische Diversität und die damit verbundenen Bonner Richtlinien zum Zugang zu genetischen Ressourcen und zum Vorteilsausgleich, sowie das Washingtoner Artenschutzabkommen im Hinblick auf den Handel mit gefährdeten Tierarten.

Im Folgenden sollen die genannten völkerrechtlichen Vereinbarungen als Instrumente zum Zugang und zur weiteren Nutzung von in Genbanken gelagerten zoogenetischen Materialien gefährdeter Tierarten näher betrachtet werden. Da sich die nachfolgende naturwissenschaftliche Abhandlung mit den Fragen der Isolierung, Charakterisierung und Kryokonservierung von potentiellen Stammzellen aus zoogenetischen Ressourcen am Modell des Hausschweins als nicht gefährdete Art beschäftigt, sollen auch im folgenden rechtswissenschaftlichen Teil ausschließlich zoogenetische Materialien im Fokus der Untersuchungen stehen.

2. Einführung

Strategien zur Erhaltung der biologischen Diversität

Um ein besseres Verständnis der Bedeutung von Genbanken für die Erhaltung gefährdeter Arten zu erreichen, werden im Folgenden die Möglichkeiten der Erhaltungsmaßnahmen beschrieben und zudem Anwendungspotentiale von in Genbanken gelagerten zoogenetischen Materialien näher betrachtet.

2.1. *In situ*-Strategie zur Erhaltung biologischer Ressourcen

Die *in situ*-Erhaltung, also die Erhaltung der natürlichen Lebensräume mit den darin enthaltenen Arten, ist bei weitem die wichtigste Strategie zum Erhalt der biologischen Diversität. Durch die Ausweisung von Schutzgebieten und der damit verbundenen Abwehr von menschlichen Einflüssen kann nicht nur der Schutz einzelner Arten gewährleistet werden, sondern auch von Artengruppen und teilweise auch von funktionsfähigen Ökosystemen.

Hinsichtlich der *in situ*-Erhaltung bedient sich der Gesetzgeber hauptsächlich der direkten Ausweisung von Schutzgebieten.

Auf nationaler Ebene sind dies am Beispiel der Bundesrepublik Deutschland Naturschutzgebiete (§13 BNatSchG), Landschaftsschutzgebiete (§15 BNatSchG), Biosphärenreservate (§14a BNatSchG), Nationalparks (§14 BNatSchG) und Naturparks (§16 BNatSchG). Auf europäischer Ebene basiert die rechtliche Regulierung der Schutzgebietsausweisung auf der Richtlinie 92/43/EWG des Europäischen Rates vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen, die einen Aufbau eines europäischen Netzes der sogenannten Natura 2000 Gebiete (Richtlinie 92/43/EWG Art. 3, in der BRD umgesetzt durch §19a BNatSchG) vorsieht.

Internationale Standards zur Erhaltung der Biodiversität durch *in situ*-Maßnahmen wurden von der Weltnaturschutzvereinigung (International Union for Conservation of Nature, IUCN) eingeführt (Keller et al. 2002, S. 21f). Diese definiert sechs Kategorien zum Management von Schutzgebieten nach ihren Managementzielen.

Kategorie Ia: Strenges Naturreservat: Schutzgebiet vorrangig zugänglich für wissenschaftliche Forschung und Umweltmonitoring

Kategorie Ib:	Wildnisgebiet: Schutzgebiet hauptsächlich zum Schutz der Wildnis
Kategorie II:	Nationalpark: Schutzgebiet zum Schutz von Ökosystemen und zur Erholung
Kategorie III:	Naturmonument: Schutzgebiet hauptsächlich eingerichtet zur Erhaltung spezifischer natürlicher und auch natürlicher/kultureller Besonderheiten
Kategorie IV:	Biotop-/Artenschutzgebiet mit Management: Schutzgebiet eingerichtet hauptsächlich zum Naturschutz durch Managementeingriffe
Kategorie V:	Geschützte Landschaft, geschütztes marines Gebiet: Schutzgebiet hauptsächlich eingerichtet zur Erhaltung von Landschaften und Meereslandschaften und zur Erholung
Kategorie VI:	Ressourcenschutzgebiet mit Management: Schutzgebiet vorrangig ausgewiesen zur nachhaltigen Nutzung natürlicher Ökosysteme

Dieses Kategoriensystem ist unter anderem die Grundlage für die Liste der Vereinten Nationen (UN) der Nationalparks und Schutzgebiete (Boitani et al. 2008).

2.1. *Ex situ*-Strategien zur Erhaltung biologischer Ressourcen

Als *ex situ*-Erhaltung bezeichnet man die Erhaltung einer Art außerhalb ihres natürlichen Lebensraumes. Nach Glowka, Burhenne-Guilmin und Synge (1994) gehört zur *ex situ*-Erhaltung eine Vielzahl von Techniken, unter anderem:

- Genbanken (Samenbanken, Feldgenbanken, Spermabanken und Ovarbanken etc.)
- *in vitro*-Pflanzengewebesammlungen und Sammlungen mikrobieller Kulturen
- Nachzuchtungen von Tieren und künstliche Vermehrung von Pflanzen mit möglicher Wiederauswilderung
- Sammeln von lebenden Organismen für Zoos, Aquarien und botanische Gärten zur Forschung und Bildung der Öffentlichkeit (Glowka *et al.*, 1994, S.52).

Bekannte und bedeutende *ex situ*-Einrichtungen sind viele zoologische und botanische Gärten sowie Tierparks und Wildgehege. Diese beherbergen nicht nur vom Aussterben bedrohte Tierarten, sondern schützen Exemplare zur Nachzucht und zur anschließenden Wiederauswilderung, wenn es notwendig und möglich ist. Die genannten Einrichtungen besitzen zudem einen großen Bildungswert, indem sie die Öffentlichkeit über den Gefährdungstatus der bedrohten Arten und über die Faktoren informieren, welche diese Arten in erster Linie bedrohen. Sie sind bemüht, das öffentliche Interesse daran zu wecken, jene Faktoren zu stoppen und umzukehren (allgemein hierzu: WAZA, 2005). Neben diesen

zählen auch, wie oben bereits erwähnt, Genbanken, inklusive Samen- oder Spermabanken, Embryonenbanken sowie Sammlungen von tierischen und pflanzlichen *in vitro*-Zelllinien und DNA zur *ex situ*-Erhaltung (Ryder, 1995, S.106; Glowka *et al.*, 1994, S. 52; World Resources Institute, 1992, S. 137). Diese Genbanken ermöglichen die Sammlung und Langzeitlagerung von biologischen Materialien unter Erhaltung derer Integrität über nahezu unbegrenzte Zeiträume für zukünftige Anwendungen, in den meisten Fällen durch die Lagerung der Proben bei extrem niedrigen Temperaturen.

Die *ex situ*-Erhaltung ist jedoch bei weitem nicht ausreichend, um Arten vor dem Aussterben zu schützen. Sie ist nur ein Baustein und sollte als supplementär zu *in situ*-Maßnahmen betrachtet werden. Gleichwohl spielen sie gerade im Hinblick auf die Unterstützung von *in situ*-Maßnahmen eine bedeutende und unverzichtbare Rolle. Gerade für die Erforschung von Komponenten der biologischen Vielfalt, die geschützt werden sollen, bietet die *ex situ*-Erhaltung hervorragende Möglichkeiten (Glowka *et al.*, 1994, S.52ff).

Ex situ-Erhaltung gefährdeter Tierarten in zoologischen Gärten

Ex situ-Maßnahmen zoologischer Gärten beschränken sich nicht auf die Erhaltung der Art als Anschauungsobjekt neugieriger Zoobesucher. Diese Annahme verzerrt die durchaus bedeutende Rolle vieler zoologischer Gärten hinsichtlich der Erhaltung biologischer Diversität. Zum Schutz der biologischen Diversität ist auch Öffentlichkeitsarbeit notwendig. Nur durch Kenntnis der Komplexität biologischer Systeme und des Verstehens ihrer Bedeutung für die Menschheit kann ein generelles Bewusstsein zum Naturschutz ermöglicht werden. Zoos haben durch die Nachbildung natürlicher Habitats eine besondere Möglichkeit, die Öffentlichkeit über ihre Umwelt und die verschiedenen Ebenen ihrer biologischen Variation zu informieren und damit zu bilden. Neben dieser grundlegenden Bedeutung für die Bildung der Allgemeinheit und von Nachwuchswissenschaftlern haben sich zoologische Gärten seit dem 18. Jahrhundert zu wissenschaftlichen Institutionen entwickelt, deren Forschung zu bedeutenden Erkenntnissen hinsichtlich des Verhaltens von Tieren, Wildtierkrankheiten und Pathogenen, der Endokrinologie, der Reproduktion und der Genetik hauptsächlich von gefährdeten Tierarten geführt hat. Gerade im Hinblick auf das Management von wilden Populationen gefährdeter Arten wären viele Freiland-Projekte ohne das erforderliche Wissen aus zoologischer Forschung nicht erfolgreich umsetzbar gewesen (Foose & Wiese, 2006; Lindburg *et al.*, 1993; Lindburg & Fitch-Snyder, 1994; Paine *et al.*, 1988). Weiterhin bilden sie eine Plattform zur Nachzucht gefährdeter Arten mit einer möglichen nachfolgenden Auswilderung.

Durch die Kooperation der internationalen Naturschutzunion (International Union for Conservation of Nature, IUCN) und der Zoogemeinschaft entstanden 1979 die Erhaltungszuchtspezialistengruppen (Conservation Breeding Specialist Groups; CBSG) als globales Netzwerk von bis jetzt 550 freiwilligen professionellen Wissenschaftlern. Diese bewirkten die Entwicklung von Möglichkeiten und Prozessen zum wissenschaftlichen Management von außerhalb ihres natürlichen Lebensraumes (*ex situ*) gehaltenen Tierpopulationen. Die zunehmende Bedrohung von Populationen wildlebender Tierarten führte zur Ausweitung des Aufgabenbereiches der CBSG's auf das Management kleiner Populationen gefährdeter Arten durch die Vernetzung von *in situ*- und *ex situ*-Experten (www.cbsg.org/cbsg/history/, Stand: 04.07.2008).

Die Erhaltungszucht (conservation breeding) wird auf europäischer Ebene umgesetzt durch die 1990 etablierten artspezifischen Europäischen Erhaltungszuchtprogramme (EEP), organisiert von der Europäischen Vereinigung von Zoos und Aquarien (EAZA). Vorreiter hierfür waren allerdings die von der US Amerikanischen Vereinigung Zoologischer Parks und Aquarien (AAZPA; heute Amerikanische Vereinigung von Zoos und Aquarien; AZA) 1982 etablierten "Species Survival Plans", kurz SSP (Conway, 1985). Diese beinhalten ein koordiniertes Management aller in Gefangenschaft lebenden Individuen, die von kooperierenden Institutionen gehalten werden. Von großer Bedeutung hierbei sind die sogenannten Zuchtbücher (engl. studbooks, Computergestützte Datensätze mit Angaben zur Lebensgeschichte und zum Stammbaum von Individuen), die Informationen darüber liefern, welche Individuen zur Nachzucht eingesetzt werden sollen (Frankham *et al.*, 2005, S. 421f). Nicht zu vergessen sind an dieser Stelle auch viele Zuchtprogramme gefährdeter Tierarten in Privathänden. Die Vielzahl von Arten, und auch das Risiko von Zuchtprogrammen in zoologischen Gärten, macht solche privaten Aktivitäten sinnvoll. Doch sollten sie koordinierend in die kontrollierten Zuchtprogramme integriert werden.

Genbanken zoogenetischer Ressourcen

Genbanken (Genome Resource Banks, GRBs) sind Lager von systematisch gesammelten Gameten (Keimzellen wie Spermien und Oozyten), Embryonen, Blutproben, Gewebeproben, somatischen Zelllinien, Stammzellen und DNA zum Zwecke der Sicherung genetischen Materials für Erhaltungsprogramme und die damit verbundene Forschung. Sie können somit als bedeutende Schnittstelle zwischen *in situ*- und *ex situ*-Maßnahmen betrachtet werden (Holt & Pickard, 1999; Wildt *et al.*, 1997). Primäres Ziel ist die Sammlung und Lagerung von so vielen biologischen Materialien gefährdeter Arten wie möglich, bevor es zu einem weiteren Verlust an genetischer Diversität kommt. Dieses Konzept ist bei weitem nicht neu

und wurde hauptsächlich aus ökonomischen Gründen im Bereich der Nutztier- und Pflanzenzucht vorangetrieben. Ziel hierbei war es, die Zucht von immer produktiveren Tier- und Pflanzenarten voranzutreiben, um so eine sichere Quelle an Lebensmitteln zu gewährleisten. Somit wurden die ersten Genbanken hauptsächlich im Bereich der Landwirtschaft etabliert.

Die seit Jahrzehnten erprobte Lagerung von Spermien gefährdeter Tierarten sichert z.B. die Erhaltung der genetischen Variabilität, wie einleitend erwähnt, durch das Einbringen von neuem genetischem Material in Populationen durch Anwendung der künstlichen Befruchtung. Ein ähnliches Potential wird inzwischen adulten Stammzellen zugesprochen (Leon-Quinto *et al.*, 2009). Wie ebenfalls bereits einleitend erklärt wurde, ist es von größter Relevanz, nicht nur Spermien zu konservieren, sondern auch andere Zelltypen wie Oozyten, somatische Zellen, Stammzellen oder Gewebeproben.

Generell gilt, dass Genome Ressource Banken wichtige Werkzeuge zum Austausch genetischer Informationen zwischen Populationen gefährdeter Arten sind und durch die Anlage eines globalen Genpools die Möglichkeit bieten, Populationen zu überwachen und zu steuern (Hanks, 2001).

Ebenso wird das gelagerte biologische Material als eine Art Versicherungspolice im Falle einer schweren Katastrophe betrachtet. Beispielhaft kann hier auf die Kernschmelze von 1986 des sich in Tschernobyl befindlichen Kernkraftwerkes verwiesen werden (Andrabi & Maxwell, 2007). Auch der Bürgerkrieg der 90er Jahre in Ruanda führte dazu, dass zahlreiche Großsäuger im Akagera Nationalpark getötet wurden (Kanyamibwa, 1998).

Momentan bekannte weltweite Genbankprojekte sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Juristische Implikationen

Tabelle 1: Überblick über momentan bestehende Gen-Banken zoogenetischer Ressourcen.

Genome Ressource Bank	Lokalität
Ambrose Monell Laboratory, American Museum of Natural History	New York, USA
Animal Gene Storage Resource Centre, Monash University	Melbourne, Australien
Antwerp Zoo	Antwerpen, Belgien
Centre for Cellular and Molecular Biology	Hyderabad, Indien
Centre for Reproduction of Endangered Species, The Zoological Society of San Diego	Kalifornien, USA
Cheetah Conservation Fund	Otjiwarongo, Namibia
Conservation and Research Centre, National Zoological Park, Smithsonian Institution	Virginia, USA
Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife, Seoul National University, College of Veterinary Medicine	Seoul, Süd Korea
Cryobiology Research Group, Institute of Research in the Applied Natural Sciences, The University of Luton	Luton, UK
Cryo-Brehm, Fraunhofer Institute for Biomedical Engineering	Sulzbach, Deutschland
Experimental de Zonas Aridas	Almeria, Spanien
Giant Panda Breeding and Research Base	Chengdu, China
King Khalid Wildlife Breeding Research Centre	Thumamah, Saudi Arabien
Museum of Natural History	London, UK
Museum National d'Histoire Naturelle	Paris, Frankreich
North of England Zoological Society	Chester, UK
Reproduction Biology Research Group, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research	Berlin, Deutschland
School of Biology, The University of Nottingham	Nottingham, UK
Metro Toronto Zoo	Toronto, Kanada
University of Sassari	Sardinia, Italien
Wildlife Biological Resource Centre, Endangered Wildlife Trust	Pretoria, Süd Afrika
White Oak Conservation Center	Florida, USA
Zoological Park of Buenos Aires	Buenos Aires, Argentinien
Zoological Society of London	London, UK

Je nach Konzeption birgt die Lagerung der unterschiedlichen Probearten enorme Probleme, wodurch die Art der Lagerung oft für jede in Frage kommende Art neu konzipiert werden muss. Grund hierfür sind die unterschiedlichen artspezifischen Eigenschaften der zu konservierenden biologischen Materialien (Watson & Holt, 2001). Beispiele für Tierarten, für die spezifische GBR's eingerichtet wurden, sind u.a. das europäische Muflon (*Ovis orientalis musimon*, Ptak *et al.*, 2002), der gefährdete Schwarzfußiltis (*Mustela nigripes*, Howard *et al.*,

1991), der kleine Panda (*Ailurus fulgens*, Wild et al. 1997), das Bison (*Bison bonasus*, Sipko et al., 1997), der Tiger (*Panthera tigris*, Wildt et al., 1995) und die nordafrikanische Gazelle (*Gazella dama mhorr*, Holt et al., 1996a).

Auch für die biologische Forschung haben sich Genbanken als zwischenzeitlich unverzichtbar erwiesen. Hauptsächlich für die medizinische Forschung an Modelltieren wie Maus, Ratte, Hamster, Katze und Hund wurde bereits eine Vielzahl von Genbanken angelegt. Durch die Möglichkeit, neue Gene in Embryonen einzuschleusen und somit diese Tiermodelle genetisch zu verändern, resultieren tausende neuer Tiermodelle, die zum biologisch-medizinischen Erkenntnisgewinn von größter Bedeutung sind. Um dieses Potential zu sichern, werden hauptsächlich Spermien, Eizellen und Embryonen dieser Modelle mittels Kryokonservierung gelagert. Die Lagerung solcher Genotypen dient vor allem dazu, dass eine Langzeitverfügbarkeit gleicher Modelltiere für Forschungszwecke zur Verfügung steht, um sicherzustellen, dass Wissenschaftler mit einheitlichen Tiermodellen arbeiten. Dies ist von enormer Relevanz, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Auch hinsichtlich Mikroorganismen, wie Viren, Bakterien, aber auch Pilzen, gibt es bereits seit Jahrzehnten Genbanken, die vor allem für die biomedizinische und pharmazeutische Industrie von Bedeutung sind.

3. Internationale Rechtslage

Obige Ausführungen belegen, dass auf internationaler Ebene die *ex situ*-Erhaltung von gefährdeten Arten durchaus als notwendige Methode zur Unterstützung von *in situ*-Maßnahmen längst anerkannt ist. Art. 9 lit a, b CBD fordert die Vertragsparteien auf, auf nationaler Ebene Maßnahmen zur *ex situ*-Erhaltung zu ergreifen und auch Einrichtungen für die *ex situ*-Erhaltung und die damit assoziierte Forschung zu schaffen und zu unterhalten. Von besonderem Belang für die Sammlung und Lagerung von zoogenetischen Materialien gefährdeter Tierarten in Genbanken im Rahmen solcher *ex situ*-Maßnahmen sind Regelungen zum Zugang zu diesen Ressourcen und weiterhin die Möglichkeiten des Austausches von Proben zur wissenschaftlichen Forschung, gegebenenfalls auch zur kommerziellen Nutzung.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden zum Schutz der biologischen Diversität und somit auch zum Schutz einzelner Tier- und Pflanzenarten internationale Übereinkommen ratifiziert (CBD, CITES), die Vorgaben hinsichtlich der Regulierung des Zugangs, der Nutzung und auch des Handels mit gefährdeten Arten definieren. Von Eigentumsrechten an solchen Proben und der Möglichkeit der Patentanmeldung von gewonnenen Proben oder erzeugten Derivaten abgesehen, sind das CBD und das CITES Übereinkommen von grundlegender Bedeutung. Sie werden im Folgenden hinsichtlich des Betriebes einer Genbank diskutiert.

3.1 Das Übereinkommen über die biologische Vielfalt (Convention on Biological Diversity, CBD)

Historischer Abriss

Zwanzig Jahre nach der ersten globalen UN-Umweltkonferenz 1972 in Stockholm fand am 14. Juni 1992 in Rio de Janeiro (Brasilien) die UN-Konferenz über Umwelt und Entwicklung (United Nation Conference on Environment and Development, UNCED, auch genannt Earth Summit) statt. Um Lösungen für globale Fragen wie Armut, Krieg, Hunger und die ständig sich weiter ausdehnende soziale Kluft zwischen Industrie- und Entwicklungsländern zu diskutieren, versammelten sich 17000 Teilnehmer, unter denen Regierungsvertreter von 178 Ländern anwesend waren. Im Vordergrund stand die "nachhaltige Entwicklung" und deren Anwendung, womit eine Entlastung der globalen Ökosysteme angestrebt werden sollte. Unter dem Schirm der nachhaltigen Entwicklung erzielte die UNCED beeindruckende Ergebnisse hinsichtlich des globalen Umweltschutzes. Eines der bedeutendsten Ergebnisse war die Verabschiedung des Übereinkommens über die biologische Vielfalt.

Dierßen und Huckauf (2008) beschreiben das Übereinkommen wie folgt:

"Sie ist das erste völkerrechtlich verbindliche Abkommen, das den Schutz der Biodiversität global umfassend behandelt, und sie zielt auf die Erhaltung der biologischen Vielfalt gleichermaßen von Ökosystemen, deren Arten beziehungsweise auf die ihren Populationen eigene genetische Variabilität. Gleichzeitig soll die Konvention eine nachhaltige Nutzung von Teilen der biologischen Vielfalt sowie eine ausgewogene und gerechte Aufteilung der sich aus der Nutzung genetischer Ressourcen ergebenden Vorteile sichern." (Dierßen & Huckauf, 2008, S.6).

Die Parteien des Übereinkommens über die biologische Diversität stimmten mit der Unterzeichnung folgenden Punkten zu:

- Erhaltung der maximal möglichen biologischen Diversität zum Nutzen jetziger und zukünftiger Generationen und wegen ihres intrinsischen Wertes.
- Die biologische Diversität ist essentiell für die Evolution und die Erhaltung lebensunterstützender Systeme der Biosphäre.
- Mangel an kompletter wissenschaftlicher Sicherheit darf nicht als Grund zur Verzögerung weiterer Handlungen zur Vermeidung oder zur Minimierung von Belastungen der biologischen Diversität gesehen werden.
- Die Betonung muss auf die *in situ*-Erhaltung von Ökosystemen und natürlichen Gemeinschaften gelegt werden und auf die Erhaltung lebensfähiger Populationen in ihrer natürlichen Umwelt.

- *Ex situ*-Erhaltungsmaßnahmen spielen durchaus eine bedeutende Rolle für die Erhaltung, allerdings sollten sie bevorzugt im Ursprungsland umgesetzt werden.
- Etablierung eines Systems geschützter Gebiete oder Gebiete, in denen spezielle Maßnahmen unternommen werden müssen, um die biologische Diversität zu schützen (*in situ*-Erhaltung).
- Einführung von Maßnahmen für die *ex situ*-Erhaltung von Komponenten der biologischen Diversität, vorzugsweise im Ursprungsland solcher Komponenten.

Neben der Konvention über die biologische Vielfalt wurden die Agenda-21, die Rio-Erklärung über Umwelt und Entwicklung, die Klimarahmenkonvention und die Wüstenkonvention am 14. Juni 1992 in Rio de Janeiro verabschiedet (allgemein zur CBD: Stoll, 2004, S. 73ff; Wolfrum, 2004, S.18ff). Die Bundesrepublik Deutschland stimmte am 30. August 1993 dem Übereinkommen über die biologische Diversität durch die Verabschiedung des Gesetzes zu dem Übereinkommen vom 5. Juni 1992 über die biologische Vielfalt zu (BGBl 1993 Teil II, S. 1741).

Die meisten der 42 Artikel des Übereinkommens über die biologische Diversität betreffen rechtliche, technische, finanzielle und administrative Details. Art. 8, 9 und 10 CBD jedoch liefern Richtlinien zur *in situ*- und *ex situ*-Erhaltung und zur nachhaltigen Nutzung von Teilen der biologischen Diversität. Art. 15 und 16 CBD sind von größter Relevanz hinsichtlich der Nutzung genetischer Ressourcen, da sie Richtlinien zum Zugang zu genetischen Ressourcen und Technologien festlegen. Art. 19 CBD definiert anschließend Richtlinien zum Umgang mit Biotechnologien und der Verteilung der daraus entstehenden Vorteile. Alle genannten Artikel spielen im Hinblick auf die Sammlung und Lagerung von zoogenetischen Ressourcen in Genbanken eine bedeutende Rolle und werden somit, nach Betrachtung der Ziele der Konvention und der Auseinandersetzung mit einigen Definitionen zum besseren Verständnis, in den folgenden Kapiteln eingehender betrachtet. Im Vordergrund der Auseinandersetzungen soll jedoch die Frage stehen, inwiefern sowohl der Zugang zu genetischen Ressourcen, welche in *ex situ*-Genbanken konserviert sind oder noch gelagert werden, als auch der Ausgleich der durch den Nutzen dieser Ressourcen entstandenen Vorteile durch das Übereinkommen geregelt werden. Gerade im Hinblick auf genetische Ressourcen, die nicht im Einklang oder vor Inkrafttreten des CBD erworben wurden, stellt dies eine besondere Herausforderung an den Gesetzgeber dar und berührt die Rechtsprechung auf völkerrechtlicher und nationaler Ebene.

3.1.1 Ziele der Konvention

Ziele des Übereinkommens sind die Erhaltung der biologischen Vielfalt, die nachhaltige Nutzung ihrer Bestandteile und die ausgewogene und gerechte Aufteilung der sich aus der Nutzung der genetischen Ressourcen ergebenden Vorteile (Art. 1 CBD). Letzteres soll vor allem durch den angemessenen Zugang zu genetischen Ressourcen und die angemessene Weitergabe der einschlägigen Technologien unter Berücksichtigung aller Rechte an diesen Ressourcen und Technologien sowie durch angemessene Finanzierung geschehen.

Bereits in Erwägung zwei der Präambel der CBD wird die Erhaltung der biologischen Vielfalt von den Vertragsparteien als gemeinsames menschliches Anliegen dargestellt. Sämtliche Vertragsparteien sollen sich zusammenschließen, um dieses gemeinsame Erbe zu schützen und zu erhalten. Durch diese Forderung zur gegenseitigen Unterstützung wird deutlich, dass die in Art. 1 CBD aufgeführte Bestimmung der Gewährung des Zugangs zu genetischen Ressourcen im Austausch gegen die Weitergabe von technologischem Wissen, unter Berücksichtigung aller Rechte, sowohl den Interessen der entwickelten Länder als auch der sich entwickelnden Länder Rechnung getragen wird. Die Forderung zur Zusammenarbeit der Vertragsparteien wird schließlich durch Art. 5 CBD ausgeweitet auf Gebiete außerhalb der nationalen Hoheitsbereiche und auf andere Angelegenheiten von gemeinsamem Interesse.

3.1.2 Geltungsbereich der Konvention

Das CBD stellt ein Rahmenwerk auf völkerrechtlicher Ebene dar, das auf die Entwicklung von rechtlichen, politischen und wissenschaftlichen Initiativen hinsichtlich des Schutzes der biologischen Diversität abzielt. Diesbezüglich ist das CBD übergreifend und deckt alle Komponenten der biologischen Diversität ab, von Ökosystemen und Habitaten bis hin zu Artengemeinschaften, Arten, Genomen und einzelnen Genen. Berücksichtigt wird nicht nur die Erhaltung der biologischen Diversität durch die Forderung von *in situ*- und *ex situ*-Maßnahmen (Art. 8 u. 9 CBD), sondern auch die nachhaltige Nutzung der biologischen Diversität und ein gerechter und ausgewogener Vorteilsausgleich der aus dieser Nutzung resultierenden Vorteile (Art. 15, 16, 19 CBD). Da jedoch Nutzer der biologischen Diversität sowohl natürliche als auch juristische Personen oder Institutionen des öffentlichen Sektors und auch des privaten Sektors sein können, ist es von großer Bedeutung, an dieser Stelle den Geltungsbereich des CBD näher zu betrachten.

Für jede Vertragspartei finden generell die Bestimmungen der CBD Anwendung auf Bestandteile der biologischen Vielfalt in Gebieten, die innerhalb ihres nationalen

Hoheitsgebietes liegen (Art. 4 lit. a CBD). Im Hinblick auf Verfahren und Tätigkeiten, die unter die Hoheitsgewalt oder die Kontrolle einer Vertragspartei fallen, finden die Bestimmungen des CBD auch dann Anwendung, wenn diese außerhalb der nationalen Hoheitsbereiche stattfinden, unabhängig davon, wo sie sich auswirken (Art. 4 lit. b CBD).

Art. 35 Abs.1 CBD bestimmt, dass das Übereinkommen Staaten und Organisationen der regionalen Wirtschaftsintegration zum Beitritt offen steht. Dadurch gelten die etablierten Rechte und Verantwortungen bei erster Betrachtung unter den Vertragsparteien. Sie gelten nicht für private Einzelpersonen. Institutionen, die Regierungsfunktionen von Ländern ausüben, die das CBD unterzeichnet haben, sind jedoch an die Bestimmungen der CBD gebunden. Auch können öffentliche Institutionen wie Universitäten, Genbanken, botanische und zoologische Gärten an die Bestimmungen gebunden sein, abhängig von Bestimmungen des nationalen Rechts und dem Ausmaß, zu welchem sie auf öffentliche Finanzierungen und Zuwendungen angewiesen sind, die eine Einhaltung des öffentlichen Rechts und Regelwerkes erfordern (Kate & Laird, 2002, S.14). Wie oben bereits erörtert, gelten die Bestimmungen nicht für private Einzelpersonen, dies jedoch nur, solange keine Gesetze und Regelungen durch nationales Recht eingeführt wurden, die dies fordern. Private Organisationen sind an nationale Zugangsregelungen von Vertragsparteien gebunden, wenn sie aus dem Land einer Vertragspartei genetische Ressourcen entnehmen, auch wenn ihre eigene Regierung Vertragspartei des CBD ist, und auch wenn diese keine Gesetzgebung eingeführt oder umgesetzt hat (Kate & Laird, 2002, S.14).

3.1.3 Definition der Begriffe "biologische Vielfalt", "biologisches Material", "biologische Ressourcen" und "genetische Ressourcen" nach CBD

Art. 2 CBD dient der Begriffsbestimmung. Um ein besseres Verständnis der Tragweite dieses Übereinkommens zu erlangen, ist es notwendig, vorab einige der in ihr enthaltenen Begriffsdefinitionen näher zu betrachten.

"Biologische Vielfalt" wird definiert als *"die Variabilität unter lebenden Organismen jeglicher Herkunft, darunter unter anderem Land-, Meeres- und sonstige aquatische Ökosysteme und die ökologischen Komplexe, zu denen sie gehören; dies umfaßt die Vielfalt innerhalb der Arten und zwischen den Arten und die Vielfalt der Ökosysteme"* (Art. 2 Erw. 2 CBD). Hierbei wird deutlich, dass nicht nur die Diversität von Arten gemeint ist, sondern vielmehr die Gesamtheit an Variationen lebender Systeme: Von der genetischen Diversität innerhalb einer Art, zwischen den Arten bis hin zur Vielfalt innerhalb und zwischen Ökosystemen.

"Genetisches Material" wird definiert als "*jedes Material pflanzlichen, tierischen oder mikrobiellen oder sonstigen Ursprungs, das funktionale Erbinheiten enthält*" (Art. 2 Erw. 8 CBD).

In Art. 2 Erw. 1 CBD werden "biologische Ressourcen" definiert als "*genetische Ressourcen, Organismen oder Teile davon, Populationen*" oder andere biotische Bestandteile von Ökosystemen, "*die einen tatsächlichen oder potentiellen Nutzen oder Wert für die Menschheit haben*". Somit werden mit dem Begriff der biologischen Ressource verschiedene hierarchische Ebenen biologischer Systeme zusammengefasst. Einbezogen wird jegliche Form genetischer Materialien, somit DNA, Zellen und Zellverbände sowie Gewebe, ganze Individuen und Populationen sowie "andere biotische Bestandteile von Ökosystemen", womit auch Organismen- und Artengruppen integriert sind. Die Terminologie "tatsächlichen oder potentiellen Nutzen oder Wert für die Menschheit" impliziert ferner eine weitere Eingrenzung im Hinblick auf eine menschliche Zweckbestimmung und Nützlichkeitsabwägung (Wolfrum, 2004, S. 24).

"Genetische Ressource" wird in Artikel 2 Erw. 6 CBD definiert als "genetisches Material von tatsächlichem oder potentielltem Wert", unabhängig davon, ob es sich um Populationen wilder oder domestizierter Arten handelt oder solcher, die aus *ex situ*-Quellen entnommen werden können (Wolfrum, 2004, S. 22). Sie sind somit ein Bestandteil der biologischen Ressourcen. Wie im Hinblick auf die Definition des Begriffes "biologische Ressourcen" wird auch hier darauf verwiesen, dass immer eine Wertigkeit vorhanden sein muss, entweder eine tatsächliche oder eine potentielle, um durch die Konvention berücksichtigt zu werden. Da in beiden Fällen jedoch auch auf den potentiellen Wert eines Materials verwiesen wird, werden auch solche genetischen Materialien unter den Schutz der Konvention gestellt, deren Bedeutung für die Menschheit aufgrund mangelnder wissenschaftlicher Kenntnisse nicht klar erkennbar ist. Dies trifft letztendlich auf jede Art genetischer Materialien zu, die zum Zeitpunkt des Inkrafttretens der CBD wissenschaftlich nicht bekannt, untersucht oder in ähnlicher Weise beschrieben wurde, so dass ein Wert ableitbar wäre.

3.1.4 Die Strategien zur Erhaltung der biologischen Diversität im Kontext des CBD

Zum Erhalt biologischer Ressourcen stehen, wie bereits oben näher erläutert, zwei grundlegende Möglichkeiten zur Verfügung. Die sogenannte *in situ*-Erhaltung sowie die *ex situ*-Erhaltung. Beide werden sowohl von Naturschutzbiologen als auch Agrarwissenschaftlern als sich gegenseitig ergänzende Maßnahmen betrachtet (Plucknett & Horne, 1992).

3.1.4.1 *In situ*-Erhaltung und CBD

Die *in situ*-Erhaltung ist nach Art. 2 Erw. 11 CBD definiert als "*die Erhaltung von Ökosystemen und natürlichen Lebensräumen sowie die Bewahrung und Wiederherstellung lebensfähiger Populationen von Arten in ihrer natürlichen Umgebung und - im Falle domestizierter oder gezüchteter Arten - in der Umgebung, in der sie ihre besonderen Eigenschaften entwickelt haben*". Somit soll zum einen gewährleistet werden, dass Arten durch den Schutz ihrer Habitate in ihrem natürlichen Lebensraum erhalten bleiben, natürliche Evolutionsprozesse durchlaufen können und somit in ihrer gesamten, auch innerartlichen genetischen Variabilität erhalten bleiben. Zudem sollen über den Schutz von Ökosystemen und Lebensräumen hinaus lebensfähige Populationen bewahrt und - bei bereits eingetretenem Populationsrückgang, der die Überlebenswahrscheinlichkeit der Population nicht gewährleistet - auch wiederhergestellt werden.

Grundsätzlich gilt es jedoch, zwischen den Beweggründen zu unterscheiden, aus denen die *in situ*-Erhaltung angewandt wird. Hierbei ist zu unterscheiden zwischen einem ökosystemaren Ansatz, der die Bewahrung des Ökosystems fokussiert, und einem individuellen Ansatz (auch Artenansatz), der den Schutz von Populationen oder Arten in ihrer natürlichen oder naturnahen Lebensform forciert (Wolfrum, 2004, S. 24f).

Die *in situ*-Erhaltung wird allgemein als die zu bevorzugende Maßnahme betrachtet. Dies wird vor allem auch durch die Präambel des Übereinkommens über die biologische Vielfalt deutlich:

"[...] die Grundvoraussetzung für die Erhaltung der biologischen Vielfalt besteht darin, die Ökosysteme und natürlichen Lebensräume in situ zu erhalten und lebensfähige Populationen von Arten in ihrer Umgebung zu bewahren und wiederherzustellen."

3.1.4.2 Die *in situ*-Erhaltung nach Art. 8 CBD

In welcher Form die *in situ*-Erhaltung im Rahmen des CBD umgesetzt werden soll, regelt Art. 8 CBD. Da sich diese Abhandlung jedoch generell auf die *ex situ*-Erhaltung und daher speziell auf die Sammlung und Lagerung von zoogenetischen Ressourcen in Genbanken als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität konzentriert, soll an dieser Stelle nur auf Art. 8 CBD verwiesen werden.

Hervorzuheben ist jedoch Art. 8 Abs. f, der eine Sanierung, Wiederherstellung und Regeneration beeinträchtigter Ökosysteme fordert. Gerade für diese Zwecke ist es grundlegend notwendig, die Möglichkeit zu haben, auf genetische Informationen, die in *ex situ*-Sammlungen bereitgehalten werden, zurückgreifen zu können. Somit wird an dieser Stelle schon deutlich, dass generell ein integrativer Ansatz verfolgt wird, der sowohl den Einsatz von *in situ*-Maßnahmen als auch unterstützenden *ex situ*-Maßnahmen verlangt.

3.1.4.3 Die *ex situ*-Erhaltung und das CBD: Bedeutung für den Betrieb von Genbanken zoogenetischer Ressourcen

Die *ex situ*-Erhaltung ist im Gegensatz zur *in situ*-Erhaltung ausgerichtet auf Komponenten der biologischen Diversität, weniger auf ganze Systeme biologischer Vielfalt. Sie ist laut Art. 2 CBD definiert als "*die Erhaltung von Bestandteilen der biologischen Vielfalt außerhalb ihrer natürlichen Lebensräume*". Sie beinhaltet sämtliche Möglichkeiten der Erhaltung von Bestandteilen der biologischen Vielfalt, die nicht an den ursprünglichen Lebensraum der Art gebunden sind. Somit zählen hierzu zum einen das Sammeln und Verwahren von lebenden Organismen für botanische und zoologische Gärten und Genbanken, zum anderen das Sammeln zur Forschung und zur öffentlichen Bildung, solange dies zum Schutz der Arten beiträgt (Wolfrum, 2004, S.25).

Das CBD betrachtet die *ex situ*-Erhaltung als komplementär, nicht also als Ersatz der *in situ*-Erhaltung biologischer und genetischer Diversität (Glowka *et al.*, 1994, S. 52; Keller *et al.*, 2002, S. 15; Wolfrum, 2004, S.25).

Auch das Potential der *ex situ*-Erhaltung zur Ergänzung von *in situ*-Maßnahmen wird bereits im Vorwort des Übereinkommens betont, da "*ex situ*-Maßnahmen [...] ebenfalls eine wichtige Rolle spielen" (Päambel Erwägung 8 CBD).

3.1.4.4 Die *ex situ*-Erhaltung nach Art. 9 CBD

Wie oben bereits angeführt, stellt die *ex situ*-Erhaltung eine bedeutende Ergänzungsmöglichkeit der *in situ*-Erhaltung dar. Art. 9 CBD definiert die *ex situ*-Erhaltung ebenfalls in erster Linie als Ergänzung von *in situ*-Maßnahmen und regelt in dieser Hinsicht Maßnahmen, die von den Vertragsparteien zu ergreifen sind. Hinsichtlich der Umsetzung von Maßnahmen zur *ex situ*-Erhaltung von Bestandteilen der biologischen Vielfalt wird betont, dass diese vorzugsweise im Ursprungsland der Bestandteile umzusetzen sind. Dies ist von großer Bedeutung, da historisch gesehen die meisten *ex situ*-Maßnahmen nicht in den Ursprungsländern, sondern in weit entfernten Ländern umgesetzt wurden. Letztlich ist dies auch auf einen Mangel an adäquaten Einrichtungen, geschultem Personal und fehlenden finanziellen Mitteln zurückzuführen (Glowka *et al.*, 1994, S.53). So fordert Art. 9 lit a und b CBD die Schaffung und Unterhaltung von Einrichtungen vorzugsweise im Ursprungsland der genetischen Ressource, welche die *ex situ*-Erhaltung und vor allem das Forschen im Hinblick auf Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen ermöglichen. Die in Verbindung mit *ex situ*-Einrichtungen genannte Forschung kann zwei Ziele verfolgen: Zum einen die Forschung zur Verbesserung von *ex situ*-Maßnahmen an sich (Sammlungstechniken, Lagertechniken, Regenerationstechniken, Entwicklung von Informationssystemen etc.), zum anderen kann sie aber auch gezielt auf die Erforschung der genetischen Ressource (Charakterisierung, Anwendungspotential etc.) ausgerichtet sein, wodurch ein besseres Verständnis für diese erlangt wird, was sicherlich zur Erhaltung der Art beiträgt. Auch diese Aspekte kommen in Art. 9 lit. b CBD zum Ausdruck. Ferner kann durch die Erforschung des gelagerten Materials dieses einen Wert erlangen, der letztlich unter Berücksichtigung weiterer rechtlicher Regulierungen (z.B. CITES) auch kommerziell handelbar sein kann. Kommerzielle Zahlungen für den Zugang zu den gelagerten Ressourcen könnten dann zum weiteren Ausbau und zur Unterstützung der Einrichtung verwandt werden (Glowka *et al.*, 1994, S. 54).

Die Verwendung der Terminologie "vorzugsweise im Ursprungsland" signalisiert an dieser Stelle nochmals, dass jeder Vertragsstaat seine eigenen Einrichtungen zur *ex situ*-Erhaltung von genetischen Ressourcen haben sollte (Glowka *et al.*, 1994, S.53). Für einige Mitgliedstaaten mag dies mangels finanzieller Mittel sicher ein sehr unrealistisches Ziel sein. Ebenso deutet die Verwendung des Begriffes "vorzugsweise" darauf hin, dass hier keine eindeutige Forderung zur Umsetzung von *ex situ*-Projekten im Ursprungsland besteht. Somit bleibt für die Vertragspartner offen, unter welchen Bedingungen *ex situ*-Maßnahmen zur Erforschung und Erhaltung gefährdeter Arten auch anderweitig umgesetzt werden können oder sogar müssen. Folglich wäre es durchaus möglich, dass *ex situ*-Einrichtungen benachbarter Staaten oder solcher Staaten, welche finanziell dazu in der Lage sind, und solcher, die diese finanziellen Anforderungen nicht erbringen können, gemeinsam und somit

auch fernab des Ursprungslandes *ex situ*-Maßnahmen umgesetzt werden können, um Kosten und Expertisen zu teilen (vgl. Glowka *et al.*, 1994, S. 53). Hierzu bedarf es dann jedoch der Ausarbeitung ergänzender rechtsverbindlicher Arrangements zwischen den beteiligten Staaten zur Sicherung der Zugangsrechte zu den Ressourcen und bezüglich der gerechten Aufteilung der aus ihrer Nutzung entstandenen Vorteile.

In Art. 9 lit. c CBD werden die Vertragsstaaten dazu aufgefordert, gezielt Maßnahmen zu ergreifen, welche die Regenerierung und Förderung gefährdeter Arten sowie deren Wiedereinführung in ihren natürlichen Lebensraum unter geeigneten Bedingungen ermöglichen. Wie und wo diese umgesetzt werden, unterliegt, wie oben gezeigt, der Interpretation des Art. 9 lit. a und b CBD. Die Aufforderung zum gezielten Ergreifen von Maßnahmen zur Regenerierung und Förderung gefährdeter Arten zeigt das Bewusstsein, dass viele Arten eines integrierten Ansatzes bedürfen, der sowohl *in situ*- als auch *ex situ*-Erhaltungstechniken beinhaltet. Art. 9 lit. c CBD unterstützt somit Art. 8 lit. f (Sanierung und Wiederherstellung von beeinträchtigten Ökosystemen und Regenerierung gefährdeter Arten durch *in situ*-Maßnahmen) und drückt nochmals aus, dass ein grundlegender Aspekt zum Aufbau von *ex situ*-Einrichtungen die Förderung der Erholung bedrohter Arten ist. Wichtiger ist jedoch der deutliche Hinweis darauf, dass das ultimative Ziel der *ex situ*-Erhaltung immer die Rückführung der Arten in ihre natürlichen Habitate sein soll (Glowka *et al.*, 1994, S. 54). Hierdurch soll vermieden werden, dass *ex situ*-Maßnahmen angewandt werden, um eine anderweitige Landnutzung des ursprünglichen Habitates zu ermöglichen.

Die Entnahme von biologischen Ressourcen für Zwecke der *ex situ*-Erhaltung ist von jeder Vertragspartei so zu regeln und zu beaufsichtigen, dass Ökosysteme und *in situ*-Populationen von Arten nicht gefährdet werden. Eine Ausnahme ist nur dann möglich, wenn nach Art. 9 lit. c CBD besondere vorübergehende *ex situ*-Maßnahmen notwendig sind, um die Erhaltung einer oder mehrerer Arten zu gewährleisten (Art. 9 lit. d CBD). Ziel ist insbesondere das Risiko einer genetischen Erosion und somit einen Verlust an genetischer Vielfalt durch die Entnahme von Exemplaren aus der Wildnis zu minimieren.

Zur Umsetzung der in Art. 9 lit. a-d CBD aufgeführten Maßnahmen werden die Vertragsparteien in Art. 9 lit. e CBD dazu verpflichtet, bei der Bereitstellung finanzieller und sonstiger Unterstützungen sowie bei der Schaffung und Unterhaltung von Einrichtungen in Entwicklungsländern zusammenzuarbeiten. Dies ist unter Berücksichtigung weiterer Artikel des Übereinkommens zu interpretieren, wonach diese Zusammenarbeit auch durch die Unterstützung von Forschung, Schulung von Personal (Art. 12 CBD), Aufklärung und Bewusstseinsbildung in der Öffentlichkeit (Art. 13 CBD) oder des technischen Informationsaustauschs zustande kommen kann (Glowka *et al.*, 1994, S. 55).

Zusammenfassend ist im Hinblick auf Art. 9 nochmals zu betonen, dass die Konvention anerkennt, dass die *ex situ*-Erhaltung keine Alternative zur *in situ*-Erhaltung ist, aber sie

repräsentiert das Bewusstsein, dass sich menschliche Pläne, Einstellungen und Werte ändern können. Beide Maßnahmen, *in situ* und *ex situ*, können durch natürliche Katastrophen, zivile Unruhen und Kriege, unzureichende finanzielle Ressourcen und andere Ursachen menschlicher Notlagen gefährdet sein. Um dem Verlust an biologischer Diversität durch anthropogene und natürliche Einwirkungen entgegenzuwirken, bedarf es einer größtmöglichen Diversifizierung von Erhaltungsmaßnahmen, welche auch die Vernetzung von *in situ*- und *ex situ*-Maßnahmen beinhaltet. Eine jetzige Limitierung von Erhaltungsmöglichkeiten könnte für zukünftige Generationen unvorhersehbare negative Folgen haben (Glowka *et al.*, 1994, S.52 ; Ryder, 1995, S. 108).

3.1.5 Das CBD als Schlüssel zum Zugang zu genetischen Ressourcen

Ein politisch sehr bedeutender Punkt, den letztlich alle Vertragsparteien berücksichtigen müssen, ist die Frage des Zugangs zu genetischen Ressourcen, die in *ex situ*-Genbanken konserviert werden sollen, und die Aufteilung der sich aus der nachfolgenden Nutzung ergebenden Vorteile (Access and Benefit Sharing, ABS). Hier stellt sich bereits die Frage, wer letztlich Eigentümer der erworbenen und gelagerten Proben ist, betrachtet man die unterschiedlichen Möglichkeiten von internationalen Genbanken. Dies können Genbanken sein, deren Ziel die Lagerung und Bereithaltung von Proben zum Vorteil der globalen Gemeinschaft ist, nationale Genbanken, die das Ziel verfolgen, lokal bedeutende Arten zu erhalten, aber auch private Genbanken, die je nach Hintergrund verschiedene Arten, möglicherweise zur kommerziellen Nutzung, kryokonserviert gelagert halten. Ein Problem stellt dies vor allem für Exemplare dar, die nicht in Übereinstimmung mit dem CBD oder vor dessen Inkrafttreten erworben wurden (Glowka *et al.*, 1994, S. 53).

Dass es auch gerade im Hinblick auf den Zugang zu genetischen Ressourcen und deren nachfolgende Nutzung immer wieder zur ungerechten Aufteilung der aus dem Nutzen entstandenen Vorteile kommt, belegt eine Vielzahl von Beispielen, die bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurden (vgl. hierzu Lochen, 2007, S.16ff; Spranger, 2008, S.19ff). Im Folgenden sollen die Zugangsbestimmungen, die durch Art. 15 CBD definiert werden, sowie die sich anschließenden Bestimmungen zum Vorteilsausgleich (Art. 16 und 19 CBD) näher betrachtet werden.

3.1.5.1 Zugang zu genetischen Ressourcen im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank zoogenetischer Ressourcen (Art. 15 CBD)

Staatliche Souveränität und genetische Ressourcen

Bereits in der Präambel des Konventionstextes wird darauf verwiesen, dass die einzelnen Vertragsparteien souveräne Rechte über ihre genetischen Ressourcen besitzen und sie für die Erhaltung ihrer biologischen Vielfalt sowie für die nachhaltige Nutzung ihrer biologischen Ressourcen verantwortlich sind (Präambel Erwägung 3 CBD). Dies ist jedoch nicht als grundlegend neuer Aspekt des CBD zu betrachten, sondern stellt lediglich ein erneutes Aufgreifen eines schon lange anerkannten souveränen Rechtes der Staaten an natürlichen Ressourcen dar, die sich innerhalb ihres Hoheitsgebietes befinden (Stoll, 2004, S. 78).

Hieraus ergibt sich unmittelbar die Notwendigkeit der Zugangsregulierung durch eine nationale Gesetzgebung des betreffenden Staates. Art. 15 Abs. 1 CBD erklärt diesbezüglich, dass in Anbetracht der souveränen Rechte der Staaten die Befugnis, den Zugang zu ihren genetischen Ressourcen zu bestimmen, bei den Regierungen der einzelnen Staaten liegt und dementsprechend den innerstaatlichen Rechtsvorschriften unterliegt. Entscheidungsermächtigt sind somit in erster Linie die nationalen Gesetzgebungsorgane oder von diesen beauftragte nationale Behörden (Kate & Laird, 2002, S.16; Wolfrum, 2004, S. 27).

Bezüglich der in diesem Absatz dargestellten juristischen Regulierungsform ist zu betonen, dass das CBD den Staaten keinerlei Eigentumsrechte an "ihren" genetischen Ressourcen zuspricht, dies entzieht sich dem Regelungsbereich des CBD und ist alleine vom nationalen Recht abhängig (Glowka *et al.*, 1994, S. 76; Lochen, 2007, S. 119). Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass somit auf nationaler Ebene zwischen Eigentum von Hoheitsträgern und von Privaten unterschieden werden muss, wodurch der Prozess der Zugangsgewährung bürokratisch komplexe Formen annehmen kann. Letztendlich steht dem Zugangssuchenden die Regierung des Ursprungslandes als Verhandlungspartner gegenüber, welche die Frage des Eigentums durch die Anwendung des nationalen Rechts beantworten muss (Wolfrum, 2004, S. 28).

Grundsätzliche Zugangsbedingungen und Verpflichtungen

Im Hinblick auf den Zugang zu genetischen Ressourcen an sich sollen durch Bemühungen der Vertragsparteien Voraussetzungen geschaffen werden, die diesen zur umweltverträglichen Nutzung durch andere Vertragsparteien erleichtern. Die Vertragsparteien werden aufgefordert, keine Beschränkungen aufzuerlegen, die den Zielen der Konvention zuwiderlaufen (Art. 15 Abs.2 CBD). Auch hier spiegelt sich das Aufeinandertreffen zweier Interessengruppen wider: Zum einen sind es die Interessen der Industrienationen, die einen möglichst einfachen Zugang zu genetischen Ressourcen

erlangen möchten, zum andern die Interessen von Entwicklungsländern, die versuchen, durch den Austausch von genetischen Ressourcen gegen Wissens-, Technologie- und/oder Finanztransfer ihre eigene Entwicklung voranzutreiben. Durch Art. 15 Abs. 2 CBD wird den Vertragsstaaten jedoch eine Verpflichtung auferlegt, die eine generelle Verweigerung des Zugangs zu genetischen Ressourcen untersagt, wodurch eine gewisse Einschränkung der in der Präambel festgelegten souveränen Rechte der Vertragsstaaten über ihre eigenen genetischen Ressourcen möglich erscheint.

Die genetischen Ressourcen und deren Regulierung

Art. 15 Abs. 3 CBD definiert die genetischen Ressourcen, die durch Artikel 15, 16 und 19 CBD reguliert werden. Dies sind demnach ausschließlich jene Ressourcen, die von den Vertragsstaaten zur Verfügung gestellt werden, in denen die Ressourcen ursprünglich vorkommen, und solche, die von den Parteien im Einklang mit dem Übereinkommen erworben wurden.

Hierbei wird deutlich, dass Ressourcen, die vor Inkrafttreten der Konvention oder die illegal vom Ursprungsland nach dem Inkrafttreten der Konvention erworben wurden, ausgeschlossen werden und folglich nicht den Regulierungen der Konvention unterliegen (vgl. hierzu Kate & Laird, 2002, S. 20). Ersteres reflektiert das Prinzip, dass grundsätzlich rechtliche Regulierungen niemals rückwirkend anzuwenden sind. Resultierend hieraus wird deutlich, dass in Genbanken gelagerte genetische Ressourcen, die vor dem Inkrafttreten der Konvention erworben wurden, nicht der rechtlichen Regulierung des CBD unterliegen. Somit besteht kein rechtlicher Anspruch auf Ausgleich der aus der Nutzung dieser Ressourcen entstandenen Vorteile für das Ursprungsland gemäß Art. 15, 16 und 19 CBD (Glowka *et al.*, 1994, S. 79; Wolfrum, 2004, S. 30). Diesbezüglich gilt es, das Datum des Inkrafttretens der Konvention zu berücksichtigen, da dies für die einzelnen Vertragsparteien in Abhängigkeit des Beitrittszeitpunktes variieren kann (vgl. Art. 36 Abs.3 CBD).

Ferner schließt der illegale Erwerb von genetischen Ressourcen den rechtlichen Anspruch auf eine Teilhabe an der aus der Nutzung entstandenen Vorteile dieser Ressourcen aus, wenn diese Partei einer dritten Vertragspartei wiederum diese Ressource anbietet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Ressourcen nicht im Einklang mit der Konvention erworben wurden (Glowka *et al.*, 1994, S. 79; Supplie, 2000, S. 168f; Wolfrum, 2004, S. 30). Rechtlich ungeklärt bleibt, wie aus juristischer Sicht vorzugehen ist, wenn das Ursprungsland, dem diese genetische Ressource entwendet wurde, um den Ausgleich der aus der Nutzung dieser Ressource entstandenen Vorteile ersucht.

Die Rolle der einvernehmlich festgelegten Bedingungen im Rahmen des Zugangs zu genetischen Ressourcen (Mutually agreed terms, MAT's)

Bei Gewährung des Zugangs erfolgt dieser zu einvernehmlich festgelegten Bedingungen (mutual agreed terms, MAT's, Art. 15 Abs.4 CBD, allgemein hierzu siehe Kate & Laird, 2002, S. 22ff). Dies impliziert eine vorangehende Verhandlung der Vertragsparteien, des Zugangsuchenden und des Ressourcen gebenden Vertragsstaates, über die Bedingungen, zu denen der Zugang letztlich gewährt wird. Bereits an dieser Stelle bezieht sie sich auf den Ausgleich der aus der Nutzung der biologischen Ressourcen entstandenen Vorteile. Die vorausgehende Verhandlung spielt im Besonderen eine Rolle, wenn es sich um biologische Ressourcen eines Entwicklungslandes handelt. Ziel dieser Verhandlungen soll eine bilaterale Zugangsvereinbarung sein, die in ein Zugangsabkommen mündet. Bereits an dieser Stelle ist das Einbeziehen von Regelungen der Gewinnverteilung beabsichtigt. Die Integration von Regelungen der Gewinnverteilung resultiert zum einen aus der Praktikabilität, zum andern wird somit eine gegenseitige Rechtssicherheit erlangt (Lochen, 2007, S. 123; Stoll, 2004, S. 78). Die Maßnahmen zur Gewinnverteilung können auch nichtmonetärer Art sein, worauf bei Betrachtung des Art. 15 Abs. 6 CBD bzw. Art. 16 CBD noch näher eingegangen wird.

Nach Lochen sind Normadressaten ausschließlich die Vertragsparteien, auch wenn Art. 15 Abs. 4 CBD dies nicht ausdrücklich festlegt. Da der Beitritt zum CBD nur Staaten und Organisationen der regionalen Wirtschaftsintegration offen steht (Art. 35 Abs. 1 CBD), ist eine Ausdehnung der aus dem CBD entstehenden Verpflichtungen auf alle Zugangsuchenden, seien es Individuen, Unternehmen, staatliche Institutionen oder Gemeinschaften, nicht beabsichtigt (Lochen, 2007, S. 121). Dem steht jedoch die grundsätzliche Auffassung der Vertragsstaaten gegenüber, wie durch Betrachtung des Berichts der zweiten Vertragsstaatenkonferenz deutlich wird. In Abs. 81 des Berichtes wird bekanntgegeben, dass generell in die Umsetzung von Maßnahmen des Zugangs und des Vorteilsausgleiches viele verschiedene Akteure involviert sein können, wie z.B. Firmen, Universitäten, staatliche Behörden und Forschungseinrichtungen, um nur einige zu nennen. Auch wird betont, dass diese Vereinbarungen auch nicht einfach bilateraler Art sein müssen. So können - auch wenn es sich nur um zwei involvierte Vertragsparteien handelt - gleich mehrere unterschiedliche Institutionen als Akteure auftreten (UNEP/CBD/COP/2/13 Abs.81, S.23). Gerade wird auch dies im Hinblick auf die Anwendung der einvernehmlich festgelegten Bedingungen (MAT's) und der auf der Kenntnis der Sachlage gegründeten vorherigen Zustimmung (PIC, näher im folgenden Kapitel) in Abs. 82 des Berichtes deutlich, wenn es heißt:

The Convention's requirements of mutually agreed terms (MATs) and PIC may be interpreted to apply to all of these players: not only to a Contracting Party Government but also to its nationals (UNEP/CBD/COP/2/13 Abs.82, S.23).

Auch Glowka *et al.* verweisen in diesem Zusammenhang darauf, dass der Zugangsuchende sowohl eine Privatperson, ein Unternehmen, eine Institution, eine Gesellschaft als auch ein Staat sein kann (Glowka *et al.*, 1994, S. 80). Folglich kann hieraus abgeleitet werden, dass sowohl private als auch staatliche Betreiber einer *ex situ*-Genbank den durch Art. 15 CBD vorgegebenen Regulierungen zum Zugang und Vorteilsausgleich unterliegen und bei Ersuchen des Zugangs dementsprechend mit dem Ressourcen zur Verfügung stellenden Land in Verhandlung treten müssen. Auch scheint der Ressourcen gebende Staat dazu berechtigt, den Zugang zu genetischen Ressourcen zu bestimmen, unabhängig davon, ob der Staat an sich oder private Personen oder Institutionen Eigentümer dieser genetischen Ressourcen sind. Ist Letzteres der Fall, sollten nach Glowka *et al.* die nationalen Zugangsgesetze deutlich darauf hinweisen, dass in einem solchen Fall der Zugangsuchende ein Zugangsübereinkommen mit dem eigentlichen Eigentümer der genetischen Ressource auszuhandeln hat, oder inwiefern eine Verhandlung mit dem Staat und dem eigentlichen Besitzer durchgeführt werden muss (Glowka *et al.*, 1994, S. 80).

Letztlich ist hierbei allerdings hervorzuheben, dass das Ressourcen zur Verfügung stellende Land nicht dazu verpflichtet ist, Zugangsvereinbarungen abzuschließen, sondern diese auch theoretisch frei bestimmen kann, wodurch letztlich doch der Zugang zu genetischen Ressourcen von dem Vertragsstaat abhängt, der die Ressourcen stellt (Lochen, 2007, S. 123).

Für die Handlungspositionen der Ressourcen gebenden Länder ist die Konkretisierung des Art. 15 Abs. 4 CBD durch Art. 15 Abs. 5 CBD, der im Folgenden diskutiert wird, von besonderer Relevanz.

Die Rolle der auf der Kenntnis der Sachlage gegründeten vorherigen Zustimmung im Rahmen des Zugangs zu genetischen Ressourcen (Prior informed consent, PIC)

Von größter Bedeutung für die Gewährung des Zugangs zu genetischen Ressourcen ist die auf der Kenntnis der Sachlage gegründete vorherige Zustimmung der Vertragspartei, die ersucht wird, den Zugang zu gewähren (prior informed consent, PIC, Art. 15 Abs. 5 CBD, allgemein hierzu siehe Kate & Laird, 2002, S. 27ff).

Das CBD liefert hierfür keine allgemeingültige Definition. Übersetzt man die englischsprachige Formulierung im CBD Text wörtlich, so heißt es "zuvor informierte Einwilligung". Hierbei geht es darum, dass das Ressourcen gebende Land hinreichend über die potentiellen sowohl positiven als auch negativen Folgen der Zugangsgewährung informiert wird. Die alleinige hinreichende Information des Vertragsstaates ist allerdings nicht ausreichend, sondern auch die Einwilligung des Vertragsstaates, der um den Zugang ersucht wird, ist notwendig.

Lochen beschreibt die Situation wie folgt:

Ähnlich wie bei einer Zustimmung zu einem medizinischen Eingriff gilt es "sicherzustellen, dass jemand, der mit einer speziellen Materie nicht hinreichend vertraut ist, diejenigen Informationen zur Verfügung gestellt bekommt, die er benötigt, um eine aus seiner Sicht sinnvolle Entscheidung zu treffen" (Lochen, 2007, S. 124).

Die vorherige informierte Zustimmung dient somit der Stärkung der Verhandlungsmacht des Ressourcengebers und wirkt zudem der Biopiraterie, also der Aneignung biologischer Ressourcen ohne die Kenntnis des betreffenden Staates, entgegen (Lochen, 2007, S. 148; Stoll, 2004, S. 78). Es wird somit deutlich, dass der Zugang zu genetischen Ressourcen nicht möglich ist, wenn die Zustimmung des Herkunftsstaates fehlt. Dies gilt grundsätzlich solange der betreffende Vertragsstaat, der die Ressourcen beherbergt, nicht anderweitig entscheidet (Art. 15 Abs. 5 CBD). Diese Regulierung funktioniert jedoch nur dann, wenn in dem Herkunftsland auch die notwendigen bürokratischen Maßnahmen umgesetzt wurden, die das PIC-Verfahren ermöglichen (vgl. hierzu Kate & Laird, 2002, S. 27).

Der Zugangssuchende ist laut Art. 15 CBD nicht ausdrücklich dazu verpflichtet, ungefragt Informationen zur Verfügung zu stellen, sondern sollte grundsätzlich von dem Ressourcen zur Verfügung stellenden Land sowohl über die zuständigen Behörden und die zu beachtenden formellen Aspekte als auch über mögliche Sanktionen bei deren Missachtung informiert werden. Wurde allerdings in dem Vertragsstaat, der die Ressourcen beherbergt, keine Instanz etabliert, die das PIC-Verfahren verwaltungstechnisch umsetzt, so kann diesem nicht entsprochen werden, wodurch der Zugang dann weiterhin unkontrolliert erfolgen kann (Glowka *et al.*, 1994, S. 81; Lochen, 2007, S. 125). Somit wird deutlich, dass beiderseits - sowohl beim Ressourcen bereitstellenden Land als auch beim Ressourcen nutzenden Land - eine nationale Gesetzgebung notwendig ist, um die erforderlichen bürokratischen Prozesse der MAT's und des PIC umzusetzen. Glowka *et al.* empfehlen hierzu die Etablierung einer oder mehrerer zentraler Anlaufstellen, die diese bürokratischen Abläufe koordinieren und bearbeiten und von den Regierungen der Vertragsstaaten für ihr Land ernannt werden (Glowka *et al.*, 1994, S. 81).

Beteiligung an wissenschaftlicher Forschung als Vorteilsausgleich

Im Sinne des Vorteilsausgleiches fordert Art. 15 Abs. 6 CBD von jeder Vertragspartei, die wissenschaftliche Forschung auf der Grundlage genetischer Ressourcen anderer Vertragsparteien durchführen will, dass sie dies unter voller Beteiligung der Ressourcen gebenden Vertragspartei und nach Möglichkeit in deren Hoheitsgebiet plant und durchführt (Glowka *et al.*, 1994, S. 82). Es ist diesbezüglich jedoch zu betonen, dass Art. 15 Abs. 6 CBD keinerlei absolute Verpflichtung des Nehmerlandes ausdrückt, sondern lediglich eine stark formulierte Bemühungsklausel darstellt (Wolfrum, 2004, S. 30). Mit anderen Worten: Das Zugang suchende Land ist nicht unmittelbar verpflichtet, die Ressourcen gebende

Vertragspartei in ihre wissenschaftliche Forschung mit einzubeziehen. Ziel dieses Absatzes ist es vor allem, einen Transfer von Wissen und Technologie zu ermöglichen, wodurch gerade die Entwicklungsländer durch Nutzung eigener Ressourcen und das Hinzukommen neuen Wissens und neuer Technologie gefördert werden sollen. Auch dies entspricht den übergeordneten Zielen des Übereinkommens, da die Vertragsparteien fordern, *"dass die wirtschaftliche und soziale Entwicklung und die Beseitigung der Armut die ersten und vordringlichsten Anliegen der Entwicklungsländer sind"* und *"dass die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt letztlich die freundschaftlichen Beziehungen zwischen den Staaten stärken und zum Frieden unter den Menschen beitragen"* sollen (Präambel, CBD). Art. 15 Abs. 6 CBD zeigt somit deutliche Parallelen zu Art. 18 CBD, der die technische und wissenschaftliche Zusammenarbeit behandelt. Allerdings ist hierbei noch zu betonen, dass sich dieser Absatz auf sämtliche wissenschaftliche Forschungen bezieht, die auf der Grundlage der genetischen Ressourcen durchgeführt werden, nicht nur auf technologische (Glowka *et al.*, 1994, S. 82).

Bezug nehmend auf den Betrieb einer Genbank zoogenetischer Ressourcen als *ex situ*-Erhaltungsmaßnahme wird zudem eine Parallele zu Art. 9 lit. a deutlich. Dieser besagt, dass *ex situ*-Maßnahmen zur Ergänzung von *in situ*-Maßnahmen vorzugsweise im Ursprungsland umgesetzt werden sollen. Dies wird durch Art. 15 Abs. 7 erkennbar untermauert, da zudem auch Forschungs- und Entwicklungseinrichtungen, im Hinblick auf gefährdete Tierarten eines Ursprungslandes, im Ursprungsland der Art selbst geplant und errichtet werden sollen.

Zur rechtskräftigen Umsetzung ist es notwendig, dass rechtsverbindliche Maßnahmen getroffen werden, die die ausgewogene und gerechte Verteilung der aus der Nutzung der genetischen Ressourcen entstandenen Vorteile gewährleisten.

Art. 15 Abs. 7 CBD fordert daher die Vertragsparteien auf, Gesetzgebungs-, Verwaltungs- oder politische Maßnahmen zu ergreifen, um eine gerechte Aufteilung der Ergebnisse der Forschung und Entwicklung und die Vorteile, die sich aus dem kommerziellen und sonstigen Nutzen der genetischen Ressource ergeben, mit den Ressourcen gebenden Vertragsparteien ausgewogen und gerecht zu teilen (Glowka *et al.*, 1994, S. 83). Wieder wird betont, dass diese Aufteilung zu einvernehmlich festgelegten Bedingungen erfolgen muss (MAT's), ebenso wie bei der Gewährung des Zugangs zu genetischen Ressourcen.

In diesem Falle ist dies nur noch bedingt notwendig, da davon ausgegangen werden kann, dass, wie oben erwähnt, bereits bei den Verhandlungen über den Zugang zu genetischen Ressourcen von den Vertragsparteien auch die Aufteilung der aus der Nutzung entstandenen Vorteile zu einvernehmlich festgelegten Bedingungen erfolgt ist.

3.1.5.2 Technologietransferbestimmungen im Hinblick auf den Zugang zu genetischen Ressourcen (Art. 16 CBD)

Gerade im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank zur Sicherung der genetischen Diversität ist Art. 16 CBD von erheblicher Bedeutung. Die Vorschrift regelt den Zugang und die Weitergabe von Technologien unter den Vertragsparteien. Hierbei wird deutlich darauf hingewiesen, dass es sich bei den erwähnten Technologien um solche handelt, die für die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt von Belang sind, oder solche, die genetische Ressourcen nutzen (Art. 16 Abs.1 CBD, hierzu vgl. Wolfrum, 2004, S.31f). Hierunter fallen folglich auch Technologien zur Lagerung und Konservierung genetischer Materialien in Genbanken und weiterhin solche Technologien, die zur Nachzucht von gefährdeten Tierarten verwendet werden oder zu deren assoziierter Erforschung.

Der Zugang zu und der Austausch von Technologien soll durch Art. 16 CBD generell erleichtert werden und in Bezug auf Entwicklungsländer unter ausgewogenen und möglichst günstigen Bedingungen erfolgen (allgemein hierzu Birnie & Boyle, 2002, S.585; Beyerlin, 2000, S. 201; Stoll, 2004, S. 79f). Voraussetzung für den Zugang zu Technologien ist wiederum das beiderseitige Einvernehmen, wobei hierdurch der Zugang für Entwicklungsländer auch zu Konzessions- oder Vorzugsbedingungen erfolgen kann. Um dies zu ermöglichen, kann gegebenenfalls auch auf den in den Art. 21 und 22 CBD definierten Finanzierungsmechanismus zurückgegriffen werden (Art. 16 Abs.2 CBD). Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch um Technologien, die dem Patentrecht oder anderen Rechten des geistigen Eigentums unterliegen. In einem solchen Fall sollen der Zugang und die Weitergabe unter Bedingungen erfolgen, die den Schutz der Rechte des geistigen Eigentums anerkennen und mit ihnen im Einklang stehen. Gegebenenfalls können sowohl Zugang als auch Weitergabe über die Finanzierungsbestimmungen der Art. 21 und 22 CBD ermöglicht werden. Schließlich wird deutlich, dass der Technologietransfer in einem kommerziellen Rahmen erfolgen kann und ein finanzieller Aufwand somit nicht ausgeschlossen wird (vgl. hierzu Stoll 2004, S.80, Beyerlin 2000, S.201).

Hierfür werden die Vertragsstaaten angehalten, Gesetzgebungs-, Verwaltungs-, oder politische Maßnahmen zu ergreifen, die unter anderem auch ermöglichen sollen, dass der private Sektor - im Besonderen von Staaten, die genetische Ressourcen zur Verfügung stellen - Zugang zu den oben beschriebenen Technologien hat und an deren Entwicklung teilnehmen kann. Zudem zielt Art. 16 CBD darauf, dass der private Sektor diese Technologien weitergeben kann, sowohl zum Nutzen der Regierungsinstitutionen als auch zum Nutzen des privaten Sektors (Art. 16 Abs.4 CBD). Somit sollten rechtliche Regulierungen auf nationaler Ebene geschaffen werden, die es dem privaten Sektor, also auch privaten Genbanken, ermöglichen, Zugang zu den beschriebenen Technologien unter

Berücksichtigung der in Art. 16 Abs.1-3 CBD genannten Verpflichtungen zu ermöglichen (Art. 16 Abs.4 CBD).

Bezüglich der notwendigen Betrachtung von Rechten des geistigen Eigentums sind durch Zusammenarbeit der Vertragsstaaten die jeweiligen nationalen und völkerrechtlichen Bestimmungen zu berücksichtigen, um die Konformität mit den Bestimmungen des CBD sicherzustellen und ein Zuwiderlaufen auszuschließen (Art. 16 Abs.5 CBD). Hier wird bereits deutlich, dass ein zentraler Aspekt aktueller Diskussionen die Frage nach dem Schutz des geistigen Eigentums im Zusammenhang mit der Umsetzung des CBD ist, eine Frage, die sich auch auf anderen Gebieten stellt, insbesondere bei den modernen Kommunikationstechnologien.

Diesbezüglich kann hier nur auf mögliche Komplikationen hingewiesen werden, die durch die recht kontroversen Bestimmungen des CBD und des Übereinkommens über handelsbezogene Aspekte der Rechte am geistigen Eigentum (Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights, TRIPS) auftreten (weitere Informationen hierzu: Stoll, 2004, S.85).

3.1.5.3 Umgang mit Biotechnologien und Verteilung der daraus resultierenden Vorteile (Art. 19 CBD)

Art. 19 Abs. 1 CBD konkretisiert die Bestimmungen des Art. 16 und bestimmt für jede Vertragspartei das Ergreifen von Gesetzgebungs-, Verwaltungs- und politischen Maßnahmen, die es ermöglichen sollten, dass die Länder, welche die genetischen Ressourcen zur Verfügung stellen, an den Forschungsarbeiten, die an diesen Ressourcen durchgeführt werden, wirksam beteiligt werden. Dies bezieht sich hier im Vergleich zu Art. 16 CBD hauptsächlich auf die biotechnologische Forschung und soll wenn möglich in den Ländern durchgeführt werden, von denen die genetischen Ressourcen zur Verfügung gestellt werden (Art. 19 Abs.1 CBD). Hier sieht man deutliche Parallelen zu Art. 9 CBD, der ebenfalls bestimmt, dass die Umsetzung von *ex situ*-Maßnahmen vorzugsweise im Ursprungsland der genetischen Ressource erfolgen soll (Art. 9 lit. b CBD). Letztendlich zielt Art. 19 Abs.1 CBD jedoch auf einen gerechten Vorteilsausgleich und die damit verbundene Kompetenzbildung des Ressourcen gebenden Landes. Der Vorteilsausgleich erfolgt in diesem Falle durch einen gezielten Wissenstransfer und einen Transfer "harter" Technologie, was durch die Absicht der Umsetzung der Forschungsarbeiten im Ursprungsland der genetischen Ressourcen zum Ausdruck kommt. Hiermit soll der Zugang zu notwendigen technischen Geräten, zu Fachwissen und letztendlich auch zu Forschungsergebnissen und den Vorteilen, die sich aus den Biotechnologien ergeben, gerade für Entwicklungsländer

ermöglicht werden. Der Zugang zu den Ergebnissen und den Vorteilen, die aus dem Nutzen der Biotechnologien resultieren, soll ebenso wie der Zugang zu den genetischen Ressourcen zu einvernehmlich festgelegten Bedingungen erfolgen (Art. 19 Abs. 2 CBD).

Die Sicherheitsbestimmungen hinsichtlich des Umgangs mit lebenden modifizierten Organismen, die negative Auswirkungen auf die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt haben können, sind in Art. 19 Abs. 3-4 CBD geregelt. Diesbezüglich ist der Vertragsstaat, der die modifizierten Organismen zur Verfügung stellt, dazu verpflichtet, selbständig alle notwendigen Informationen über den Umgang, die Nutzung, mögliche nachteilige Auswirkungen und die von ihm vorgeschriebenen Sicherheitsbestimmungen an die Vertragspartei, in die der Organismus eingebracht wird, weiterzugeben. Handelt es sich um eine natürliche oder juristische Person, welche den modifizierten Organismus zur Verfügung stellt, so ist diese durch den Vertragsstaat dazu zu verpflichten, die oben genannten Informationen selbstständig an die Vertragspartei, in die der Organismus eingebracht werden soll, weiterzugeben (Art.19 Abs.4 CBD).

3.1.6 Die Bonner Richtlinien – Möglichkeit zur nationalen Umsetzung der Vertragsstaaten

Der Zugang zu genetischen Ressourcen und der gerechte Ausgleich aus der Nutzung dieser Ressourcen entstehenden Vorteile sind Kernelemente des CBD. Wie jedoch aus obigen Darlegungen zu den Art. 15, 16 und 19 CBD deutlich wird, sind die Vorgaben zur Regulierung des Zugangs und des Vorteilsausgleiches des CBD sehr weit gefasst. Sie geben keinesfalls eine genaue Anweisung zur Umsetzung der geforderten Verpflichtungen der Vertragsparteien. Auch im Hinblick auf *ex situ*-Sammlungen und Genbanken bleiben Fragen des Zugangs und des Vorteilsausgleiches ungeklärt. Diese Unklarheiten führten bereits frühzeitig nach Unterzeichnung des CBD durch die Vertragsstaaten zu Diskussionen, so dass bereits 1998 auf der vierten Vertragsstaatenkonferenz (Conference of the Parties 4, COP4) ein Expertenausschuß berufen wurde, der die wesentlichen Elemente des Art. 15 CBD interpretieren sollte. Auf der darauffolgenden Vertragsstaatenkonferenz COP5 wurde zudem eine Ad-hoc Arbeitsgruppe zur Thematik gegründet (Ad-hoc Open-ended Working Group on Access and Benefit-sharing), die grundlegende Vorgehensweisen zur Umsetzung legislativer, administrativer und politischer Maßnahmen und Zugangsverträge ausarbeiten sollte. Diese Ad-hoc Working Group setzt sich zusammen aus Repräsentanten von 87 Staaten und der EG und traf sich zum ersten Mal im Oktober 2001 mit dem Ziel der Ausarbeitung von Richtlinien zum Zugang zu genetischen Ressourcen und zur Gewinnverteilung. Ergebnis war ein Richtlinienentwurf mit dem Titel "Draft Bonn Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of the Benefits Arising out of their Utilization", kurz "Bonn Guidelines" oder "Bonner Richtlinien", die während der COP6 diskutiert wurden und letztlich rechtsförmlich angenommen wurden (Lochen, 2007, S. 136).

Die Bonner Richtlinien (BR) sind bis zum jetzigen Zeitpunkt das aktuellste internationale Dokument, das bezüglich des Zugangs- und des Vorteilsausgleichs konsensfähig ist. Da eine detaillierte Beschreibung und Würdigung des Inhaltes der Bonner Richtlinien im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen ist, werden im Folgenden nur die wesentlichen Aspekte diskutiert. Eine detaillierte Aufarbeitung des Inhaltes findet sich in Lochen 2007 (S. 134ff).

Bereits im Vorwort der Bonner Richtlinien wird hervorgehoben, dass sie die Terminologie des CBD verwenden und sich auch mit dessen Anwendungsbereich decken. Wesentlich ist auch die Betonung der Tatsache, dass sie nicht rechtsverbindlich sind, sondern nur als Hilfe zur Ausarbeitung nationaler legislativer, administrativer und politischer Maßnahmen zum Zugang zu genetischen Ressourcen und der Gewinnverteilung zu betrachten sind (vgl. Rn. 7 BR).

3.1.6.1 Ziel der Bonner Richtlinien

Randnummer 11 der Bonner Richtlinien beschreibt ihr Ziel. Sie sollen einen Beitrag zur nachhaltigen Nutzung der biologischen Diversität leisten und ein transparentes Regelwerk liefern, das den Zugang zu genetischen Ressourcen erleichtert und die gerechte und ausgeglichene Verteilung der aus ihrem Nutzen entstehenden Vorteile sicherstellt (Rn. 11 lit. b BR). Besonders erwähnenswert ist, dass die Bonner Richtlinien im Hinblick auf die Forschung die Privilegierung der nicht kommerziellen und taxonomischen Forschung fordern, da diese durch die bürokratischen Mechanismen, die durch die Umsetzung des Art. 15 CBD entstehen, erheblich verzögert oder gar verhindert werden können (Rn. 11 lit. I BR, siehe hierzu auch: Kate, 2002, S. 2371f).

3.1.6.2 Rollen und Verpflichtungen der Akteure

Zur Umsetzung des Art. 15 CBD fordern die Bonner Richtlinien verschiedene Rollen und Verpflichtungen der einzelnen Akteure. So sollen Vertragsparteien einen sog. "national focal point for access and benefit-sharing", also eine zentrale Anlaufstelle für Fragen des Zugangs zu genetischen Ressourcen und des Vorteilsausgleichs, einrichten (Rn. 13 BR, bereits in der BRD durch das Bundesamt für Naturschutz eingerichtet). Diese zentralen Anlaufstellen sollen Informationen über Zugangsbedingungen zu genetischen Ressourcen, über die damit verbundenen PIC und MAT's Verfahren, über die möglichen Formen der Gewinnverteilung, über die zuständigen nationalen Behörden und über die möglichen relevanten indigenen und lokalen Gemeinschaften und Interessengruppen bereitstellen (Rn. 13 BR). Zudem sollen kompetente nationale Behörden benannt werden, denen die Zuständigkeit für die Ausstellung von Zugangsgenehmigungen unter Berücksichtigung der nationalen legislativen, administrativen und politischen Maßnahmen übertragen werden kann (Rn. 14, 15 BR).

Die Verpflichtungen, die im Rahmen des Zugangs zu genetischen Ressourcen und der Gewinnverteilung entstehen, teilen die Bonner Richtlinien den verschiedenen auftretenden Akteuren zu. Hierbei werden diese in vier Positionen unterteilt, wobei jede Position je nach Sachlage von jeder Vertragspartei vertreten werden kann. Hierbei handelt es sich um folgende:

(1) Vertragsparteien, die Ursprungsländer genetischer Ressourcen sind, oder solche, die genetische Ressourcen im Einklang mit dem CBD erworben haben. Diese sollen alle Maßnahmen bezüglich des Zugangs zu genetischen Ressourcen und der Gewinnverteilung im Einklang mit Art. 15 CBD und ihre Zuständigkeiten klar, objektiv und transparent umsetzen. Besondere Bedeutung erlangt hier der Schutz indigener und lokaler

Gemeinschaften, da die Vertragsparteien sicherstellen sollen, dass die kommerzielle und auch jede weitere Nutzungsform genetischer Ressourcen die traditionelle Nutzung dieser nicht verhindert (Rn. 16 lit. a BR).

(2) Nutzer genetischer Ressourcen. Diesbezüglich wird hervorgehoben, dass nichtstaatliche Nutzer durch die CBD als völkerrechtliches Übereinkommen rechtlich nicht gebunden sind, wohl aber durch die Zugangsverträge, die mit den Ursprungsländern verhandelt wurden, gebunden sein können (Rn. 16 lit. b BR).

(3) Anbieter der genetischen Ressourcen. Diese werden angehalten, genetische Ressourcen nur dann zur Verfügung zu stellen, wenn sie dazu berechtigt sind. Zudem sollen willkürliche Beschränkungen des Zugangs zu genetischen Ressourcen vermieden werden (Rn. 16 lit. c BR).

(4) Vertragsparteien, die Nutzer genetischer Ressourcen in ihrem juristischen Einflussbereich haben. Hierbei ist erwähnenswert, dass diese angehalten werden, die Nutzer genetischer Ressourcen durch rechtliche, administrative oder politische Maßnahmen zur Einhaltung ihrer Verpflichtungen aus dem PIC-Verfahren und den weiteren Zugangsvereinbarungen zu bewegen (Rn. 16 lit. d BR).

3.1.6.3 Teilnahme von Interessengruppen

Randnummer 16 der Bonner Richtlinien regelt die Teilnahme von Interessengruppen, wobei auffällt, dass eine Definition der Interessengruppen nicht gegeben wird. Ferner wird deutlich, dass die Bonner Richtlinien in den Begriff "Interessengruppen" auch nicht staatliche Nutzer und Anbieter mit einbeziehen (vgl. Rn. 16 BR, Vertragsstaaten und Interessengruppen werden nebeneinander aufgeführt, hierzu auch Lochen, 2007, S. 146). Als Zugangssuchender wird man somit angehalten, neben den Zugangsverhandlungen mit dem Ursprungsland auch indigene und lokale Gemeinschaften zu informieren bzw. in die Verhandlungen zu integrieren.

3.1.6.4 Schritte im Prozess des Zugangs und der Gewinnverteilung

Der Zugang erfolgt in Einklang mit dem CBD durch die auf der Kenntnis der Sachlage beruhenden vorherigen Zustimmung des Ursprungslandes (PIC) und zu einvernehmlich festgelegten Bedingungen (MAT's). Die Randnummern 22 bis 50 der Bonner Richtlinien beschäftigen sich deshalb intensiv mit den Zugangsvereinbarungen nach dem CBD, dem

PIC-Verfahren (Art. 15 Abs. 5 CBD) und den MAT's (Art. 15 Abs. 4 u. 7 CBD) und erreichen hier eine deutliche Spezifizierung dieser Verfahren.

Grundsätzlich soll das System der Verhandlungen über den Zugang zu genetischen Ressourcen und der Gewinnverteilung eine nationale und regionale Gesamtstrategie verfolgen, mit dem Ziel, die biologische Diversität zu erhalten und nachhaltig zu nutzen.

3.1.6.5 Regulierung des PIC-Verfahrens nach den Bonner Richtlinien

Randnummer 26 der Bonner Richtlinien liefert Grundsätze eines zu installierenden PIC-Systems. Im Vordergrund steht hierbei die Gewährung der Rechtssicherheit und die Rechtsklarheit der Vertragsparteien. Der Zugang zu genetischen Ressourcen soll weiterhin zu den geringst möglichen Kosten erfolgen. Wenn Zugangsbeschränkungen im Rahmen des PIC-Verfahrens erlassen werden, so sollen diese transparent sein und sich auf rechtliche Gründe beziehen, die den Zielen der CBD nicht zuwider laufen (vgl. Lochen, 2007, S. 148). Wie bereits durch Rn. 16 BR deutlich wurde, wird auch hier wieder betont, dass zum Zugang zu genetischen Ressourcen nicht nur die Zustimmung der relevanten Behörden des Ursprungslandes erforderlich ist, sondern auch die Zustimmung weiterer evtl. betroffener Interessengruppen wie z.B. indigene oder regionale Gemeinschaften.

Randnummer 36 BR liefert ein mögliches Vorgehen zum Erlangen der PIC und somit die möglichen Inhalte eines Zugangsantrages. Dies sind zum Beispiel detaillierte Informationen über die Institution, die den Antrag stellt, die Menge und Art der genetischen Ressource, um die der Zugang ersucht wird, Informationen über die geographische Lage des Untersuchungsgebietes, die Dauer der Exploration, die beabsichtigte Nutzung, wo und wie die Forschung und Entwicklung umgesetzt wird, Ziel der Sammlung und Forschung und Informationen über erwartete Ergebnisse, um nur einige aufzuführen (Rn. 36 lit. a-o BR). Weiterhin wird ausdrücklich darauf verwiesen, dass mit der Erlaubnis zum Zugang zu genetischen Ressourcen nicht notwendigerweise der Zugang zu traditionellem Wissen gewährt ist und umgekehrt (Rn. 37 BR).

3.1.6.6 Regulierung der einvernehmlich festgelegten Bedingungen (MAT's) durch die Bonner Richtlinien

Art. 15 CBD definiert die Bedingungen, unter denen der Zugang zu genetischen Ressourcen verhandelt werden soll. Neben dem bereits geschilderten PIC-Verfahren sollen die Vertragsparteien bilaterale Zugangsbedingungen auf der Grundlage einvernehmlich festgelegter Bedingungen (MAT's) aushandeln. Diesbezüglich werden durch Rn. 42 BR Prinzipien bzw. grundlegende Anforderungen zur Ausarbeitung und Entwicklung von MAT's vorgeschlagen, die den Vertragsparteien als Orientierung und Hilfe zur Verfügung stehen. Hierbei fällt auf, dass im Sinne der Bonner Richtlinien die MAT's hauptsächlich als Instrument der Gewinnverteilung betrachtet werden. Art. 15 Abs. 4 CBD bezieht die MAT's in die Zugangsverhandlungen bereits mit ein.

Im Vordergrund der in Rn. 42 BR lit. a dargelegten grundlegenden Anforderungen an die MAT's stehen wiederum die Rechtssicherheit und die Rechtsklarheit. Grundsätzlich schlagen die Bonner Richtlinien vor, einheitliche Rahmenabkommen, sog. Materialübertragungsvereinbarungen [Rn. 42 lit. b (iv) BR, material transfer agreements, MTAs], zu entwickeln, wodurch Zugangsprozesse beschleunigt und vereinfacht werden sollen. Hierfür wird in Anhang I der Bonner Richtlinien eine Reihe von grundlegenden Bestandteilen für entsprechende MTAs vorgeschlagen. Somit werden die auf der völkerrechtlichen Ebene rechtlich unverbindlichen Bonner Richtlinien auf der Ebene der individuellen Zugangsvereinbarung rechtlich bindend (Lochen 2007, S.162).

3.1.6.7 Verteilung der Gewinne nach den Bonner Richtlinien

Nach Rn. 45 BR sind die Mechanismen der Gewinnverteilung und somit die Auslegung der Begriffe "gerecht" und "ausgewogen" im Kontext der jeweiligen Umstände zu betrachten (vgl. hierzu: Locher 2007, S.157). Da die Aufforderung zur gerechten und ausgewogenen Gewinnverteilung durch Art. 15 Abs. 7 CBD Unklarheiten darüber hinterlässt, in welcher Form diese gerechte Aufteilung erfolgen soll, liefern nun die Bonner Richtlinien in Anhang II eine umfangreiche Liste an Möglichkeiten des finanziellen und nicht-monetären Ausgleiches (Rn. 46 BR). Zudem sehen die Bonner Richtlinien einen zeitlichen Rahmen für den Vorteilsausgleich vor und unterscheiden zwischen kurzfristigen, mittelfristigen und langfristigen Zahlungen oder Lizenzgebühren, abhängig von dem erwarteten Ausmaß des Gewinns (Rn. 47 BR).

Von großer Bedeutung scheint auch Rn. 48 BR zu sein. Erstens wird klar gefordert, dass die Gewinne gerecht mit allen geteilt werden sollten, die zum Ressourcenmanagement, der Erforschung oder der kommerziellen Nutzung beigetragen haben. Zweitens wird an dieser Stelle erstmals gefordert, dass die Gewinne, die aus der Nutzung genetischer Ressourcen entstanden sind, zur Erhaltung und zur nachhaltigen Nutzung der biologischen Diversität eingesetzt werden sollten.

Wie die Gewinnverteilung letztendlich genau umgesetzt wird, bleibt abhängig von der Art des Gewinns und den spezifischen Bedingungen der beteiligten Staaten und Interessengruppen. Generell sollte sie flexibel sein, da sie von den jeweils involvierten Parteien festgelegt werden sollte und somit von Fall zu Fall variieren kann (Rn. 49 BR).

3.1.7 Würdigung des CBD und der Bonner Richtlinien im Hinblick auf *ex situ*-Genbanken

Ziel des CBD ist es, die biologische Vielfalt zu erhalten, ihre Bestandteile nachhaltig zu nutzen und die aus der Nutzung entstehenden Vorteile ausgewogen und gerecht unter den beteiligten Akteuren aufzuteilen. Das CBD bezieht sich nicht nur auf gefährdete Arten, sondern grundsätzlich auf alle Bestandteile der biologischen Diversität. Verpflichtungen und Rechte, die aus dem CBD entstehen, gelten in erster Linie nur unter den Vertragsparteien. Dies sind Staaten und Organisationen der regionalen Wirtschaftsintegration. Private Einzelpersonen oder Organisationen sind nur dann an das CBD gebunden, wenn Gesetze und Regelungen durch nationales Recht eingeführt wurden. Dies ist bisher, im Hinblick auf die Bundesrepublik Deutschland und die hier behandelten Fragestellungen des Zugangs und Vorteilsausgleiches, nicht geschehen. Lediglich die Bonner Richtlinien liefern ein Regelwerk zur nationalen Umsetzung, das jedoch rechtlich unverbindlich ist und von den Vertragsparteien freiwillig umgesetzt werden kann. Die Vertragsstaaten selbst fassen den Geltungsbereich des CBD weiter. Sie integrieren in den Begriff des Zugangssuchenden sowohl Privatpersonen, Unternehmen, Institutionen und Gesellschaften als auch Staaten (UNEP/CBD/COP/2/13 Abs.81, S. 23).

Art. 9 CBD fordert als eine Maßnahme zur Erhaltung der biologischen Diversität die *ex situ*-Erhaltung, zu der auch die Sammlung und Lagerung von biologischen Materialien in Genbanken gehören. Die Umsetzung von *ex situ*-Maßnahmen ist vorzugsweise im Ursprungsland der genetischen Ressource durchzuführen. Wie bereits an früherer Stelle erwähnt, bleibt ein gewisser Spielraum zur Umsetzung von solchen Maßnahmen auch außerhalb des Ursprungslandes erhalten. Generell scheint jedoch im Hinblick auf biologische Ressourcen, deren natürliche Verbreitung nicht auf ein Land beschränkt ist und deren

Vorkommen sich über Staatsgrenzen hinaus erstreckt, eine Umsetzung von *ex situ*-Maßnahmen im Ursprungsland problematisch. Auch für wandernde Arten, deren Brutgebiete möglicherweise sogar auf anderen Kontinenten liegen, scheint dies unmöglich.

Will ein Betreiber einer Genbank, gleich ob staatliche oder private Institution, Zugang zu biologischen Ressourcen, deren Verbreitungsgebiet nicht den Grenzen des eigenen Staates entspricht, so muss er grundsätzlich mit der Regierung des Staates in Verhandlung treten, in dem die Art ursprünglich vorkommt. Oder er muss mit einer weiteren Vertragspartei verhandeln, die Proben der betreffenden Art im Einklang mit dem CBD erworben hat. Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn beide Vertragsparteien nationale Anlaufstellen und rechtliche Vorgaben auf nationaler Ebene etabliert haben, die diese Verhandlungen ermöglichen. Der Zugang soll dann nach einvernehmlich festgelegten Bedingungen (MAT's) und auf der Kenntnis der Sachlage gegründeten vorherigen Zustimmung (PIC) der Vertragspartei, welche die Ressourcen zur Verfügung stellt, erfolgen. Konkretisiert wird dies durch die Bonner Richtlinien, die Möglichkeiten solcher Zugangsbedingungen vorschlagen. Ungeklärt bleiben die eigentlichen Eigentumsrechte an den biologischen Ressourcen. Zwar liegen die souveränen Rechte über die biologischen Ressourcen bei der Regierung der Vertragspartei, welche diese beherbergt, doch weder das CBD noch die Bonner Richtlinien räumen dem Staat Eigentumsrechte an den biologischen Ressourcen ein. Befindet sich zum Beispiel die betreffende biologische Ressource auf privatem Grund, gilt es, von Fall zu Fall durch Anwendung des jeweiligen nationalen Rechts die Frage des Zugangs zu klären und gegebenenfalls den Eigentümer der biologischen Ressource in die Zugangsverhandlungen mit einzubeziehen.

Ist der Zugang letztendlich gewährt, sind die Vertragsparteien an die ausgehandelten einvernehmlich festgelegten Bedingungen rechtlich gebunden, die auch schon Maßnahmen zum Ausgleich des aus der Nutzung der biologischen Ressource entstandenen Vorteile beinhalten. Dieser Vorteilsausgleich kann sowohl monetärer als auch nicht-monetärer Art sein, wodurch auch technisches Wissen, harte Technik, aber auch Forschungsergebnisse in diesen Prozess integriert werden. Auch hierfür liefern die Bonner Richtlinien konkrete Beispiele monetärer und nicht-monetärer Ausgleichsmöglichkeiten. Zudem schlagen sie zur gegenseitigen Rechtssicherheit und Rechtsklarheit die Ausarbeitung von standardisierten Materialübertragungsvereinbarungen (MTA's) vor.

Offen bleibt jedoch die Frage, wie für den Fall vorzugehen ist, wenn eine zugangssuchende Vertragspartei die Bedingungen des Zugangs und auch des Vorteilsausgleiches mit der Ressourcen gebenden Vertragspartei für eine bestimmte genetische Ressource ausgehandelt hat, diese jedoch nicht nur in diesem Land vorkommt, sondern auch in weiteren Gebieten anderer Vertragsparteien anzutreffen ist. Es bleibt ungeklärt, inwiefern diese weiteren Vertragsparteien ebenso Anspruch auf einen Ausgleich für die aus der

Nutzung dieser Ressource resultierenden Vorteile erheben können, da sie doch ebenso wie die Vertragspartei, mit der die Zugangs- und Ausgleichsverhandlungen stattgefunden haben, souveräne Rechte an dieser genetischen Ressource haben.

Grundsätzlich ist an dieser Stelle festzuhalten, dass genetische Ressourcen, die vor in Kraft treten des CBD erworben wurden, nicht in den Anwendungsbereich des CBD fallen und folglich unabhängig von jeglichen Regulierungen und Verpflichtungen, die das CBD vorgibt, genutzt werden können. Die Vertragspartei, aus der die betreffende biologische Ressource stammt, hat in einem solchen Fall kein Anrecht auf einen Ausgleich der aus der Nutzung dieser Ressource entstandenen Vorteile, es sei denn, es wurden unabhängig von dem CBD Zugangsvereinbarungen oder Materialübertragungsvereinbarungen ausgehandelt, die einen Vorteilsausgleich vorsehen, an welche die betreffenden Parteien rechtlich gebunden sind.

Gleiches gilt für biologische Ressourcen, die illegal erworben wurden. Hierbei bleibt weiterhin ungeklärt, inwiefern ein Rechtsanspruch auf Vorteilsausgleich der Vertragspartei besteht, der die biologische Ressource entwendet wurde.

Abschließend kann somit festgehalten werden, dass die verhandelnden Vertragsparteien zur Vermeidung solcher rechtlicher Unklarheiten zwingend und unabhängig von den Vorgaben des CBD in schriftlicher Form rechtskräftige Materialübertragungsvereinbarungen aushandeln sollten, wie es von den Bonner Richtlinien vorgeschlagen wird. Dies führt letztendlich für jede beteiligte Vertragspartei zur Rechtssicherheit und Rechtsklarheit hinsichtlich der Verpflichtungen und Rechte, die im Hinblick auf den Zugang und den Ausgleich der aus dem Nutzen der biologischen Ressource entstehenden Vorteile einzuhalten sind.

3.2 Übereinkommen über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) – Handel mit genetischen Ressourcen

Auch der internationale Handel mit gefährdeten Tier- und Pflanzenarten trägt neben der Zerstörung von Lebensräumen und weiteren Ursachen wie Pathogene und Klimawandel zur Reduktion von Populationen und letztendlich auch zum Aussterben von bereits gefährdeten Tier- und Pflanzenarten bei. Im Hinblick auf den Betrieb von Genbanken stellt sich vielmehr die Frage, inwiefern der Erwerb zur Lagerung und der Austausch von genetischem Material auf internationaler Ebene der Regulierung durch CITES ebenfalls unterliegt und welche rechtlichen Normen auf der Ebene der EU sowie auf nationaler Ebene diesbezüglich berücksichtigt werden müssen.

Bereits 1933 wurde das sogenannte Londoner Artenschutzübereinkommen (Convention Relative to the Preservation of Fauna and Flora in their Natural State, 1933, 172 LNTS, 241) erlassen, das hauptsächlich den Handel mit afrikanischen Großtierarten regulieren sollte. Dieses Übereinkommen wurde von neun Vertragsstaaten unterzeichnet und gilt als Vorreiter des am 3. März 1973 in Washington zur Unterzeichnung ausgelegten Übereinkommens über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten von freilebenden Tier- und Pflanzenarten (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES, allgemein hierzu: Beyerlin, 2000, S. 190ff; Epiney & Scheyli, 2000, S. 270ff; Erbs & Kohlhaas, 2008, N17a; Sands, 2003, S. 505ff). Vorab wurden bereits seit 1967 mehrmals von der Weltnaturschutzunion (International Union for Conservation of Nature, IUCN) Entwürfe eines neuen Übereinkommens an alle Vertragsstaaten der Vereinten Nationen (United Nations, UN) gesandt. Darauf folgend, im Rahmen der Stockholmer Umweltkonferenz 1972, während der sich die Vertragsstaaten der UN erstmals für die Sicherheit der Umwelt auf globaler Ebene verantwortlich zeigten, wurde das Fundament für die Gründungskonferenz gelegt, die durch die USA 1973 in Washington D.C. einberufen wurde.

Ziel des Washingtoner Artenschutzübereinkommens ist somit die Gewährleistung eines umfassenden Schutzes gefährdeter Arten vor übermäßiger Ausbeutung aus wirtschaftlichen und kommerziellen Interessen durch Regulierung oder Verbot des internationalen Handels. Inzwischen wurde dieses international verbindliche Rechtsabkommen von 172 Staaten unterzeichnet in der Absicht, den internationalen Handel mit gefährdeten Arten, Teilen dieser Arten sowie erzeugten Derivaten soweit zu kontrollieren, dass das Überleben von

wildlebenden Tier- und Pflanzenarten nicht gefährdet wird (www.cites.org, Stand: 05.02.2009).

Seit dem ersten Februar 1984 ist das Washingtoner Artenschutzübereinkommen einheitlich und verbindlich durch die Verordnung (EG) Nr.338/97 des Rates vom 09. Dezember 1996 in der Europäischen Union ratifiziert.

Auf nationaler Ebene der Bundesrepublik Deutschland ist das Washingtoner Artenschutzabkommen durch die Eingliederung in die bereits bestehenden Gesetze und Verordnungen zum Schutz der Natur und wildlebender Tier- und Pflanzenarten umgesetzt. Somit sind auf nationaler Ebene das Bundesnaturschutzgesetz (BNatSchG) und die Bundesartenschutzverordnung (BArtSchV) zu berücksichtigen.

3.2.1 Das Schutzgut des Washingtoner Artenschutzübereinkommens

Bereits in der Präambel des Übereinkommens wird auf die Souveränität der Staaten hinsichtlich ihrer eigenen wilden Fauna und Flora verwiesen, wenn es heißt "the contracting states recognizing that peoples and states are and should be the best protectors of their own wild fauna and flora" (Erw. 3 CITES). Die Vertragsstaaten erkennen demnach an, dass die Völker und Staaten die besten Beschützer ihrer eigenen wilden Fauna und Flora sind und sein sollten. Hieraus erschließt sich unmittelbar ein Regulierungsinstrument auf nationaler Ebene, das es den Ausfuhrländern ermöglicht, die Ausfuhr von gefährdeten Tier- und Pflanzenarten, **Teilen davon** und auch erzeugten **Derivaten** zu kontrollieren und zu regulieren. Dementsprechend bedient sich das Übereinkommen der Ernennung zweier Instanzen, die von den Vertragsparteien eingerichtet werden müssen und die zur wissenschaftlichen Begutachtung und zur behördlichen Ausstellung von Ausfuhrgenehmigungen befähigt sind. Hierbei handelt es sich um eine oder mehrere wissenschaftliche Behörden, die staatlich berechtigt sind, wissenschaftliche handelsbezogene Begutachtungen hinsichtlich des Gefährdungsgrades einer Art durchzuführen. Zum anderen handelt es sich um sogenannte Vollzugsbehörden, die nach Beratung mit der wissenschaftlichen Behörde staatlich dazu berechtigt sind, die erforderlichen Genehmigungen und Zertifikate auszustellen (Art. IX Abs.1 CITES).

In Art. I lit. (a) CITES wird die Art definiert als jede Art, Unterart oder geografisch separierte Population davon, wodurch auch evolutionär bedeutenden Einheiten Rechnung getragen wird.

Wie bereits oben erwähnt, kontrolliert und reguliert CITES jedoch nicht nur den Handel mit gefährdeten Tierarten an sich, sondern auch den Handel mit Teilen davon und sogar daraus

hergestellten Derivaten. Art. I lit. (b) des Übereinkommens definiert den Begriff "Exemplar" als

- (i) jedes lebende oder tote Tier oder jede lebende oder tote Pflanze,
- (ii) bei Tieren: für die in den Anhängen I und II aufgeführten Arten einen ohne weiteres erkennbaren Teil des Tieres oder ein ohne weiteres erkennbares Erzeugnis aus dem Tier und für die in Anhang III aufgeführten Arten einen ohne weiteres erkennbaren Teil des Tieres oder ein ohne weiteres erkennbares Erzeugnis aus dem Tier, sofern in Anhang III in Verbindung mit der betreffenden Art aufgeführt,
- (iii) bei Pflanzen: einen ohne weiteres erkennbaren Teil der Pflanze oder ein ohne weiteres erkennbares Erzeugnis aus der Pflanze und bei den Anhängen II und III einen ohne weiteres erkennbaren Teil der Pflanze oder ein ohne weiteres erkennbares Erzeugnis aus der Pflanze, sofern in den Anhängen II und III in Verbindung mit der betreffenden Art aufgeführt.

Durch die Verwendung des Begriffes Derivat werden auch aus der Art gewonnene und hergestellte Güter erfasst, also auch Zelllinien, DNA, gewonnene biochemische Verbindungen und weitere molekulare Strukturen. Hierdurch wird der internationale Handel im Sinne eines Austausches im Rahmen des Betriebes einer Genbank durch CITES erfasst und dadurch reguliert und kontrolliert. Zum internationalen Transfer von genetischen Materialien, bezeichnet als Derivate, müssen demnach die rechtlichen Vorgaben durch CITES beachtet werden, wodurch der Handel nur durch Vorlage der entsprechenden Genehmigungen und Zertifikate möglich wird.

3.2.2 Die Regulierung des Handels durch CITES

Zur Regulierung des Handels werden Arten nach Art. II CITES in drei Kategorien unterteilt, die als Anhänge dem Text des Übereinkommens beigelegt sind. Je nach Anhang, dem eine betrachtete Art angehört, gilt ein für diese definiertes Schutzniveau. Die Anhänge bilden somit die Grundlage eines Bewilligungssystems, dem der internationale Handel unterworfen ist, und enthalten bisher über 5000 Tier- und 22500 Pflanzenarten (Weerth, 2008, S.7).

Anhang I enthält Arten, die unmittelbar vom Aussterben bedroht sind und deren Überleben direkt durch den kommerziellen internationalen Handel gefährdet wird. Anhang II umfasst jene Arten, die nicht notwendigerweise bereits vom Aussterben bedroht sind, jedoch durch nicht kontrollierten Handel gefährdet werden können. In Anhang III sind Arten aufgelistet, deren Handel bereits durch einzelne Mitgliedstaaten und deren nationale Gesetzgebung zur Vermeidung oder Einschränkung der Überexploration reguliert wird. Diese Vertragsparteien

ersuchen durch die Aufnahme von Arten in den Anhang III die internationale Kooperation zur Kontrolle des Handels und damit der Vermeidung einer nicht-nachhaltigen oder illegalen Exploration (Sands, 2003, S. 508).

Die Regulierung der Ausfuhr von Anhang I-Arten

Art. III CITES regelt sodann den Handel für die Arten des Anhangs I.

Zur Ausfuhr muss eine vorherige Ausfuhrgenehmigung erlangt werden, die nur dann ausgestellt wird, wenn eine wissenschaftliche Behörde des Ausfuhrstaates sich vergewissert hat, dass sich die Ausfuhr nicht nachteilig auf das Überleben der Art auswirkt. Hier wird deutlich, dass der Handel nicht gänzlich untersagt werden soll, sondern dass den Staaten ein gewisser Spielraum ermöglicht wird, solange durch eine nachhaltige Nutzung die Art vor dem Aussterben bewahrt bleibt (Beyerlin, 2000, S. 194). Ferner bedarf die Ausfuhrgenehmigung der Prüfung durch eine Vollzugsbehörde des Ausfuhrstaates, ob die Probe unter Verstoß gegen das nationale Recht zum Schutz der Fauna und Flora erlangt wurde. Ebenso muss der Exporteur der Vollzugsbehörde des Ausfuhrstaates darlegen, dass jede lebende Probe so präpariert und verschickt wird, dass das Risiko von Verletzungen, Gesundheitsschäden oder grausamen Behandlungen minimiert ist. Und schließlich muss zur Erteilung der Ausfuhrgenehmigung der Vollzugsbehörde eine zuvor bereits ausgestellte Importerlaubnis vorliegen (Art. III Abs.2 CITES).

Die Regulierung der Einfuhr von Anhang I-Arten

Ähnlich verhält es sich hinsichtlich der Einfuhr von gefährdeten Tier- und Pflanzenarten, Teilen davon und auch erzeugten Derivaten. Auch der Importeur ist, wenn der Einfuhrstaat dem Übereinkommen beigetreten ist, dazu verpflichtet, die Anforderungen des Übereinkommens zu erfüllen. Ebenso wie die Ausfuhr bedarf die Einfuhr einer Genehmigung in Form einer Einfuhrgenehmigung und ferner einer zusätzlichen Ausfuhrgenehmigung oder einer Wiederausfuhrbescheinigung. Um eine solche Einfuhrgenehmigung zu erlangen, muss durch eine wissenschaftliche Behörde des Einfuhrstaates bestätigt werden, dass die Einfuhr nicht zu Zwecken verwendet wird, die sich nachteilig auf das Überleben der Art auswirken. Auch muss von einer Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates versichert werden, dass der Empfänger des Importes ausreichend ausgestattet ist, um diese Art zu halten und für sie zu sorgen. Zudem muss ebenfalls eine Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates sich vergewissern, dass die Probe nicht in erster Linie für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Die Regulierung der Wiederausfuhr von Anhang I-Arten

Auch die Wiederausfuhr bedarf der vorherigen Genehmigung und Vorlage einer Wiederausfuhrbescheinigung, die ebenfalls nur dann von der Vollzugsbehörde des Wiederausfuhrstaates ausgestellt wird, wenn der Import in einen Staat im Einklang mit den Bestimmungen des Übereinkommens erfolgt und zudem der Transport unter solchen Bedingungen stattfindet, die das Risiko von Verletzungen, Gesundheitsschäden oder grausamen Behandlungen minimieren. Letztendlich muss der Vollzugsbehörde des Wiederausfuhrstaates eine genehmigte Importerlaubnis – ausgestellt durch die Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates – vorgelegt werden, welche den Import von jeglicher lebenden Probe erlaubt (Art. III Abs. 4 CITES).

Die Regulierung der Einfuhr aus dem Meer von Anhang I-Arten

Ein zu Beginn der Diskussionen zur Umsetzung von CITES recht heikler Themenpunkt war die Einbringung von Proben der Arten des Anhangs I aus dem Meer, genauer aus Meeresgebieten, die nicht der Rechtsprechung eines Staates unterliegen. Für diesen Fall sieht das Übereinkommen ebenfalls die Notwendigkeit der vorherigen Genehmigung einer Bescheinigung vor, die nur dann von der autorisierten Vollzugsbehörde ausgestellt wird, wenn zuvor eine wissenschaftliche Behörde des Staates, der die Proben einführen will, bestätigt, dass sich die Einfuhr nicht negativ auf das Überleben der Art auswirkt. Auch muss die Vollzugsbehörde davon überzeugt werden, dass der vorgesehene Empfänger ausreichend ausgestattet ist, um diese Art zu halten und für sie zu sorgen, und auch davon, dass die Einfuhr dieser Proben primär nicht zu kommerziellen Zwecken erfolgt (Art. III Abs. 5 CITES).

Resümierend kann somit festgehalten werden, dass der Handel zu nicht-kommerziellen Zwecken, z.B. für wissenschaftliche Forschung von Arten des Anhangs I dann gestattet wird, wenn die entsprechenden Genehmigungen und Bescheinigungen nach Art. III CITES vorliegen und die genannten Aspekte des Übereinkommens berücksichtigt werden.

Werden also Proben nur zu wissenschaftlichen Zwecken in Genbanken gelagert, können diese ausgeführt, wiederausgeführt und eingeführt sowie aus dem Meer eingebracht werden, solange der damit verbundene nicht-kommerzielle Handel sich nicht negativ auf das Überleben der Art auswirkt und die Anforderungen von CITES eingehalten werden. Für kommerzielle Zwecke herrscht, wie vorstehend dargelegt, ein absolutes Handelsverbot.

Die Regulierung der Ausfuhr von Anhang II-Arten

Art. IV CITES regelt den Handel mit Arten des Anhangs II, also Arten, die nicht notwendigerweise direkt vom Aussterben bedroht sind, jedoch bedroht werden können, wenn der Handel mit ihnen nicht reguliert wird. Auch bezüglich dieser Arten bedarf es einer vorherigen Ausfuhrgenehmigung, die ebenfalls von der Vollzugsbehörde des Ausfuhrstaates nur dann ausgestellt wird, wenn die gleichen Bedingungen erfüllt werden wie bei der Ausfuhr von Arten des Anhangs I.

Somit muss eine wissenschaftliche Behörde des Ausfuhrlandes bestätigen, dass die Ausfuhr sich nicht nachteilig auf das Überleben der Art auswirken wird. Zudem muss die Vollzugsbehörde des Ausfuhrstaates sich davon überzeugen, dass die Exemplare in Einklang mit dem nationalen Recht des Ausfuhrstaates zum Schutz der Fauna und Flora erlangt wurden und dass der Transport unter solchen Bedingungen stattfindet, die das Risiko von Verletzungen, Gesundheitsschäden oder grausamen Behandlungen minimieren (Art. IV Abs. 2 CITES).

Allerdings erfordert die Ausfuhr von Arten des Anhangs II nicht die Vorlage einer gültigen Einfuhrgenehmigung, wodurch der Handel deutlich erleichtert wird (Epiney & Scheyli, 2000, S. 272ff). Ein wesentlicher Aspekt, der bei den Arten des Anhangs II hinzukommt, ist das Monitoring, d.h. die Überwachung der Erteilung von Ausfuhrgenehmigungen und des tatsächlichen aktuellen Exportes der Exemplare. Diesbezüglich soll eine wissenschaftliche Behörde jeder Vertragspartei die Erteilung der Ausfuhrgenehmigungen sowie den aktuellen Export von Exemplaren der Arten des Anhangs II überwachen.

Wird durch die wissenschaftliche Behörde ermittelt, dass durch die Ausfuhr von Proben dieser Arten deren Lebensraum oder deren Rolle im Ökosystem nachteilig beeinflusst wird, soll der Export limitiert werden. Dies soll geschehen noch bevor sich die Art für die Aufnahme in den Anhang I qualifiziert. Dementsprechend soll dann die wissenschaftliche Behörde die Vollzugsbehörde des Ausfuhrstaates benachrichtigen, die dann angemessene Maßnahmen zur Limitierung der Vergabe von Ausfuhrgenehmigungen für Exemplare dieser Arten vornehmen muss (Art. IV Abs. 3 CITES).

Die Regulierung der Einfuhr von Anhang II-Arten

Die Einfuhr von Exemplaren der Anhang II-Arten erfordert wiederum die vorherige Genehmigung und die Vorlage entweder einer Ausfuhrgenehmigung oder einer Wiederausfuhrbescheinigung. Die Darlegung einer in erster Linie nicht kommerziellen Nutzung von Exemplaren der Anhang II-Arten ist nicht vorgesehen (Art. IV Abs. 4 CITES). Auch dies zeigt die deutlich geringere Schutzstufe der Anhang II-Arten und stellt somit eine enorme Erleichterung für den Handel mit Arten dieses Anhangs dar.

Die Regulierung der Wiederausfuhr von Anhang II-Arten

Bezüglich der Wiederausfuhr von Proben der Anhang II-Arten fordert CITES wiederum die vorherige Ausstellung einer Wiederausfuhrbescheinigung. Diese soll nur dann von der Vollzugsbehörde des Staates, der die Exemplare wieder ausführen möchte, erteilt werden, wenn die Einfuhr in einen Staat im Einklang mit den Bestimmungen des Übereinkommens erfolgt und zudem der Transport unter solchen Bedingungen stattfindet, die das Risiko von Verletzungen, Gesundheitsschäden oder grausamen Behandlungen minimieren (Art. IV Abs 5 CITES).

Die Regulierung der Einfuhr aus dem Meer von Anhang II-Arten

Die Einführung von Exemplaren der Anhang II-Arten aus Meeresgebieten, die keiner staatlichen Regulation unterliegen, erfordert lediglich die vorherige Ausstellung einer Bescheinigung, die von der Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates erteilt werden muss. Die Einführung wird jedoch nur dann genehmigt, wenn zuvor die wissenschaftliche Behörde des Einfuhrstaates bestätigt, dass das Einführen von Proben solcher Arten sich nicht negativ auf das Überleben der Art auswirkt. Ferner muss sich die Vollzugsbehörde hinsichtlich des Transportes vergewissern, dass dieser unter Bedingungen stattfindet, die das Risiko von Verletzungen, Gesundheitsschäden oder grausamen Behandlungen minimieren. Die Notwendigkeit einer Darlegung der in erster Linie nicht-kommerziellen Nutzung ist nicht erforderlich (Art. IV Abs. 6 CITES).

Art. IV Abs.7 CITES verweist darauf, dass die genannten Zertifikate aus Abs. 6 von der Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates möglicherweise nach Beratung mit der wissenschaftlichen Behörde, im Einvernehmen mit anderen nationalen wissenschaftlichen Behörden oder mit adäquaten internationalen wissenschaftlichen Behörden für einen Zeitraum von nicht länger als einem Jahr für die Gesamtanzahl der Proben erteilt werden, die in einem solchen Zeitraum eingeführt werden sollen.

Aus den hier erörterten Aspekten des Art. IV CITES kann somit festgehalten werden, dass ein internationaler Handel mit Proben von Anhang II-Arten durchaus sowohl zur Lagerung in Genbanken für wissenschaftliche Zwecke als auch zur kommerziellen Nutzung erfolgen kann, wenn die genannten Bestimmungen des Art. IV eingehalten werden und die notwendigen vorherigen Genehmigungen und Bescheinigungen vorliegen. Hierdurch wird gewährleistet, dass der in diesem Rahmen erfolgende Handel sich nicht nachteilig auf das Überleben der gehandelten Arten auswirkt. Die gleichzeitig rechtlich festgelegte Überwachung der Erteilung von Ausfuhrgenehmigungen und der Ausfuhr an sich ermöglicht zudem das Eingreifen, die Limitierung von Ausfuhrgenehmigungen. Dadurch wird ein

weiterer, durch den Handel hervorgerufener Populationsrückgang gefährdeter Arten vermieden.

Die Regulierung der Ausfuhr von Anhang III-Arten

Die Ausfuhr von Proben der in Anhang III aufgeführten Arten erfordert ebenfalls eine vorherige Ausfuhrgenehmigung, wie sich aus Art. V Abs. 2 CITES ergibt. Hier gelten die gleichen Bedingungen wie für die Ausfuhr von Arten der Anhänge I und II.

Wiederum zu beachten ist, dass die Vorlage einer gültigen Einfuhrgenehmigung hinsichtlich der Arten des Anhangs III nicht erforderlich ist.

Die Regulierung der Einfuhr von Anhang III-Arten

Die Einfuhr von Proben der Anhang III-Arten erfordert lediglich die vorherige Präsentation eines Ursprungszeugnisses und in dem besonderen Fall, dass die einzuführende Probe aus dem Vertragsstaat importiert werden soll, der die Art in den Anhang III aufgenommen hat, eine zusätzliche Ausfuhrgenehmigung (Art. V Abs. 3 CITES).

Die Regulierung der Wiederausfuhr von Anhang III-Arten

Im Falle der Wiederausfuhr ist eine von der Vollzugsbehörde des Ausfuhrstaates ausgestellte Bescheinigung notwendig, durch die bestätigt wird, dass die Probe in diesem Land verarbeitet worden ist oder unverändert wieder ausgeführt wird. Diese Bescheinigung soll sodann von der Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates akzeptiert werden und als Beweis für die Einhaltung der Vorschriften der Konvention dienen (Art. V Abs.4 CITES). Generell ist eine Versicherung der primär nicht-kommerziellen Nutzung sowie ein Monitoring der Erteilung von Genehmigungen und der aktuellen Ausfuhr an sich nicht erforderlich. Somit können hinsichtlich des Erwerbes von Proben der in Anhang III aufgeführten Arten zur Lagerung in Genbanken und auch zur weiteren kommerziellen Nutzung Exemplare dieser Arten ausgeführt, wiederausgeführt und eingeführt sowie aus dem Meer eingebracht werden, wenn die hier beschriebenen Genehmigungen und Zertifikate vorliegen.

Ausnahmen und andere spezielle handelsbezogene Bestimmungen

Artikel VII CITES behandelt Ausnahmen, die vor dem Hintergrund des Betriebs einer Genbank von enormer Bedeutung sind.

Für den Fall, dass durch eine Vollzugsbehörde eines Ausfuhrstaates festgestellt wird, dass Exemplare vor Inkrafttreten des CITES erworben wurden, wird durch Art. VII Abs. 2 festgelegt, dass die Bestimmungen der Art. III-V auf diese Exemplare nicht angewandt werden sollen. Diesbezüglich ist die Vollzugsbehörde dazu ermächtigt ein "Vor-

Übereinkommen-Zertifikat" (Sands, 2003, S. 511) auszustellen, welches dann den Handel ermöglicht.

Von großer Relevanz erweisen sich weiterhin Art. VII Abs. 4 und 5 CITES (Beyerlin, 2000, S. 193ff). Ersterer bestimmt, dass Tierarten des Anhangs I, die in Gefangenschaft im Sinne kommerzieller Zwecke gezüchtet wurden, oder Pflanzenarten, die ebenfalls für kommerzielle Zwecke künstlich vermehrt wurden, nicht länger als Arten des Anhangs I erachtet werden, sondern den Arten des Anhangs II gleichgestellt werden. Dies bedeutet, dass mit diesen Exemplaren weiterhin nach Art. IV CITES zu verfahren ist, wodurch die Lagerung in Genbanken und auch die kommerzielle Nutzung möglich werden, wenn die entsprechenden Zertifikate und Genehmigungen der betreffenden Vollzugsbehörden vorliegen.

Dies wird zudem erleichtert, da es Art. VII Abs. 5 CITES ermöglicht, durch die Vorlage eines einzigen Zertifikates, ausgestellt durch die Vollzugsbehörde des Landes, in dem die Nachzucht stattgefunden hat, die Vorlage sämtlicher Zertifikate und Genehmigungen zu ersetzen, die durch die Bestimmungen der Art. III-V CITES erforderlich sind.

Bedeutender jedoch ist Art. VII Abs. 6 CITES. Der oben bereits erwähnte Fall des nicht-kommerziellen Handels, also auch der Erwerb zu einer nicht-kommerziellen Zwecken dienenden Lagerung von Proben der Arten der Anhänge I, II und III CITES in Genbanken, wird durch Art. VII Abs. 6 CITES erheblich erleichtert. Der Export, Re-Export und Import sowie die Einführung von Exemplaren aus dem Meer und aus der Wildnis der Arten der Anhänge I, II und III bleibt nach den Vorgaben der Art. III-V CITES weiterhin auch im Falle einer nicht-kommerziellen Nutzung genehmigungspflichtig. Art. VII Abs. 6 CITES bestimmt aber, dass die aus den Artikeln III-V CITES resultierenden Anforderungen des Übereinkommens im Falle einer nicht-kommerziellen Leihgabe, einer Spende oder des Austausches zwischen Wissenschaftlern oder wissenschaftlichen Institutionen, die bei einer Vollzugsbehörde ihres Staates registriert sind, nicht angewendet werden sollen. Ausgetauscht werden dürfen somit Herbariumsexemplare, sonstige haltbargemachte, getrocknete oder festumschlossene Museumsexemplare sowie lebende Pflanzen, die ein Etikett tragen, das durch die Vollzugsbehörde ausgestellt oder bestätigt wurde (Art. VII Abs. 6 CITES).

3.2.3 Zusammenfassende Betrachtung im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank

Für den Betrieb von Genbanken gilt nach den vorstehenden Darlegungen, dass Arten des Anhangs I, die erstmalig der Wildnis entnommen wurden, nicht hauptsächlich kommerziell gehandelt werden dürfen, wobei Handel nach Art. I lit. c CITES ausschließlich definiert ist als Ausfuhr, Wiederausfuhr, Einfuhr und Einbringung aus dem Meer. Somit unterliegt der Handel mit Proben der in den Anhängen I, II und III CITES aufgeführten Arten bei Genbanken mit kommerzieller Absicht den entsprechenden Anforderungen der Art. III, IV und V CITES. Die verwendete Formel "primary commercial purposes" ist sehr missverständlich und führt je nach Betrachtung zu unterschiedlichen Auslegungsmöglichkeiten, die theoretisch auch den kommerziellen Handel mit Anhang I-Arten erlauben würden. Diesbezüglich haben die Vertragsstaaten im April 1985 auf der Konferenz von Buenos Aires (Argentinien) die Präzisierung dieser Terminologie versucht und durch die Resolution 5.10 festgehalten. In Absatz 3 der generellen Prinzipien der Resolution wird der Ausdruck "primary commercial purposes" einvernehmlich definiert als alle Verwendungen, deren nicht-kommerzielle Aspekte nicht klar vorherrschen. Folglich wird der Import von Exemplaren der Anhang I-Arten nicht erlaubt. Die Beweislast für die klare nicht-kommerzielle Intention liegt bei den Personen oder Rechtsträgern, die um einen solchen Import ersuchen (Resolution of the fifth Conference of the Parties, 1985, Conf. 5.10, S. 1).

Die Lagerung genetischer Materialien von Exemplaren, die vor dem Inkrafttreten des Übereinkommens erworben wurden, entzieht sich dem rechtlichen Anwendungsbereich des CITES. Der Handel mit diesen Materialien bedarf allerdings einer Bescheinigung, die den Erwerb vor Inkrafttreten von CITES bestätigt und von der Vollzugsbehörde des Exportlandes auszustellen ist (Art. VII Abs. 2 CITES).

Artikel VII Abs. 4 und 5 CITES ermöglicht die Lagerung von Exemplaren der Tiere des Anhangs I, die in Gefangenschaft für kommerzielle Zwecke gezüchtet wurden. Durch die Vorlage eines Zertifikates, welches die Dokumente ersetzt, die durch Art. III erforderlich werden, wird der Handel erleichtert. Im Hinblick auf Arten der Anhänge II und III gilt diese Erleichterung für Exemplare, die in Gefangenschaft gezüchtet wurden. Auch hier kann durch die Vorlage eines Zertifikates, welches die Dokumente ersetzt, die durch die Art. IV und V CITES notwendig sind, der Handel erleichtert werden. Exemplare von Zuchttieren, die als solche durch die entsprechende Vollzugsbehörde zertifiziert sind, können somit unbedenklich in Genbanken gelagert und konserviert werden.

Artikel VII Abs. 6 CITES erleichtert zudem den Austausch zu wissenschaftlichen Zwecken. In Genbanken gelagerte Proben werden meistens durch extreme Abkühlung und die anschließende Lagerung in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs haltbar gemacht. Sie sind

somit im Sinne des Art. VII Abs. 6 CITES "andere konservierte Proben". Daher können bereits gelagerte Proben von Arten der Anhänge I, II und III CITES ohne Berücksichtigung der genannten Anforderungen zwischen Genbanken zu nicht-kommerziellen Zwecken - also zur wissenschaftlichen Forschung - ausgetauscht werden, solange sie ein Kennzeichen der Vollzugsbehörde des Landes tragen, in dem sich die Genbank befindet und die jeweiligen Genbanken als wissenschaftliche Institutionen bei den entsprechenden Vollzugsbehörden registriert sind. In den genannten Fällen wird auf eine Genehmigungspflicht verzichtet, solange die Proben und die wissenschaftliche Institution bei der entsprechenden Vollzugsbehörde registriert sind.

3.2.4 Die Umsetzung von CITES auf der Ebene der Europäischen Gemeinschaft

Das völkerrechtliche Übereinkommen stellt den Rahmen zur Handhabung des internationalen Handels mit gefährdeten Tier- und Pflanzenarten dar. Als Völkervertragsrecht (Witte & Wolfgang, 1998, RdNr. 47) verpflichtet es zwar die einzelnen Vertragsstaaten, ist auf nationaler Ebene aber kein unmittelbar geltendes Recht. Somit ist zu beachten, dass hinsichtlich des Betriebes einer Genbank in der Bundesrepublik Deutschland letztendlich das nationale Recht heranzuziehen ist, durch welches CITES umgesetzt ist.

Aus der vorherigen Auseinandersetzung mit den CITES-Inhalten wurde deutlich, dass grundsätzlich der Handel mit gefährdeten Arten untersagt ist und nur dann rechens ist, wenn bestimmte Bedingungen und Normen eingehalten werden. Somit bleiben im Falle einer nicht-kommerziellen Nutzung sowohl die Ausfuhr, die Wiederausfuhr und die Einfuhr als auch die Einbringung aus dem Meer von Arten der Anhänge I, II und III CITES nach den Vorgaben der Art. III, IV und V CITES genehmigungspflichtig. Exemplare, die vor Inkrafttreten von CITES erworben wurden, können durch ein spezielles Zertifikat von den Anforderungen des Übereinkommens befreit werden (Art. VII Abs. 2 CITES). Hinsichtlich des nicht-kommerziellen Austausches zwischen wissenschaftlichen Institutionen zur wissenschaftlichen Forschung kann unter Berücksichtigung von Art. VII Abs. 6 CITES von einer Genehmigungspflicht abgesehen werden, wenn vorab die wissenschaftlichen Institutionen bei der Vollzugsbehörde des jeweiligen Landes registriert wurden. Dadurch kann der nicht-kommerzielle Handel in diesem Sinne ungehindert erfolgen. Es bedarf lediglich der Kennzeichnung der Proben durch die Vollzugsbehörde des Landes in dem die wissenschaftlichen Institutionen beheimatet sind.

Bei der Umsetzung in Deutschland müssen die Vorgaben der EG Verordnung Nr. 338/97, die entsprechende Durchführungsverordnung (EG) Nr. 865/2006 sowie die betreffenden

Bundesgesetze (Gesetz zum Washingtoner Artenschutzübereinkommen, BNatSchG, BArtSchV) näher betrachtet werden.

3.2.4.1 Verordnung (EG) Nr. 338/97: Über den Schutz von Exemplaren wildlebender Tier- und Pflanzenarten durch Überwachung des Handels

Das Übereinkommen über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen wurde in der Europäischen Gemeinschaft mit der VO (EG) Nr. 3626/82 mit Wirkung von 1. Januar 1984 erstmals durchgeführt. Da sich wissenschaftliche Kenntnisse und die Strukturen des Handels mit der Zeit änderten, musste die VO (EG) Nr. 3626/82 geändert werden. Sie wurde letztendlich durch die VO (EG) Nr. 338/97 vom 9. Dezember 1996 ersetzt.

Bereits in der Präambel in Erwägung 1 der VO (EG) Nr. 338/97 wird betont, dass durch ihr Inkrafttreten das völkerrechtliche Übereinkommen über den Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen (CITES) auf der Ebene der EU umgesetzt wird. Dabei gilt es festzuhalten, dass mit der EG-Verordnung eine Form des europäischen Sekundärrechts zur Umsetzung gewählt wurde, welche die Normadressaten, unmittelbar und übergeordnet zum nationalen Recht, bindet (Art. 249 Abs. 2 EGV). Bereits im Mai 1975 wurde auf nationaler Ebene der BRD durch das Gesetz zu dem Übereinkommen über den internationalen Handel mit gefährdeten Tierarten und Pflanzen dem CITES zugestimmt.

Hinsichtlich der bereits völkerrechtlich diskutierten Frage zum Umgang mit in Gefangenschaft geborenen Exemplaren und für das Verleihen, Verschenken oder Tauschen von Exemplaren zwischen registrierten wissenschaftlichen Einrichtungen zur unkommerziellen Forschung, wird ebenfalls bereits in der Präambel der VO (EG) Nr. 865/2006 deutlich hervorgehoben, dass besondere Vorschriften zu deren Regulierung getroffen werden müssen. Auch was den Handel mit Exemplaren angeht, die vor Inkrafttreten des CITES und der VO (EG) Nr. 338/97 des Rates erworben wurden, sowie mit Exemplaren nachfolgender Generationen, die unter kontrollierter Umgebung gezeugt wurden, gilt es besondere Bestimmungen zu berücksichtigen [Art. 8 Abs.3 lit. a VO (EG) Nr.338/97, VO (EG) Nr. 865/2006]. Diese sind gerade im Hinblick auf den Betrieb einer Genbank von enormer Bedeutung und sollen einen der Schwerpunkte der folgenden Betrachtungen bilden.

Das Schutzgut nach der Verordnung

Art. 1 VO (EG) Nr. 338/97 definiert das Ziel der Verordnung - den Schutz und die Erhaltung wildlebender Tier- und Pflanzenarten durch die Regelung des Handels - als im Einklang mit den Zielen, Grundsätzen und Bestimmungen des Art. II CITES.

Art. 3 VO (EG) Nr. 338/97 erläutert den verordnungsrechtlichen Geltungsbereich und somit letztlich das erfasste Schutzgut. Hierbei fällt auf, dass im Gegensatz zum CITES die in den Geltungsbereich der Verordnung fallenden Tier- und Pflanzenarten nicht in drei Anhänge unterteilt, sondern in vier Anhänge eingeordnet werden, die eine detaillierte Betrachtung des Gefährdungsgrades der Arten ermöglichen (Art. III Abs. 1-4 CITES). So enthält Anhang A VO (EG) Nr. 338/97 neben den in Anhang I CITES aufgeführten Arten einen Großteil der bisher in Anhang C Teil 1 der VO (EG) Nr. 3626/82 geschützten Arten der Anhänge II und III CITES und einige, die durch andere europäische Rechtsnormen geschützt sind und nicht in den CITES Anhängen aufgeführt sind (Weerth, 2008, S. 5). Bei Arten des Anhangs B VO (EG) Nr. 338/97 handelt es sich bis auf 50 Arten um die Arten der Anhänge II und III CITES. Anhang C enthält ca. 200 Arten des Anhangs III CITES. Anhang D enthält bisher nur wenige Arten, deren Einfuhr in die Gemeinschaft eine Überwachung rechtfertigt (Edmonds, 1997, S. 27). Die oben erwähnten weiteren europäischen Rechtsnormen wären die FFH-Richtlinie 92/43/EWG und die Vogelschutzrichtlinie 79/409/EWG.

Einfuhr in die Gemeinschaft zum Zwecke der Lagerung in Genbanken

Einfuhr von Anhang A-Arten

Die Einfuhrbedingungen von Arten des Anhangs A VO (EG) Nr. 338/97 entsprechen den Bestimmungen, die durch Art. III CITES zum Umgang mit Arten des Anhangs I CITES festgelegt sind. Anhang A-Arten bedürfen zum Import einer Einfuhrgenehmigung der Vollzugsbehörde des Bestimmungsmitgliedstaates, die der Einfuhrzollstelle vorzulegen ist. Diese wird nur ausgestellt, wenn die wissenschaftliche Behörde unter Berücksichtigung jeglicher Stellungnahmen der wissenschaftlichen Prüfgruppe versichert, dass die Einfuhr in die Gemeinschaft den Erhaltungsstatus der Art oder das Verbreitungsgebiet der Population der betreffenden Art nicht beeinträchtigt.

Im Falle der Einfuhr aus einem Drittland ist eine Ausfuhrgenehmigung oder eine Wiederausfuhrbescheinigung erforderlich, die von einer zuständigen Behörde des Ausfuhr- bzw. Wiederausfuhrlandes ausgestellt worden ist. Ferner muss sich die wissenschaftliche Behörde vergewissert haben, dass die Unterbringung zur Erhaltung und Pflege lebender Exemplare im Bestimmungsland angemessen ausgestattet ist. Die Vollzugsbehörde dagegen muss sich vergewissert haben, dass das Exemplar nicht zu hauptsächlich kommerziellen Zwecken verwendet wird. Auch muss diese nach Rücksprache mit der

wissenschaftlichen Behörde sicherstellen, dass sonstige Belange des Artenschutzes der Einfuhrgenehmigung nicht entgegenstehen. Hinsichtlich der Einbringung eines lebenden Exemplars aus dem Meer muss sich die Vollzugsbehörde vergewissern, dass der Transport so umgesetzt wird, dass möglichst die Gefahr der Verletzung, der Gesundheitsschädigung und der Tierquälerei auf ein Minimum beschränkt bleibt.

Einfuhr von Anhang B-Arten

Hinsichtlich der Einfuhr von Arten des Anhangs B in die Gemeinschaft ist ebenfalls eine Einfuhrgenehmigung der Vollzugsbehörde des Bestimmungsstaates notwendig, die der Einfuhrzollstelle vorzulegen ist [Art. 4 Abs. 2 VO (EG) Nr. 338/97]. Die Erteilung der Genehmigung wird wiederum nur dann ausgestellt, wenn von der zuständigen wissenschaftlichen Behörde unter Berücksichtigung der Anforderungen des Art. 4 Abs. 2 lit a VO (EG) Nr. 338/97 sichergestellt wird, dass die Einfuhr der Exemplare, sowie erstmalig auch der voraussichtliche Umfang des Handels, den Erhaltungsstatus der Art oder das Verbreitungsgebiet der Population der betreffenden Art nicht beeinträchtigt. Im Vergleich zu Exemplaren von Arten des Anhangs A ist im Hinblick auf Arten des Anhangs B nicht mehr notwendig, dass sich die Vollzugsbehörde vergewissert, dass das Exemplar nicht für hauptsächlich kommerzielle Zwecke verwendet wird. Ein kommerzieller Handel ist somit erlaubt.

Einfuhr von Anhang C-Arten

Auch hinsichtlich der in Anhang C genannten Arten ist der kommerzielle Handel erlaubt. Der Nachweis des nicht hauptsächlich kommerziellen Handels ist nicht notwendig. Bei der Einfuhr besteht lediglich die Notwendigkeit der Einfuhrmeldung. Im Falle der Ausfuhr aus einem Land, das im Zusammenhang mit der betreffenden Art in Anhang C genannt ist, ist durch eine Ausfuhrgenehmigung zu bestätigen, dass die Exemplare unter Einhaltung der einzelstaatlichen Vorschriften über die Erhaltung der betreffenden Art erworben wurden. Im Falle der Ausfuhr oder der Wiederausfuhr aus einem Land, das nicht in Zusammenhang mit der betreffenden Art in Anhang C genannt wird, bedarf es einer Ausfuhr- bzw. Wiederausfuhrgenehmigung oder einer Ursprungsbescheinigung von einer zuständigen Behörde des Ausfuhr- oder Wiederausfuhrlandes [Art. 4 Abs. 3 VO (EG) Nr. 338/97].

Einfuhr von Anhang D-Arten

Bei den Arten des Anhangs D bedarf es nur einer Einfuhrmeldung, die der Einfuhrzollstelle vorzulegen ist. Diese Arten dürfen somit gehandelt und auch zu kommerziellen Zwecken verwendet werden [Art. 4 Abs. 4 VO (EG) 338/97].

Ausfuhr aus der Gemeinschaft

Auch die Bestimmungen zur Ausfuhr berücksichtigen die verschiedenen Gefährdungseinstufungen der Arten durch die Berücksichtigung der einzelnen Anhänge. Die Ausfuhr aus der Gemeinschaft regelt Art. 5 VO (EG) Nr. 338/97.

Generell besteht die Notwendigkeit der Vorlage einer Ausfuhrgenehmigung bzw. einer Wiederausfuhrbescheinigung.

Ausfuhr von Anhang A-Arten

Hinsichtlich Arten des Anhangs A werden eine Ausfuhrgenehmigung bzw. eine Wiederausfuhrgenehmigung nur dann ausgestellt, wenn die zuständige wissenschaftliche Behörde schriftlich zugestimmt hat, dass der Fang oder die Entnahme von Exemplaren den Erhaltungsstatus der betroffenen Art oder das Verbreitungsgebiet der betreffenden Population dieser Art nicht beeinträchtigt. Ferner muss der Antragsteller mit Hilfe von Dokumenten sicherstellen, dass er das Exemplar nach den geltenden Rechtsvorschriften zum Schutz der betreffenden Art erworben hat. Ist der Staat, in dem der Antrag gestellt wird, nicht gleich dem Ursprungsstaat der Art, muss ein Nachweis in Form einer Bescheinigung erbracht werden, der bestätigt, dass das Exemplar nach den geltenden Rechtsvorschriften des Landes seines natürlichen Vorkommens entnommen wurde. Die zuständige Vollzugsbehörde muss sich zudem vergewissern, dass lebende Exemplare so transportiert werden, dass die Gefahr von Verletzungen, Gesundheitsschädigungen oder Tierquälerei minimiert ist. Da der Anhang A auch Arten enthält, die nicht in Anhang I CITES aufgeführt sind, muss sich ebenfalls die Vollzugsbehörde diesbezüglich versichern, dass solche Arten nicht für hauptsächlich kommerzielle Zwecke verwendet werden. Letztlich muss ebenfalls von der zuständigen Vollzugsbehörde sichergestellt werden, dass eine Einfuhrgenehmigung durch eine Vollzugsbehörde des Einfuhrstaates vorliegt und keine weiteren Belange des Artenschutzes der Erteilung der Ausfuhrgenehmigung entgegenstehen [Art. 5 Abs. 1 u. 2 VO (EG) Nr. 338/97].

Die Ausstellung einer Wiederausfuhrbescheinigung erfordert ebenfalls die Sicherstellung der oben genannten Anforderungen hinsichtlich des Transportes, der nicht hauptsächlich kommerziellen Nutzung sowie der Vorlage einer Einfuhrgenehmigung. Zudem ist der

Antragsteller dazu verpflichtet, mit Hilfe von Dokumenten nachzuweisen, dass die vorherige Einfuhr gemäß den Vorschriften der VO (EG) Nr. 338/97 stattfand. Im Falle der Einfuhr vor dem Inkrafttreten dieser Verordnung ist zu belegen, dass die Einfuhr nach den Bestimmungen der Verordnung (EWG) Nr. 3626/82 stattfand. Im Falle der Einfuhr vor 1984 ist darzulegen, dass das Exemplar gemäß den Vorschriften des Übereinkommens (CITES) erstmalig eingeführt wurde oder rechtmäßig in den Mitgliedsstaat eingeführt wurde, bevor genannte Verordnungen oder Übereinkommen in Kraft traten [Art. 5 Abs. 3 VO (EG) Nr. 338/97].

Ausfuhr von Anhang B und C-Arten

Auch zur Ausfuhr von in den Anhängen B und C geführten Arten ist der Abfertigungszollstelle eine Ausfuhrgenehmigung oder eine Wiederausfuhrbescheinigung von der Vollzugsbehörde des Landes, in dem sich das Exemplar befindet, vorzulegen. Diese werden nur dann ausgestellt, wenn die zuvor schon genannten Bestimmungen für Anhang A Arten erfüllt sind, ausgenommen des Nachweises der Ausfuhr für nicht hauptsächlich kommerzielle Zwecke sowie der vorherigen Vorlage einer Einfuhrgenehmigung. Die Wiederausfuhrbescheinigung wird nur dann ausgestellt, wenn die Anforderungen an den Transport [Art. 5 Abs. 2 lit. c, i VO (EG) Nr. 338/97] erfüllt sind und keine sonstigen Belange des Artenschutzes der Erteilung entgegenstehen [Art. 5 Abs. 2 lit. d VO (EG) Nr. 338/97]. Zudem müssen die Exemplare nach den Vorschriften dieser Verordnung eingeführt werden, oder es muss der Nachweis erbracht werden, dass die Exemplare vor Inkrafttreten der oben genannten Verordnungen und Übereinkommen in den Mitgliedsstaat eingebracht wurden [Art. 5 Abs. 4 VO (EG) Nr. 338/97].

Bezüglich der Exemplare, die vor mehr als 50 Jahren erworben wurden, oder toter Exemplare und Teilen sowie Erzeugnissen aus solchen, ist der Nachweis nicht zu erbringen, dass der Fang oder die Entnahme aus der Natur oder die Ausfuhr den Erhaltungsstatus der Art oder das Verbreitungsgebiet der Population der betreffenden Art gefährden. Auch muss nicht nachgewiesen werden, dass die Nutzung nicht zu hauptsächlich kommerziellen Zwecken stattfindet [Art. 5 Abs. 6 VO (EG) Nr. 338/97].

Ausfuhr von Anhang D-Arten

Für die Ausfuhr von Anhang D-Arten sieht die VO (EG) Nr. 338/97 keine Bestimmung vor.

Generelle Verbote, Abweichungen und Ausnahmen

Generell gilt: Exemplare des Anhangs A dürfen weder gekauft, zum Kauf angeboten, zu kommerziellen Zwecken erworben, zur Schau gestellt, zu kommerziellen Zwecken verwendet, verkauft, vorrätig gehalten, angeboten oder zu Verkaufszwecken befördert werden [Art. 8 Abs.1 VO (EG) Nr. 338/97]. Dies gilt ebenfalls für Exemplare des Anhangs B [Art. 8 Abs.5 VO (EG) Nr. 338/97], es sei denn, sie sind gemäß den Rechtsvorschriften über die Erhaltung der wildlebenden Tier- und Pflanzenarten erworben worden.

Auch der Besitz von Tieren des Anhangs A, insbesondere von lebenden, kann von den Mitgliedsstaaten verboten werden [Art. 8 Abs.2 Verordnung (EG) Nr. 338/97]. Ausnahmen von diesen Verboten sind möglich, wenn ein Exemplar

- in die Gemeinschaft eingeführt wurde bzw. in ihr erworben wurde, bevor die Verordnung in Kraft getreten ist,
- zu Gegenständen verarbeitet ist, die vor mehr als 50 Jahren erworben wurden,
- gemäß der Verordnung in die Gemeinschaft eingeführt wurde und für Zwecke verwendet wird, die dem Überleben der Art nicht schaden,
- im Falle besonderer Umstände für den Fortschritt der Wissenschaft oder grundlegender biomedizinischer Zwecke benötigt wird, wobei allerdings die Einschränkung besteht, dass die Tierschutz- und Tierversuchsrechte eingehalten und ausschließlich die betrachtete Art für diese Zwecke geeignet ist und keine gezüchteten oder in Gefangenschaft geborenen Exemplare der Art zur Verfügung stehen,
- zu Zucht- und Fortpflanzungszwecken verwendet werden, die die Erhaltung der betreffenden Art zum Ziel haben,
- Forschungs- und Bildungszwecken dient, die den Schutz oder die Erhaltung der Art zum Ziel haben,
- aus einem Mitgliedsstaat stammt und nach den Rechtsvorschriften des betreffenden Mitgliedsstaates aus ihrem natürlichen Lebensraum entnommen wurde [Art. 8 Abs.3 lit. a-h VO (EG) Nr. 338/97].

Bei jeder, die Gemeinschaftsgrenzen (EG) überschreitenden Transaktion, somit auch bei nicht-kommerziellem Handel, sind die oben beschriebenen Dokumente erforderlich. Dies resultiert daraus, dass der Handelsbegriff an den objektiven Tatbestand des Verbringens in die bzw. aus der europäischen Gemeinschaft geknüpft ist (Böhne, 2001, S.257). Die oben genannten Einfuhr- und Ausfuhrbestimmungen werden jedoch gerade im Hinblick auf die Lagerung zoogenetischer Ressourcen in Genbanken durch Art. 7 Abs.1 lit. a VO (EG) Nr. 338/97 teilweise erheblich erleichtert. Für in Gefangenschaft geborene, gezüchtete oder künstlich vermehrte Exemplare der Arten des Anhangs A gilt, dass mit diesen nach den Vorschriften für Exemplare der Arten des Anhangs B zu verfahren ist [Art. 8 Verordnung

(EG) Nr. 338/97]. Zu beachten ist jedoch, dass durch die Verwendung des Begriffs "in Gefangenschaft geboren" auch die Entnahme von z.B. befruchteten Vogeleiern aus der Wildnis und die nachfolgende Aufzucht auf Farmen möglich wäre, wenn das Tier erst auf der Farm geboren wird. Dem steht jedoch Art. 54 VO (EG) Nr. 865/2006 gegenüber, der Zuchttiere definiert als Tiere, die in einer kontrollierten Umgebung, d.h. einer Umgebung, die intensiv durch den Menschen beeinflusst wird, geboren wurden oder auf andere Weise gezeugt worden sind. Die Elternteile müssen sich bereits vor der Zeugung in einer kontrollierten Umgebung befunden haben (Böhne, 2001, S. 258).

Im Hinblick auf den Betrieb von Genbanken heißt dies allerdings, dass Exemplare, die aus Nachzuchtungen zoologischer Gärten stammen, ohne weiteres gelagert werden können, wenn die entsprechenden Bestimmungen des Art. 4 Abs.2 VO (EG) Nr. 338/97 eingehalten wurden. Weiterhin besteht die Notwendigkeit der Vorlage der entsprechenden Ein- und Ausfuhrdokumente. Der Nachweis einer hauptsächlich nicht-kommerziellen Nutzung ist nicht mehr erforderlich. Somit können diese Exemplare auch zur Produktentwicklung und zur kommerziellen Vermarktung verwendet werden.

Von herausragender Bedeutung für Genbanken zoogenetischer Ressourcen eines Mitgliedsstaates der EU ist Art. 7 Abs. 4 VO (EG) Nr. 338/97. Dieser bestimmt, dass sämtliche oben genannten Dokumente der Art. 4, 5, 8, und 9 der genannten Verordnung nicht erforderlich sind, wenn es sich um nicht-kommerzielles Verleihen, Verschenken oder Tauschen von Herbariumsexemplaren, sonstige haltbar gemachte, getrocknete oder festumschlossene Museumsexemplare und lebendes Pflanzenmaterial zwischen Wissenschaftlern und wissenschaftlichen Einrichtungen handelt, die bei einer Vollzugsbehörde ihres Staates registriert sind. Solche Exemplare sind mit einem Etikett der entsprechenden Vollzugsbehörde zu versehen oder einer vergleichbaren Kennzeichnung von der Vollzugsbehörde eines Drittlandes.

3.2.4.2 Resümierende Betrachtung: wissenschaftlicher Austausch vs. kommerzielle Nutzung

In Anbetracht der oben dargestellten Rechtslage gilt es, grundlegend zu unterscheiden, ob die betreffende Genbank ausschließlich der *ex situ*-Erhaltung gefährdeter Arten, also nicht kommerziellen Zwecken dient, oder die gelagerten und gesammelten zoogenetischen Ressourcen letztlich zur Entwicklung von vermarktbareren Derivaten jeglicher Art, also zu kommerziellen Zwecken, vorrätig gehalten werden.

Im Falle einer rein wissenschaftlichen Ausrichtung einer Genbank können bereits gelagerte Proben jeglicher Anhangs getauscht, verschenkt und in dieser Weise auch erworben werden, soweit die beteiligten Genbanken als wissenschaftliche Einrichtungen bei einer

Vollzugsbehörde ihres Staates als solche registriert sind. Da in Art. 7 Abs. 4 VO (EG) Nr. 338/97 jedoch explizit nur Herbariumsexemplare, sonstige haltbar gemachte, getrocknete oder festumschlossene Museumsexemplare und lebendes Pflanzenmaterial aufgeführt sind, unterliegt die primäre Entnahme von Exemplaren aus ihrem ursprünglichen Lebensraum weiterhin den Bestimmungen der Art. 4, 5, 8 und 9 VO (EG) Nr. 338/97. Art. 8 Abs. 3 lit. g 4 VO (EG) Nr. 338/97 ermöglicht jedoch von Fall zu Fall den Handel mit den in den Anhängen gelisteten Arten, im Besonderen für Forschungs- und Bildungszwecke, die dem Erhalt der Arten dienen. Diesbezüglich dürfen Exemplare der Anhang A-Arten VO (EG) Nr. 338/97 zur Erhaltung ihrer genetischen Information aus ihrem natürlichen Lebensraum entnommen werden, jedoch nur dann, wenn schriftlich belegt ist, dass sowohl für die Art als auch für das Verbreitungsgebiet der Population keine nachteiligen Folgen hervorgerufen werden. Auch dürfen diese Exemplare nie zu hauptsächlich kommerziellen Zwecken verwandt werden. Ist dies sichergestellt und liegen die entsprechenden Dokumente vor, können auch diese Exemplare als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität eingeführt und in *ex situ*-Genbanken gelagert werden, wo sie für rein wissenschaftliche Zwecke auch Verwendung finden dürfen und im Sinne des wissenschaftlichen Austausches wieder ausgeführt werden dürfen.

Für Exemplare der Anhang A-Arten, die außerhalb ihres natürlichen Lebensraumes, also in Gefangenschaft, geboren wurden, gelten besondere Regelungen. Zum einen unterliegen sie als solche den Bestimmungen für Arten des Anhangs B. Sie dürfen also auch unter Berücksichtigung der entsprechenden Bestimmungen kommerziell gehandelt werden. Zum anderen entfallen die Bestimmungen bezüglich der Entnahme aus ihrem ursprünglichen Lebensraum, da der Handel mit diesen Tieren keinerlei Beeinträchtigung der Art an sich noch des Zustandes des Verbreitungsgebietes der Ursprungspopulation zu betrachtetem Zeitpunkt, darstellt. Somit können Exemplare von sogenannten Nachzuchtungen der Anhang A-Arten VO (EG) Nr. 338/97 zur nicht kommerziellen Lagerung in Genbanken sowohl in die europäische Gemeinschaft eingeführt als auch zu Zwecken des wissenschaftlichen Austausches wieder ausgeführt werden.

Der Erwerb und Austausch zu kommerziellen Zwecken sowie das Vorrätighalten von Exemplaren in Genbanken zu solchen Zwecken bleibt grundsätzlich untersagt, mit Ausnahme der bereits genannten Regulierungen. Exemplare von Arten der Anhänge B, C und D VO (EG) Nr. 338/97 können kommerziell gehandelt werden. Hinsichtlich der Arten des Anhangs B ist dieser Handel jedoch zu überwachen und gegebenenfalls bei beginnender Beeinträchtigung der Arten zu beschränken (vgl. Art. 5 Abs. 7 lit. a). Generell sind hierfür jedoch die Bestimmungen der Art. 4 und 5 VO (EG) Nr. 338/97 zu berücksichtigen. Sowohl die Einfuhr, die Ausfuhr sowie die Wiederausfuhr zur Lagerung in Genbanken, mit der

Absicht zur kommerziellen Nutzung der Exemplare, implizieren somit einen enormen bürokratischen Aufwand, sind jedoch generell möglich. Für Exemplare von Arten des Anhangs A gilt ein generelles Verbot des hauptsächlich kommerziellen Handels. Eine Ausnahme stellen hier wieder die Exemplare von Anhang A-Arten dar, die in Gefangenschaft, und damit außerhalb ihres natürlichen Lebensraumes, geboren wurden. Diese unterliegen, wie bereits mehrfach erläutert, den Bestimmungen der Arten des Anhangs B und können somit unter Berücksichtigung der in Art. 4 Abs. 2 und Art. 5 Abs. 4 genannten Bestimmungen zu kommerziellen Zwecken und zum weiteren Handel in Genbanken vorrätig gehalten werden.

Dem generellen Handelsverbot mit Anhang A-Arten steht jedoch die Terminologie "für nicht hauptsächlich kommerzielle Zwecke" entgegen. Nach Art. 2 lit. m VO (EG) Nr. 338/97 ist "hauptsächlich kommerzielle Zwecke" definiert als "*alle Zwecke, deren nicht kommerzieller Charakter nicht deutlich überwiegt*". Wann diese Grenze eines deutlichen Übergewichtes des kommerziellen Zweckes erreicht ist, bleibt jedoch undefiniert und somit der Einzelfallwürdigung überlassen. Hierdurch wird ein gewisser Ermessens- und Handlungsspielraum deutlich, der je nach Auslegung auch den kommerziellen Handel mit Exemplaren von Anhang A-Arten ermöglichen würde. Dies könnte folglich dazu führen, dass einem kommerziellen Handel ein nicht-kommerzieller Zweck vorausgeht - z.B. der Import in die Gemeinschaft zu Forschungs- und Bildungszwecken, die dem Erhalt der Art dienen - und nachfolgend der kommerzielle Handel des Exemplars möglich wird. Auch bereits im völkerrechtlichen Übereinkommen (CITES) wird dies, wie bereits vorstehend diskutiert, deutlich, da auch hier die englische Wendung "primarily commercial purposes" verwendet wird. Diesbezüglich stimmen, wie oben dargelegt, die Vertragsstaaten der Anwendung der während der 5. Vertragsparteienkonferenz in Buenos Aires 1985 beschlossenen Definition der Terminologie zu. Da das Völkerrecht jedoch nicht unmittelbar auf EU-Ebene und der nationalen Ebene bindend ist, stellt sich die Frage, inwiefern der Gebrauch dieser Definition auch im Rahmen der Anwendung der VO (EG) Nr. 338/97 rechtswirksam ist. Sicherlich ist eine Orientierung an der gegebenen Definition der 5. Vertragsstaatenkonferenz angemessen, da davon auszugehen ist, dass die Umsetzungsnormen auf der Ebene der EG im Sinne des Völkerrechtes zu verstehen sind.

Kompetenzverteilung in der Bundesrepublik Deutschland

Wie bereits einleitend zum CITES näher ausgeführt wurde, bedient sich das Übereinkommen zur Umsetzung der erlassenen Bestimmungen der Ernennung zweier Instanzen, die von den Vertragsparteien eingerichtet werden müssen und die zur wissenschaftlichen Begutachtung und zur behördlichen Ausstellung der genannten Genehmigungen befähigt sind. Bereits

genannt wurden die Vollzugsbehörde und die wissenschaftliche Behörde der Vertragsstaaten. Ebenfalls von großer Relevanz für die Durchsetzung der geäußerten Ziele ist die Zollbehörde. Die genannten Behörden werden nach Art. 13 VO (EG) 337/97 definiert, ebenso ihre Aufgaben und Zuständigkeiten.

Die benannten Behörden der BRD nach Verordnung (EG) 337/97

Nach Art. 13 Abs. 1 lit. a und b sind die Vertragsstaaten dazu verpflichtet, eine oder mehrere Vollzugsbehörden zu benennen, welche die Verantwortung für die Durchführung dieser Verordnung und den Kontakt zur Kommission haben (entspricht Art. IX Abs.1 lit. a CITES). Die Bundesrepublik hat hierfür mittels § 44 Abs. 1 BNatSchG gleich mehrerer Institutionen benannt.

Für den Verkehr mit anderen Vertragsparteien und dem Sekretariat wurde das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) benannt (§ 44 Abs. 1 Nr. 1 BNatSchG). Für die Erteilung von Einfuhr- und Ausfuhrgenehmigungen sowie Wiederausfuhrgenehmigungen und den Verkehr mit dem Sekretariat, der Kommission der Europäischen Gemeinschaft und mit Behörden anderer Vertragsstaaten und Nichtvertragsstaaten im Zusammenhang mit der Bearbeitung von Genehmigungen oder bei der Verfolgung von Ein- und Ausfuhrverstößen ist das Bundesamt für Naturschutz (BfN) zuständig (§ 44 Abs. 1 Satz 2 lit. a BNatSchG).

Ebenso sind die Vertragsstaaten verpflichtet, eine wissenschaftliche Behöre zu benennen, die im Falle der Bundesrepublik Deutschland das Bundesamt für Naturschutz (BfN) darstellt. Gemäß Art. 12 VO (EG) 337/97 werden die Vertragsparteien aufgefordert, Zollstellen zu benennen, welche die Förmlichkeiten für die Einfuhr in die und die Ausfuhr aus der Gemeinschaft der unter die Verordnung fallenden Arten vornehmen. Für die Bundesrepublik Deutschland werden diese Zollstellen durch das Bundesamt für Finanzen festgelegt und letztlich vom BMU bekannt gegeben (§ 45 BNatSchG). Ferner werden diese befugten Zollstellen gemäß des Art. 12 Abs. 3 VO (EG) 337/97 im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft bekannt gemacht (Weerth, 2008, S.7).

4. Zusammenfassende Betrachtung des CBD und des CITES im Hinblick auf den Betrieb von Genbanken zoogenetischer Ressourcen

Wie aus den vorangehenden Darlegungen deutlich geworden ist, stellen das CBD und das CITES wichtige und elementare Grundlagen internationaler Bemühungen zum Schutz der biologischen Diversität dar. Während sich das CBD konkret mit Erhaltungsmaßnahmen wie der *in situ*- und der *ex situ*-Erhaltung von gefährdeten Tierarten und mit grundsätzlichen Fragen der generellen Zugangsbedingungen zu genetischen Ressourcen und daraus resultierenden Verpflichtungen der Vertragsparteien bezüglich des Vorteilsausgleiches befasst, bezieht sich das CITES direkt auf den Handel mit gefährdeten Tierarten und definiert Möglichkeiten und Bedingungen bis hin zu Verboten des internationalen Handels mit diesen Arten.

Vergleicht man Inhalt und Zielsetzung von CBD und CITES wird deutlich, dass beide Parallelen aufzeigen und in gewisser Hinsicht gleichwertige Handelsabkommen darstellen. Sie sind somit gleichermaßen von Bedeutung für den Betrieb von Genbanken, die das Ziel der Sammlung und Lagerung genetischer Materialien von gefährdeten Tierarten zur Sicherung der genetischen Diversität verfolgen.

Das CBD - wenn auch im Hinblick auf die behandelte Fragestellung auf nationaler Ebene bisher nicht umgesetzt - und die damit assoziierten Bonner Richtlinien definieren, wenn auch rechtlich unverbindlich, Regelungen zum Zugang und zum Ausgleich der aus dem Nutzen der genetischen Ressourcen entstehenden Vorteile. Diese Regelungen fordern die vorherige Zustimmung des ressourcengebenden Staates (PIC), sowie eine Zugangsregelung, die auf gegenseitigem Einvernehmen basiert (MAT's). Durch die Anwendung von Materialübertragungsverträgen (MTAs), als Instrument zur Sicherung der Rechtsklarheit und Rechtssicherheit, werden auch hier Bedingungen geschaffen, die einem Handelsabkommen ähneln.

Im Gegensatz zum CITES fehlen CBD zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend regulierende nationale Anlaufstellen zur praktischen Umsetzung des Abkommens, die den Zugang zu genetischen Ressourcen regeln und kontrollieren. Ratsam wäre eine freiwillige Aushandlung von Materialübertragungsverträgen, wodurch Rechtsunsicherheiten vermieden werden können.

Unabhängig hiervon ist zu beachten, dass bei den genetischen Ressourcen von Arten, Teilen von Arten oder ihrer Derivate, die in den Anhängen des CITES aufgelistet sind, die Vorgaben des CITES einzuhalten sind.

Letztlich entscheidet der Zweck einer Genbank über den Zugang, die daran geknüpften Bedingungen und die Möglichkeiten des Handels. Hat eine Genbank keine kommerziellen

Absichten, sondern verfolgt sie rein wissenschaftliche Ziele, können bereits gesammelte Proben jeglicher Anhänge, getauscht, verschenkt und auch erworben werden, sofern die Genbank als wissenschaftliche Einrichtung bei einer Vollzugsbehörde ihres Staates als solche registriert ist. Die primäre Entnahme von Proben der in den Anhängen des CITES gelisteten Arten aus dem ursprünglichen Lebensraum unterliegt jedoch weiterhin den Regelungen und Bedingungen des CITES.

Verfolgt eine Genbank kommerzielle Ziele, so bleiben der Erwerb und Austausch mit wenigen sehr spezifischen Ausnahmen untersagt. Rechtlich problematisch bleibt hierbei jedoch die verwendete Terminologie "für nicht hauptsächlich kommerzielle Zwecke", die dem generellen Handelsverbot bestimmter Arten entgegensteht.

Wünschenswert ist eine schnelle Umsetzung des CBD auf nationaler Ebene, wodurch klare und rechtswirksame Regelungen zum Zugang zu genetischen Ressourcen und zur Handhabung des Vorteilsausgleiches gegeben wären. Da diese jedoch fehlen und weiterhin auch Regelungsbedarf bei CITES besteht, wirken die rechtlichen Gegebenheiten zumindest für Aussenstehende sehr komplex. Sie bedürfen einer übersichtlichen zusammenführenden Vereinfachung und Darstellung in einem Regelwerk, das den Anwendern beim Betrieb von Genbanken zoogenetischer Ressourcen ein Mindestmaß an Rechtssicherheit gibt.

Kapitel II

Naturwissenschaftliche Implikationen

Isolation, Charakterisierung, Differenzierung und Kryokonservierung adulter Stammzellen aus der Haut am Modell

Sus scrofa domestica

5. Einführung in die Thematik der Stammzellen

Wie einleitend deutlich wurde, gewinnen Stammzellen immer stärker an Bedeutung für die Forschung an gefährdeten und für gefährdete Tierarten und eröffnen neue Möglichkeiten der Reproduktionsbiologie. Da die Haut sehr leicht zugänglich ist und minimalinvasiv Biopsien entnommen werden können, verfolgt diese Studie das übergeordnete Ziel der Erarbeitung einer Isolationsmethode von adulten Stammzellen. Da naturgemäß die Verwendung gefährdeter Spezies oder Teilen davon in dem derzeitigen Stadium unserer Kenntnisse sich verbietet, wurde in vorliegender Untersuchung die Haut des Hausschweins als "Modell-System" ausgewählt.

Die grundlegenden Eigenschaften von Stammzellen, ihr Proliferationpotential und ihr Potential zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen resultieren aus einer spezifischen Kombination von Wechselwirkungen aktivierter Gene und Proteine und auch der Mikroumwelt der jeweiligen Stammzellnische. Die Funktionalität dieser molekularen Mechanismen wurde hauptsächlich durch die Forschung an embryonalen Stammzellen und an Stammzellen des adulten Knochenmarks identifiziert. Erst die Kenntnis der Funktion dieser spezifischen Gene und Proteine für die Aufrechterhaltung der Proliferation und des undifferenzierten Zustands der Stammzellen machte sie zu Markern an Hand derer Stammzellen anderer Ursprungsgewebe identifiziert werden konnten. Um den Nachweis zu erbringen, dass die in dieser Arbeit aus der Haut des adulten Schweins isolierten Zellen Stammzellen darstellen, ist es notwendig, diese spezifischen Gene und Proteine nachzuweisen.

Zum grundlegenden Verständnis der Versuchsanordnungen und Versuchskonzeption ist somit eine Einführung über die molekularen Marker, die Eigenschaften und Differenzierungspotentiale sowohl embryonaler als auch adulter mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark unerlässlich. Aus der darauffolgenden Beschreibung der bisherigen Kenntnisse über Stammzellen aus der Haut ergibt sich letztlich das genaue Ziel dieser Studie.

5.1 Embryonale Stammzellen

Die erste Funktionseinheit des Lebens, die befruchtete Eizelle, besitzt die Fähigkeit, sich in einen vollständigen Organismus zu entwickeln. Diese als Totipotenz definierte Eigenschaft geht während der frühen Embryonalentwicklung bis zum Achtzellstadium (Morula) verloren (Wobus & Boheler, 2005). Die weitere Embryonalentwicklung und die damit einhergehende Zelldifferenzierung führt zur Formation der Blastozyste, die sich aus äußeren Trophoplastzellen und undifferenzierten Zellen der inneren Zellmasse (inner cell mass, ICM) zusammensetzt. Die weitere Entwicklung führt zur Ausbildung der drei embryonalen Keimblätter, dem Entoderm (inneres Keimblatt), dem Mesoderm (mittleres Keimblatt) und dem Ektoderm (äußeres Keimblatt).

Die Zellen der inneren Zellmasse der Blastozyste haben die totipotente Eigenschaft der befruchteten Oocyte verloren, allerdings besitzen sie weiterhin die Fähigkeit, sich in Zellen der drei embryonalen Keimblätter zu entwickeln (Abb. 1).

Zellen der inneren Zellmasse wurden erstmals in den frühen 80er Jahren aus Blastozysten der Maus als sogenannte pluripotente murine embryonale Stammzellen isoliert (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Wobus *et al.*, 1984). Eine charakteristische Eigenschaft embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) ist also die Fähigkeit, sich in alle Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter zu differenzieren (Stojkovic *et al.*, 2004). Dies wurde durch die Transplantation muriner ES-Zellen in Modellorganismen, die Krankheitsbilder aufzeigen, die mit dem Fehlen spezifischer Zelltypen assoziiert sind, demonstriert. Untersucht wurde die Regeneration von Gewebe durch murine ES-Zellen bei Herzinfakten (Klug *et al.*, 1996), neurodegenerativen Krankheiten (Björklund *et al.*, 2002; Lindvall & Kokaia, 2006; Lindvall *et al.*, 2004), Leberversagen (Chinzei *et al.*, 2002) und myelinassozierten Krankheiten (Brüstle *et al.*, 1999).

Untersuchungen zum *in vitro* Verhalten zeigten jedoch, dass die isolierten Zellen schnell ihre proliferativen Eigenschaften und ihre Fähigkeit zur Differenzierung verloren. Die Expansion dieser Zellen wurde nur möglich durch die Kultivierung der Zellen als Subkultur mit inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (Robertson, 1987). Aus dieser Beobachtung schloss man, dass die verwendeten Fibroblasten einige kritische Faktoren absondern, die die Differenzierung embryonaler Stammzellen verhindern und die Proliferation antreiben.

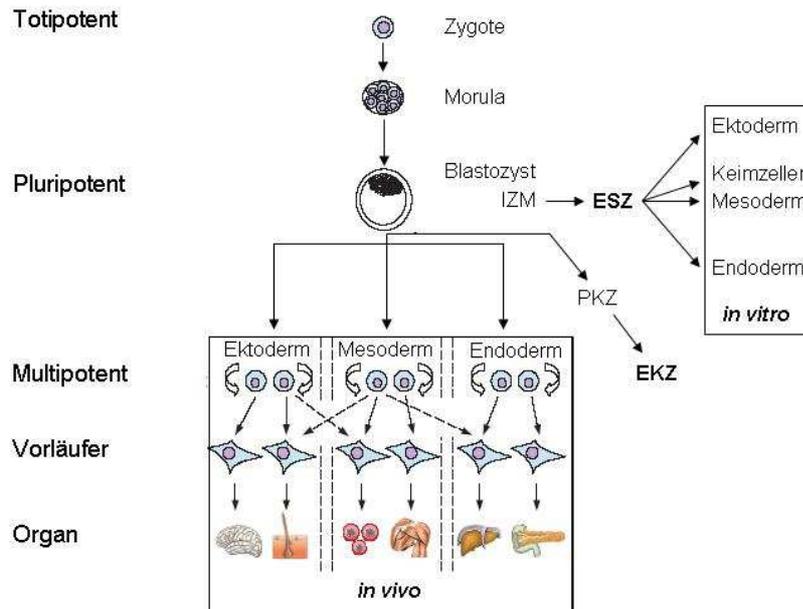


Abb. 1: Stammzellhierarchie. Die Zygote und Zellen früher embryonaler Entwicklungsstadien bis zum Morulastadium gelten als Totipotent, da sie sich zu einem komplexen Organismus entwickeln können. Im Stadium der Blastozyste sind nur noch die Zellen der inneren Zellmasse (IZM) dazu fähig, *in vivo* in Zellen aller drei Keimblätter und in männliche und weibliche Keimzellen (PKZ: Primordiale Keimzelle; EKZ: Embryonale Keimzellen) zu differenzieren. Embryonale Stammzellen (ESZ) sind somit pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse isoliert werden. Auch *in vitro* besitzen sie die Fähigkeit, in Zelltypen aller drei Keimblätter und in Keimzellen zu differenzieren. Abbildung modifiziert nach Wobus & Boheler 2005.

1988 wurde von zwei unabhängigen Forschungsgruppen das Glykoprotein der Interleukin (IL)-6 Familie "leukemia inhibitory factor" (LIF) als trophischer Faktor identifiziert, der die Unterdrückung der Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen bewirkt (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). Allerdings konnte gezeigt werden, dass LIF nur in Kombination mit fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) die Differenzierung unterdrücken kann. Hierdurch wird angenommen, dass weitere im Serum enthaltene Faktoren erforderlich sind (Boiani & Scholer, 2005). LIF interagiert mit dem membrangebundenen Glykoprotein gp130 und dem LIF Rezeptor LIFR β , wodurch eine Vielzahl von Zellfunktionen durch Jak-Stat-Signalwege (Stat, signal transducer and activator of transcription) reguliert wird (Abb. 2). Von besonderer Bedeutung bei dieser Signalübertragung ist der latente Transkriptionsfaktor Stat3. Generell spielt Stat3 eine Schlüsselrolle während der Embryonalentwicklung. Mäuseembryonen mit einem Stat3-Defizit können sich nicht weiter als bis zum siebten Tag der Embryonalentwicklung (E7.0), an dem die Gastrulation einsetzt, entwickeln (Takeda *et al.*, 1997). Dies wird darauf zurückgeführt, dass Stat3 in allen frühen embryonalen Entwicklungsstufen notwendig ist (Niwa, 2001; Niwa *et al.*, 1998). Versuche mit chimären Rezeptormutanten und murinen Stat3-knockout ES-Zelllinien zeigten, dass die Aktivierung

5. Einführung in die Thematik der Stammzellen

von Stat3 unmittelbar für die Erhaltung des undifferenzierten Zustands der ES-Zellen notwendig ist (Matsuda *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 1998; Raz *et al.*, 1999b).

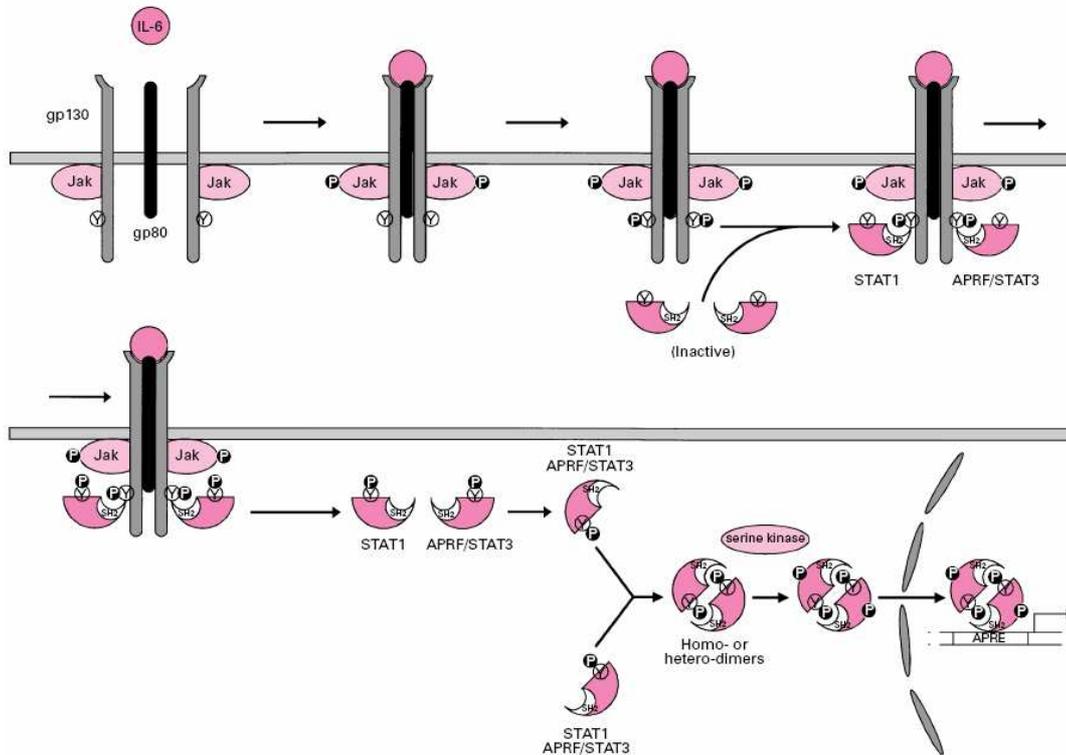


Abb. 2: Interleukin (IL)-6 Signalgebung über den Jak-Stat-Signalweg. IL-6 führt zu Dimerisation des gp130 Moleküls. Assoziierte Jaks werden aktiviert und phosphorylieren den intrazellulären Teil von gp130, wodurch Andockstellen für Stat1 und Stat3 geschaffen werden. Diese werden ebenfalls phosphoryliert, bilden Homo- oder Heterodimere und wandern in den Zellkern. Dort wirken sie als Transkriptionsfaktoren und regulieren die Gentranskription. Darstellung aus Heinrich *et al.*, 1998.

Folglich führt die Abwesenheit von LIF, die Kultivierung ohne murine embryonale Fibroblasten oder die Inaktivierung von Stat3 zur spontanen Differenzierung der ES-Zellen *in vitro* (Boeuf *et al.*, 1997).

Humane embryonale Stammzellen konnten nur wenig später nach der Isolation muriner ES-Zellen zum ersten Mal aus Blastozysten gewonnen werden, die durch *in vitro* Befruchtung hergestellt wurden (Pera *et al.*, 2000; Thomson *et al.*, 1998).

Humane und murine embryonale Stammzellen sind sich generell sehr ähnlich (Ginis *et al.*, 2004). Beide besitzen ein nahezu uneingeschränktes Proliferationspotential und die Fähigkeit, sich in Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Einer der wesentlichsten Unterschiede ist allerdings, dass im Hinblick auf humane ES-Zellen LIF die Anwesenheit muriner embryonaler Fibroblasten nicht ersetzen kann und somit die spontane

Differenzierung humaner ES-Zellen nicht verhindert (Avery *et al.*, 2006; Daheron *et al.*, 2004).

Trotz des enormen Differenzierungspotentials embryonaler Stammzellen bestehen Risiken, wie die Bildung von Teratomen und weiteren Krebsarten (Erdo *et al.*, 2003; Fujikawa *et al.*, 2005), die neben ethischen Gründen den therapeutischen Einsatz humaner ES-Zellen nicht ermöglichen.

Eine Reihe von Untersuchungen identifizierte mehrere Oberflächenproteine die von embryonalen Stammzellen exprimiert werden, unter anderem das Teraspanin CD9 (Oka *et al.*, 2002), das Prominin-1 AC133, der Stammzellfaktor-Rezeptor c-kit (CD117), die Rezeptor Tyrosin Kinase flt3 (CD135) und auch Glykolipide und Glykoproteine wie SSEA-4 (stage specific embryonic antigen 4), Tra-1-60 und Tra-1-81 (Amit *et al.*, 2003; Hoffman & Carpenter, 2005; Thomson *et al.*, 1995).

Embryonale Stammzellen exprimieren den auf Epiblast bzw. Keimzellen beschränkten Transkriptionsfaktor Oct3/4 (octamere binding transkription factor 3/4). Die Oct3/4 Expression der Zygote ist *in vivo* essentiell für die initiale Entwicklung der Pluripotenz der inneren Zellmasse (Nichols *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 2005).

Inzwischen wird die Pluripotenz embryonaler Stammzellen zurückgeführt auf wenige entscheidende Transkriptionsfaktoren. Neben Oct3/4 gilt Sox2 (sex determinig region Y [SRY]-box 2) als wesentlicher Transkriptionsfaktor, da gezeigt werden konnte, dass Sox2 synergistisch mit Oct3/4 agieren kann (Tomioka *et al.*, 2002). Dies führt *in vitro* zur Aktivierung von Genen, die sowohl die Expression von Sox2 als auch von Oct3/4 verstärken und regulieren (Chambers *et al.*, 2003; Masui *et al.*, 2007).

Zusammen werden Oct3/4 und Sox2 als Kerneinheit des transkriptionellen, regulatorischen Schaltkreises der Pluripotenz humaner und muriner embryonaler Stammzellen betrachtet (Boyer *et al.*, 2005; Brimble *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006; Masui *et al.*, 2007; Nakatake *et al.*, 2006; Niwa, 2007). Ein mögliches Modell dieses regulatorischen Schaltkreises ist in Abb. 3 dargestellt.

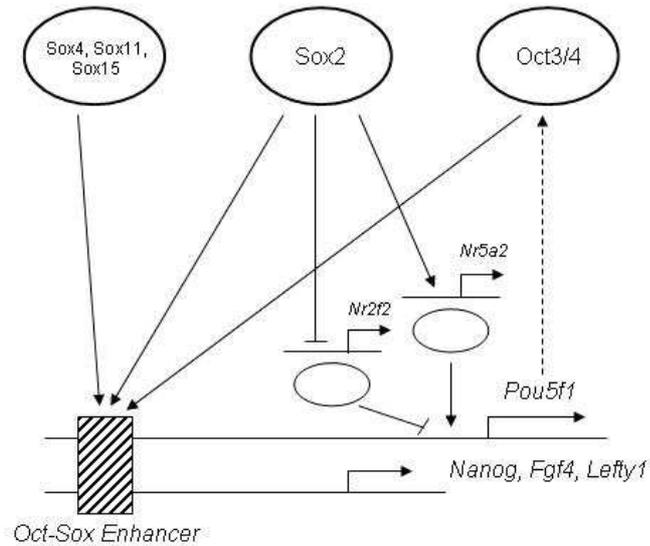


Abb. 3: Schematische Darstellung eines möglichen Modells des transkriptionellen Netzwerks zur Regulation der Pluripotenz muriner ES-Zellen, das durch Oct3/4 und Sox-Faktoren reguliert wird. Sox2 und weitere Sox-Faktoren regulieren redundant Oct-Sox-Enhancer abhängige Gene, wobei nur Sox2 multiple Transkriptionsfaktoren reguliert, die sich sowohl positiv als auch negativ auf die Oct3/4-Expression auswirken können. Grafik modifiziert nach Masui *et al.* 2007.

Der oben beschriebene, durch LIF aktivierte, gp130-Stat3-Signalkomplex scheint nur bei murinen ES-Zellen neben dem Oct-Sox-Komplex eine akzessorische Rolle zu spielen (Wobus & Boheler, 2005).

Für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz wurden somit die Transkriptionsfaktoren Stat3, Oct3/4 und Sox2 identifiziert. Diese können folglich als Marker zur Überprüfung des Stammzellcharakters von undefinierten Zellpopulationen herangezogen werden.

5.2 Adulte Stammzellen

Neben der Entdeckung und Beschreibung der embryonalen Stammzellen konnte bisher auch eine Vielzahl verschiedener gewebespezifischer Stammzellen in adultem Gewebe von Labortieren und dem Menschen nachgewiesen und isoliert werden.

Da die Haut, das Blut oder auch der Darm von Säugetieren permanent erneuert werden, schreibt man diesen gewebespezifischen Stammzellen ein limitiertes Differenzierungspotential zu, eben zu Zellen ihres Ursprungsgewebes (Wagers & Weissman, 2004). Man vermutet Stammzellen des adulten Gewebes in anatomisch sehr speziellen Mikroumwelten, den sogenannten Stammzellnischen. Durch das ihr eigene Mikroklima schützt diese Nische die Stammzelle vor der Differenzierung und vor apoptotischen Signalen, in dem eine Balance zwischen Stammzellruhe und Aktivität erhalten wird (Moore & Lemischka, 2006; Tumber *et al.*, 2004).

Diesem restriktiven Konzept widersprechen jedoch Ergebnisse neuerer Untersuchungen, die eine Isolation multipotenter Stammzellpopulationen aus vielen verschiedenen Geweben beschreiben. Unter anderem konnten multipotente Stammzellen aus der Haut (Chunmeng & Tianmin, 2004b; Dyce *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 2004; McKenzie *et al.*, 2006; Meindl *et al.*, 2006; Toma *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), dem Knochenmark (Bianco *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 1999; Friedenstein *et al.*, 1987; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Wexler *et al.*, 2003), aus Muskelgewebe (Jackson *et al.*, 1999; McKinney-Freeman *et al.*, 2002; Qu-Petersen *et al.*, 2002), dem Pankreas (Danner *et al.*, 2007; Gorjup *et al.*, 2009; Kruse *et al.*, 2004), dem Gehirn (Bjornson *et al.*, 1999; Gage *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2002b; Lendahl *et al.*, 1990; Reynolds & Weiss, 1992; Rietze *et al.*, 2001) und weiteren adulten Geweben erfolgreich isoliert werden. Da diese adulten Stammzellen in Zellen differenzieren, die nicht in ihrem Ursprungsgewebe vorkommen, sprechen neuere Konzepte adulten Stammzellen teilweise eine größere, keimblattübergreifenden Plastizität zu (Joshi & Enver, 2002).

Die wohl am besten untersuchten adulten und wenig restriktiven Stammzellen sind jene, die aus dem Knochenmark isoliert werden können. Grundsätzlich werden zwei Stammzellpopulationen des Knochenmarks unterschieden: Blutbildende, sogenannte hämatopoetische Stammzellen (HSCs) und mesenchymale Stammzellen (MSCs), die zur Regeneration mesenchymalen Gewebes wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bänder, Sehnen und Fett beitragen (Chamberlain *et al.*, 2007).

Die Entdeckung hematopoietischer Stammzellen resultierte hauptsächlich aus dem klinischen Bedarf an regenerativen Zellen, die fähig sind, Folgen lethaler Dosen radioaktiver

Strahlung oder der Chemotherapie im Rahmen von Krebsbehandlungen zu kompensieren (Morrison *et al.*, 1995). Bereits in den 60er Jahren zeigten bahnbrechende Arbeiten, dass das Knochenmark hoch proliferative Vorläuferzellen enthält, die in der Lage sind, sich in unterschiedliche Zelltypen des Blutes, wie Myelozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Lymphozyten, zu differenzieren (Till & McCulloch, 1961; Wu *et al.*, 1967; Wu *et al.*, 1968). Das Potential zur Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen wurde hauptsächlich dem Proto-Onkogen und Polycombgruppen-Repressor *Bmi1* zugeschrieben (Iwama *et al.*, 2004). *Bmi1*^{-/-} Knockout-Mäuse weisen einen erheblichen Mangel an HSCs auf (Park *et al.*, 2003). Der Mechanismus, über welchen *Bmi1* die Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen steuert, scheint über die Repression von Anit-Proliferationsgenen und Genen, die bedeutend für die Stammzellendifferenzierung sind, zu funktionieren. Als direkte Downstream-Effektoren von *Bmi1* konnten *p16^{Ink4a}*, *p19^{Arf}*, und *p53* identifiziert werden (Bruggeman *et al.*, 2005). Eine Überexpression von *p16^{Ink4a}* und *p19^{Arf}* in adulten HSCs führt zum induzierten Zellzyklusarrest und zur Apoptose über die pRB- und p53-Signalwege (Jacobs *et al.*, 1999a; Park *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2003). Somit erhält *Bmi1* den Pool an HSCs durch die Unterdrückung von Genen, die in den Prozess der zellulären Seneszenz involviert sind. Zudem induziert die Überexpression von *Bmi1* die Telomeraseaktivität und verlängert somit die Lebensspanne hämatopoetischer Stammzellen (Jacobs *et al.*, 1999b).

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass *Bmi1* von diversen adulten Stammzelltypen exprimiert wird und zudem evolutionär hochgradig konserviert ist (Alkema *et al.*, 1993; Iohara *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2003; Molofsky *et al.*, 2004; Sangiorgi & Capecchi, 2008).

Durch die Kenntnis, dass hämatopoetische Stammzellen sich durch die Expression des transmembranen Sialomucinproteins CD34 von anderen Zellarten unterscheiden, wurde es möglich, CD34⁺ Zellen durch die Markierung mit Antikörpern gegen CD34 mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) oder magnetischer Zellsortierung (MACS) für die therapeutische Anwendung anzureichern (Deans & Moseley, 2000).

Die Anwesenheit eines weiteren nicht-blutbildenden Stammzelltyps im Knochenmark wurde bereits vor mehr als 130 Jahren von dem deutschen Pathologen Julius Friedrich Cohnheim vermutet. Seine Versuche führten ihn zu dem Schluss, dass viele, wenn nicht sogar alle Zellen, die am Wundheilungsprozess beteiligt sind, aus dem Blutstrom stammen und somit letztlich aus dem Knochenmark (Cohnheim, 1867; Prockop, 1997).

Den Beweis der Anwesenheit eines weiteren Stammzelltyps im Knochenmark erbrachten erstmals Fiedenstein *et al.* 1970. Diese gaben in Versuchen Knochenmark in

Zellkulturschalen und entfernten nach vier Stunden alle nichtadhärenten Zellen. Übrig blieben adhärente Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie, die einzelne Zellkolonien bildeten (Friedenstein *et al.*, 1976; Friedenstein *et al.*, 1970). Noch unwissend über die Fähigkeiten dieser Zellen, beschrieben sie diese erstmals als Fibroblastenvorläuferzellen bzw. koloniebildende Fibroblasten (colony forming units fibroblasts, CFU-F).

1971 entdeckten Friedenstein und Kuralesova das osteogene Differenzierungspotential der koloniebildenden Fibroblasten (Friedenstein & Kuralesova, 1971). *In vitro* Experimente zeigten, dass trotz einheitlicher Morphologie die CFU-F Zellen heterogene Populationen aus Stamm- und bereits weiter differenzierten Vorläuferzellen sind (Castro-Malaspina *et al.*, 1980; Owen, 1988).

Inzwischen wurde von anderen Forschergruppen bestätigt, dass die von Friedenstein und Kollegen erstmals isolierten koloniebildenden Fibroblasten ein multipotentes Differenzierungspotential besitzen und entsprechend induziert zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten differenzieren können (Barry *et al.*, 2001; DiGirolamo *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2002a; Maniatopoulos *et al.*, 1988; Pittenger *et al.*, 1999). Neuere Arbeiten demonstrieren zudem die Differenzierung in neuronale Zelltypen wie Neuronen und Astrozyten (Jiang Y., 2002; Kim *et al.*, 2002a; Wislet-Gendebien *et al.*, 2005). Unterdessen bezeichnet man diese Zellen wegen ihrer Fähigkeit, sich unter anderem in mesenchymale Zelltypen zu differenzieren, entweder als mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder wegen ihres Ursprungs im Knochenmark als Knochenmark-Bindegewebszellen (marrow stromal cells).

Untersuchungen zeigten, dass für die Koloniebildung *in vitro*, in serumhaltigem Kulturmedium, mindesten vier Wachstumsfaktoren verantwortlich sind: Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF), basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, bFGF), transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth faktor β , TGF- β) und der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) (Bos *et al.*, 1997; Deans & Moseley, 2000; Kuznetsov *et al.*, 1997a).

Versuche mit murinen MSCs in serumfreiem Kulturmedium ergaben, dass bFGF zur Stimulierung der Koloniebildung von MSCs bereits ausreichend ist (Baddoo *et al.*, 2003; Kuznetsov *et al.*, 1997a).

Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor ist ein potentes angiogenes Molekül, das zudem eine wichtige Rolle für das Wachstum von glatten Muskelzellen, die Wundheilung, für Differenzierungsprozesse und die Funktion des zentralen Nervensystems hat (Bikfalvi *et al.*, 1997; Ortega *et al.*, 1998; Rogelj *et al.*, 1989). Durch bFGF-vermittelte Signalwege kann zudem der Transkriptionsfaktor Sox2 hochreguliert werden, der, wie oben beschrieben, eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen spielt

(Mansukhani *et al.*, 2005). Ebenso wirkt sich bFGF positiv auf die Telomerlänge mesenchymaler Stammzellen aus (Bianchi *et al.*, 2003).

Neuere Studien belegen die wichtige Bedeutung von bFGF für die Selbsterneuerung von adulten, aber auch humanen embryonalen Stammzellen (Alexanian, 2005; Amit *et al.*, 2000; Go *et al.*, 2008; Gritti *et al.*, 1996; Vallier *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005).

Neben bFGF spielt der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) unter den oben genannten Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle. Die Aktivierung von Stat3 durch den LIF-LIFR β -gp130-Signalweg ist von großer Relevanz für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz muriner embryonaler Stammzellen. Untersuchungen zur onkogenen Wirkung von EGF bewiesen die Aktivierung von Stat3 durch EGF in verschiedenen Zelllinien. Im Gegensatz zu LIF wird Stat3 durch EGF nicht notwendigerweise über den Jak-Signalweg aktiviert, sondern über die intrinsische Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors (David *et al.*, 1996; Garcia & Jove, 1998; Garcia *et al.*, 1997; Grandis *et al.*, 1998). An einer Vielzahl von Zelllinien konnte gezeigt werden, dass EGF die Zellproliferation stark anregen kann (Carpenter & Cohen, 1979).

Inzwischen gelten bFGF und EGF als die am häufigsten eingesetzten Medienzusätze zur Kultivierung mesenchymaler Stammzellen unter Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands.

Zur Charakterisierung der MSCs wurde neben der Berechnung der Populationsverdopplungszeit, die von Spender zu Spender stark variieren kann (Chamberlain *et al.*, 2007), auch die Expression von Oberflächenproteinen untersucht.

Phänotypisch exprimieren MSCs eine Vielzahl von Oberflächenproteinen, von denen jedoch keines spezifisch für mesenchymale Stammzellen ist. Eine bedeutende Arbeit hierzu lieferten Pittenger *et al.* 1999. Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass MSCs keine Marker hämatopoetischer Stammzellen wie CD45, CD34, CD14 oder CD11 exprimieren, weiterhin auch keine ko-stimulierenden Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 oder die Adhäsionsmoleküle CD31, CD18 und CD56 (Chamberlain *et al.*, 2007; Deans & Moseley, 2000).

MSCs des Knochenmarks können allerdings die Adhäsionsmoleküle CD29 (β -1 Integrin), das intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, CD106 (vascular cell adhesion molecule, [VCAM]-1) und CD166 (activated leucocyte cell adhesion molecule [ALCAM]) präsentieren. Ebenso CD44 (Hyaluron), CD71, CD73 (SH3/4), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2, TGF- β Rezeptor Endoglin) und Stro-1 (Chamberlain *et al.*, 2007; Conget & Minguell, 1999; Haynesworth *et al.*, 1992; Conget, 1999; Pittenger *et al.*, 1999).

In diesen Versuchen wurde durch die variable Expression der einzelnen Oberflächenproteine deutlich, dass es sich bei MSCs um heterogene Populationen handelt und keinesfalls um reine Stammzellpopulationen.

Neben der Expression von Oberflächenproteinen wird Nestin, ein intrazelluläres, intermediäres Filamentprotein der Klasse VI, als möglicher Marker adulter mesenchymaler Stammzellen diskutiert (Wiese *et al.*, 2004).

Als Marker für Stammzellen wurde Nestin zum ersten Mal beschrieben im Hinblick auf multipotente Stammzellen des zentralen Nervensystems (Lendahl *et al.*, 1990). Lendahl und Kollegen zeigten, dass die Nestinexpression Stammzellen von bereits weiter differenzierten Zellen des embryonalen Neuralrohres unterscheidet. Mit fortschreitender Differenzierung in Neuronen und Gliazellen während der Embryonalentwicklung von Mäusen konnte eine synchrone Herunterregulation der Nestinexpression nachgewiesen werden. Damit galt Nestin als Marker für Stammzellen des frühen zentralen Nervensystems.

Reynolds und Weiss lieferten den Beweis, dass Nestin ebenfalls von Zellen exprimiert wird, die aus dem Gehirn adulter Mäuse isoliert wurden. Diese adulten Stammzellen des zentralen Nervensystems differenzierten in Neuronen und Astrozyten, wiederum mit einhergehender Herunterregulation der Nestinexpression (Reynolds & Weiss, 1992).

Inzwischen konnte die Nestinexpression in einer Vielzahl adulter Stammzellen nachgewiesen werden (Amoh *et al.*, 2004; Hoogduijn *et al.*, 2006; Kruse *et al.*, 2004; Pittenger & Martin, 2004; Reynolds & Weiss, 1992; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Toma *et al.*, 2001; Tondreau *et al.*, 2004; Wiese *et al.*, 2004; Wislet-Gendebien *et al.*, 2005). Wegen der intrazellulären Expression von Nestin kann es jedoch nicht zur Isolation von potentiellen Stammzellen mittels FACS oder magnetischer Zellsortierung herangezogen werden.

Da inzwischen neben dem Knochenmark auch Skelettmuskel (Young *et al.*, 2001), Haut (Young *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2005), Fettgewebe (Dicker *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004b), Gehirn (Jiang *et al.*, 2002b), Nabelschnurblut (Kogler *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004a), Synovium (De Bari *et al.*, 2001), Zahnbulbus (Sonoyama *et al.*, 2006) und fötales Blut, Leber und Lunge (in 't Anker *et al.*, 2003) und weitere Gewebe als Quelle mesenchymaler Stammzellen identifiziert werden konnten, wird davon ausgegangen, dass mesenchymale Stammzellen im Bindegewebe der meisten adulten Organe vorzufinden sind. Allerdings sind die isolierten Populationen funktionell nicht äquivalent. Sie unterscheiden sich teilweise in ihrem Differenzierungspotential (Phinney & Prockop, 2007).

Problematisch bleibt weiterhin die Identifizierung mesenchymaler Stammzellen, gerade im Hinblick auf die Isolierung aus unterschiedlichen Geweben. Eine interessante Methode der

Isolierung adulter Stammzellen wird durch die Inkubation potentieller Zielzellen mit dem Farbstoff 33342 (Hoechst) möglich. Stammzellen können diesen Farbstoff nach kurzer Zeit wieder ausscheiden und bilden somit eine ungefärbte Nebenpopulation zu den restliche Zellen. Dadurch können sie mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) als sog. "side population cells" (SPCs) aussortiert werden. Verantwortlich für die Ausscheidung des Farbstoffes ist das murine Bcrp1 (Breast cancer resistant protein 1) bzw. sein humanes Ontholog, der ABC-Transporter ABCG2 (Scharenberg *et al.*, 2002).

Auf diese Art wurden adulte Stammzellen zum ersten Mal von Goodell *et al.* aus murinem Knochenmark isoliert, wobei diese den hämatopoetischen Stammzellen entsprechen (Goodell *et al.*, 1996).

In den nachfolgenden Jahren konnten SPCs mit unterschiedlichem Differenzierungspotential aus einer Vielzahl weiterer Gewebe wie Lunge, Muskel, Hoden und dem Brustepithel, aber auch aus embryonalen Stammzellpopulationen und neuronalen Stammzelllinien isoliert werden (Alvi *et al.*, 2003; Goodell *et al.*, 1996; Hulspar & Quesenberry, 2000; Jackson *et al.*, 1999; Lassalle *et al.*, 2004; Scharenberg *et al.*, 2002; Summer *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Triel *et al.* isolierten ebenfalls SPCs aus der Haut von adulten Mäusen und des Menschen, jedoch mangelt es diesen an stammzellassozierten Eigenschaften (Triel *et al.*, 2004).

5.3 Die Haut als Quelle adulter Stammzellen

Die Haut ist das größte Organ des integumentären Systems der Mammalia und ein effektives Schutzsystem gegen extrinsische Umwelteinflüsse. Neben ihrer Funktion als Hitzeschutz und regulatorisches System des Wasserhaushaltes spielt das Immunsystem der Haut eine Schlüsselrolle bezüglich der Immunantwort auf Umweltreize (Bos *et al.*, 1987). Sie besteht hauptsächlich aus zwei Schichten, der äußeren Epidermis und der inneren Dermis, die durch die *Lamina basale*, die Basalmembran, voneinander separiert sind. Zudem hat die Haut eine Vielzahl an Anhängsel hervorgebracht wie Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen. Diese sind zwar alle mit der Epidermis verbunden, doch reichen sie tief in die Dermis hinein. Epidermis und Dermis beinhalten eine Vielzahl verschiedener Zelltypen. Epitheliale Zellen, die spezialisierte intermediäre Filamentproteine beinhalten, die Keratine, bauen die stratifizierte Epidermis auf. Die zur Epidermis apikal gelegene Dermis besteht zum Großteil aus mesenchymalen Zellen, den Fibroblasten, wobei dermale Melanozyten für die Pigmentation der Haut verantwortlich sind und Gliazellen Axone myelinieren, die die Dermis intervenieren. Zudem befinden sich antigen-präsentierende Zellen wie dendritische

Langerhanszellen, Merkelzellen und histaminproduzierende Mastzellen in der Haut (Millar, 2005).

Der embryonale Ursprung der Epidermis liegt im Ektoderm, dem äußeren Keimblatt des Embryos. Dieses proliferiert und migriert von der dorsalen Mitte des Embryos nach außen und bildet in den ersten Tagen der Embryonalentwicklung ein einfaches Epithel. Zum Zeitpunkt der Geburt besteht die Epidermis aus einer proliferativen Basalschicht, deren Zellen nach außen wandern und differenzieren, um suprabasale Schichten und eine äußere kernlose Schutzschicht, das *Stratum corneum*, aufzubauen (Millar, 2005).

Die Dermis dagegen zeigt eine große Vielfalt an embryonalen Ursprüngen. So konnte durch Lineage-Tracing-Versuche nachgewiesen werden, dass die Dermis der Haut im ventralen Rumpfbereich ihren Ursprung im lateralen Mesoderm hat. Die Dermis der Haut im Kopfbereich dagegen entspringt, zumindest teilweise, der Neuralleiste, einer transienten Population von migrierenden Zellen, die der neuralen Platte entstammen (Millar, 2005).

Als äußerste Barriere eines Organismus zu seiner Umwelt ist die Haut einer großen Vielfalt von Belastungen ausgesetzt. Diese ständige Einwirkung äußerer physikochemischer Einflüsse macht eine permanente Erneuerung der Haut notwendig. Im Hinblick auf Vertebraten variiert diese Erneuerung jedoch enorm. Bei Mäusen dauert eine Erneuerung der Epidermis gerade sieben Tage, wogegen die humane Epidermis ca. 60 Tage für einen gänzlichen Austausch benötigt (Hunter *et al.*, 1995; Potten & Loeffler, 1987). Dieser Erneuerungsprozess wird ermöglicht durch die Anwesenheit von Stammzellen im Hautepithel, die zur Selbsterneuerung fähig sind und permanent Zellen zur Verfügung stellen, die in der Lage sind, in den notwendigen, gebrauchten Zelltyp zu differenzieren.

Inzwischen ist wissenschaftlich erwiesen, dass die gesamte Haut verschiedene Stammzellnischen beinhaltet, in denen adulte Stammzellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential überdauern (Alonso L., 2003; Bickenbach J. R., 1981; Cotsarelis G., 1999; Cotsarelis G., 1990; Dyce *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2004; Pellegrini G., 2001; Toma *et al.*, 2001).

Die wesentlichen Stammzellnischen der Haut werden im Folgenden beschrieben.

5.3.1 Epidermale Stammzellen

Generell besitzen epidermale Stammzellen ein sehr stringent eingeschränktes gewebespezifisches Differenzierungspotential, zu ausdifferenzierten Keratinozyten (Janes S.M., 2002; Li A., 1998). Aus diesem Grund spielen sie für die nachfolgende Untersuchung keine Rolle, sollen jedoch kurz erwähnt sein.

Die interfollikuläre Epidermis besteht aus multiplen Schichten epithelialer Zellen. Das *Stratum basale* beinhaltet undifferenzierte Zellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erhalten haben (Alonso L., 2003; Fuchs E., 2000; Potten & Loeffler, 1987; Potten & Hendry, 1973; Potten & Loeffler, 1990; Watt *et al.*, 2006). Diese epidermalen Stammzellen werden periodisch dem Zellzyklus entzogen und beginnen dann einen terminalen Differenzierungsprozess. Damit einhergehend löst sich die Zelle von der Basalschicht und migriert in Richtung *Stratum corneum*. Während dieser auswärtsgerichteten Bewegung durchläuft sie drei unterschiedliche Differenzierungsstadien und wird letztendlich von der Haut als differenzierte Keratinozyte abgestoßen (Fuchs, 2008).

In der follikulären Epidermis scheinen vor allem die Haarfollikel zur Geweberegeneration beizutragen. Bereits sehr früh wurden Zellen des Haarfollikels regenerative Eigenschaften zugesprochen, die nicht nur die Erneuerung des Haarfollikels ermöglichten, sondern auch der umgebenden Epidermis (Lenoir *et al.*, 1988). 1990 erkannten Cotsarelis *et al.*, dass sich die Mehrzahl potentieller Stammzellen in der Bulgregion des Haarfollikels befindet (Cotsarelis G., 1990). Wie in Abb. 4 gezeigt wird, befindet sich die Bulgregion als spezialisierte Region der äußeren Wurzelscheide direkt unterhalb der Talgdrüse am Ansatz des Haaraufrichtemuskels (*Musculus arrector pili*). Die äußere Wurzelscheide und die epidermale Basalschicht sind biochemisch sehr ähnlich (Alonso & Fuchs, 2003). Im Bereich des Infundibulums laufen die epidermale Basalschicht und die äußere Wurzelscheide zusammen. Wegen der periodischen Wachstumszyklen des Haarfollikels (Anagen: Wachstum, Catagen: Degradierung; Telogen: Ruhephase) gliedert sich das Haarfollikel in einen oberen permanenten und einen unteren zyklischen Teil, der periodisch erneuert wird. Die Bulgregion befindet sich an der Grenzzone zwischen permanentem und zyklischem Fragment des Haarfollikels. Gerade aus diesem Grund stellt sie eine potentielle Stammzellnische dar, da undifferenzierte Zellen bereitgehalten werden müssen, die während des Anagens des Haarfollikels zur Verfügung stehen müssen.

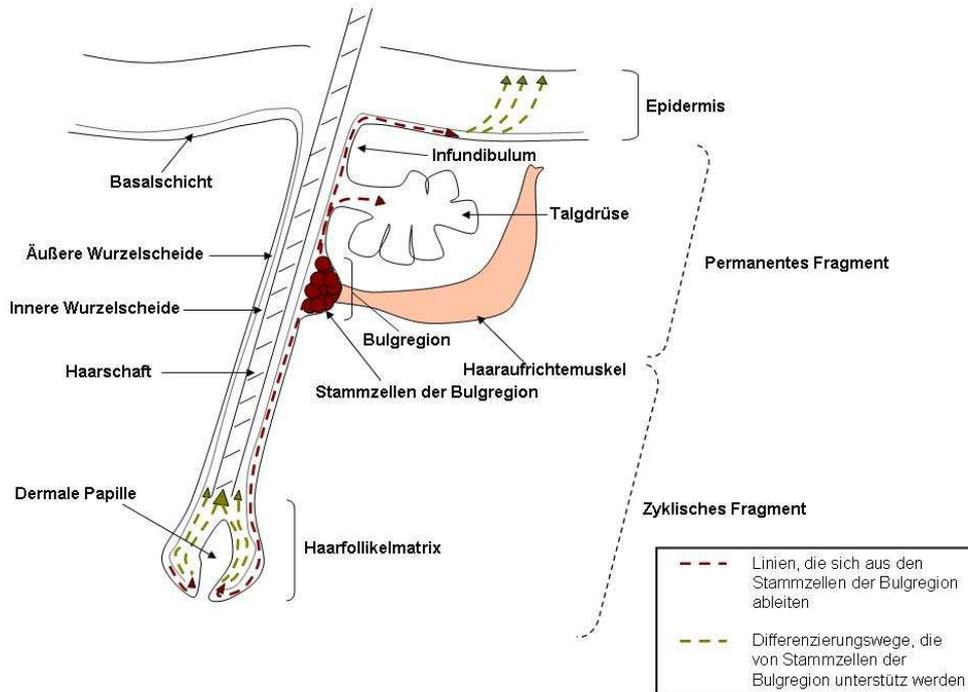


Abb. 4: Stammzellen des Haarfollikels und ihre Differenzierungswege. Modifiziert nach Alonso & Fuchs 2003.

Zu Beginn des Anagens teilen sich die multipotenten Stammzellen der Bulgregion, und ihre Tochterzellen migrieren zur Basis des Follikels und differenzieren zu Matrixzellen (Abb. 4, rote Linie). Weiterhin tragen sie zur Entwicklung der Epidermis, des Follikels und der Talgdrüse bei (Blanpain C., 2004; Claudinot S., 2005; Ghazizadeh & Taichman, 2001; Morris *et al.*, 2004; Tumber *et al.*, 2004).

5.3.2 Multipotente Stammzellen der Dermis

2001 erschien erstmals ein wissenschaftlicher Artikel in dem renommierten Journal *Nature Cell Biology* über eine bahnbrechende Entdeckung von multipotenten Stammzellen aus der Dermis juveniler und adulter Mäuse und vom Menschen (Toma *et al.*, 2001).

Da mit Ausnahme für die hämatopoetischen Stammzellen keine Oberflächenproteine bekannt sind, mittels derer generell eine Isolation mesenchymaler Stammzellen aus der Dermis möglich wäre, modifizierte diese Arbeitsgruppe eine Isolationsmethode, die ursprünglich zur Gewinnung von neuronalen Stammzellen aus dem Gehirn etabliert wurde (Reynolds & Weiss, 1992; Toma *et al.*, 2001).

Durch die Kultivierung der isolierten Zellsuspension in einem spezifischen serumfreien, mit bFGF und EGF ergänzten Kulturmedium erreichten sie eine selektive Proliferation einer

Subpopulation der gesamten Zellsuspension. Diese Subpopulation proliferierte als schwimmende Zellsphären, ähnlich der adulten Stammzellen, die aus dem Gehirn isoliert werden konnten.

Neben dem adulten Stammzellmarker Nestin exprimierten die Zellen Fibronektin, ein Protein, das hauptsächlich von Bindegewebszellen gebildet wird und auch in mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks nachgewiesen wurde (Azizi *et al.*, 1998). Die Zellen wiesen somit Marker sowohl für neuronale als auch für mesenchymale Stammzellen auf. Ein weiterer Vergleich und eine detailliertere Charakterisierung des Phänotyps blieben leider aus.

Neuronale Differenzierungsversuche dieser Studie belegten die Differenzierung in verschiedene neuronale Zelltypen und in glatte Muskelzellen. Subsequente Versuche ergaben eine Differenzierung zu Adipozyten. Dadurch konnte ein keimblattübergreifendes Differenzierungspotential hin zu Zelltypen des Ektoderms (Neuronen, Astrozyten) und des Mesoderms (glatte Muskelzellen, Adipozyten) gezeigt werden. Versuche zur Isolierung dieser Zellen aus den einzelnen Hautkomponenten identifizierten die Dermis als potentielle Nische dieses Stammzelltyps.

Diese als SKPs (skin derived precursors) bezeichneten Stammzellen konnten bisher aus der Haut adulter Mäuse, Ratten und des Menschen, sowie aus der Haut von Schweineföten isoliert werden (Dyce *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2006; Joannides A., 2004; Toma *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009). SKPs aus der Haut von Schweineföten verfügten *in vitro* über ein Potential zur Differenzierung zu Keimzellen und konnten zu oozyten-ähnlichen Zellen differenziert werden (Dyce *et al.*, 2006).

Eine Charakterisierung des molekularen Phänotyps von SKPs durch die Messung der Expression von typischen Oberflächenproteinen und stammzellassozierten Genen blieb größtenteils unberücksichtigt. Somit ist ein Vergleich mit Stammzellpopulationen anderer Ursprungsgewebe bisher nicht möglich.

Neuere Studien zeigten, dass SKPs aus fötaler Schweinehaut die pluripotenzassozierten Gene Oct3/4, Sox2 und Stat3 exprimieren. Durch die Messung der Expression dieser und nur weniger weiterer untersuchter stammzellassoziierter Gene konnte gezeigt werden, dass SKPs wie auch MSCs heterogene Zellpopulationen sind (Dyce *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009).

Fernandes *et al.* 2004 untersuchten den embryonalen Ursprung und die potentielle Stammzellnische der SKPs näher. Ihre Ergebnisse zeigten, dass SKPs bereits während der Embryogenese isoliert werden können und bis hin zum adulten Organismus überdauern. Die

zuvor grob definierte Nische der SKPs (Dermis) konnte ebenfalls spezifiziert werden, wobei SKPs im Haarfollikel nachgewiesen werden konnten. Ergebnisse von Markeranalysen und *In ovo* Transplantationen von SKPs deuten darauf hin, dass SKPs ihren embryonalen Ursprung in der Neuralleiste und somit letztendlich im Ektoderm haben (Fernandes *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2008).

Mit einer ähnlichen Methode konnten vergleichbare Zellen aus humanem Skalpgewebe isoliert werden (Shih *et al.*, 2005). Allerdings wurden diese Zellen in einem Proliferationsmedium kultiviert, das neben den beiden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF 10% FCS enthielt.

Im Vergleich zu SKPs proliferierten sie adhärent und zeigten phänotypisch große Ähnlichkeiten mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.

Neben der Differenzierung zu neuronalen Zelltypen waren diese Zellen zu einer induzierten osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung fähig.

Dies beschreibt ebenfalls eine Differenzierung in Zelltypen zweier Keimblätter, da neuronale Zelltypen dem Ektoderm entstammen und Knochen-, Fett-, und Knorpelzellen ihren embryonalen Ursprung im Mesoderm haben (Doe & Goodman, 1985; Gregoire *et al.*, 1998).

Stammzellen, die aus der Dermis humaner Haut isoliert wurden und ohne die beiden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF nur in Anwesenheit von FCS kultiviert wurden, differenzierten spontan in Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter, was eine Pluripotenz dieser mesenchymalen Stammzellen aus der Dermis vermuten lässt (Kajahn *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2006). Diese Zellen exprimierten embryonale Stammzellmarker wie Oct3/4 oder klassische Oberflächenmarker mesenchymaler Stammzellen wie CD29, CD44, CD81 und CD105 (Kajahn *et al.*, 2008).

Auch aus dem Haarfollikel konnte neben den oben beschriebenen epidermalen Stammzellen eine weitere Stammzellpopulation isoliert werden. Diese scheint nach bisherigen Kenntnissen ebenfalls in der Bulgregion zu überdauern und ist wie SKPs und MSCs aus dem Knochenmark positiv für das Markerprotein Nestin. Unabhängige Untersuchungen belegten das Potential zur induzierten osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung und auch zur Differenzierung in neuronale Zelltypen und Muskelzellen (Hoogduijn *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006).

Da nur das osteogene und chondrogene Differenzierungspotential von SKPs bisher nicht untersucht wurde, kann vermutet werden, dass SKPs und adhärenzwachsende dermale Stammzellen möglicherweise die gleichen Zellen sind, die nur in unterschiedlichen Kulturmedien unterschiedlich proliferieren (Zhao *et al.*, 2009).

6. Ziel dieser Studie

Das oben beschriebene enorme keimblattübergreifende Differenzierungspotential dermalen Stammzellen und ihre leichte Zugänglichkeit durch kleine minimalinvasive Hautbiopsien machen diese zu einem sehr attraktiven Zelltyp im Hinblick auf die Lagerung in Genbanken als unterstützende Maßnahme für *in situ*-Projekte.

Unklar bleibt jedoch, ob dieser Zelltyp generell von jeder Säugetierart isoliert werden kann.

Primäres Ziel dieser Studie ist somit die Etablierung einer standardisierbaren Isolationsmethode dermalen Stammzellen aus der Haut des adulten Hausschweins, das möglicherweise die Funktion des Modells für eine Vielzahl verwandter Arten, darunter auch gefährdete Arten, übernehmen kann.

Aus einer Vielzahl physiologischer Gründe wird das Hausschwein häufig als Modellorganismus für die Beantwortung von humanmedizinischen Fragestellungen herangezogen (Cozzi & White, 1995; Dick & Scott, 1992; Hidetaka *et al.*, 2008; Min *et al.*, 2002; Schmoeckel *et al.*, 1998; Simon & Maibach, 2000; Sonoyama *et al.*, 2006; Zaidi *et al.*, 1998).

Frühere Arbeiten zeigten, dass die oben beschriebenen multipotenten SKPs bereits aus der Haut von Schweineföten erfolgreich isoliert werden konnten (Dyce *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009). Eine Übertragung der Ergebnisse auf das adulte Hausschwein gelang bisher jedoch nicht.

Somit zielt diese Arbeit auf die Isolation von dermalen Stammzellen aus der Haut des adulten Hausschweins als nichtgefährdetem Modellorganismus.

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten und untersuchten Zellen werden im Folgenden mit pSSCs (porcine skin derived stem cell-like cells) abgekürzt.

Mesenchymale Stammzellen zeichnen sich durch ein hohes Proliferationspotential und durch die Fähigkeit zur Bildung von Zellkolonien aus einzelnen Zellen aus. Um den Stammzellcharakter der isolierten Zellen zu untersuchen, wurden unter anderem Langzeitstudien zur Ermittlung der Proliferationsgeschwindigkeit und Versuche zur Koloniebildungsfähigkeit der isolierten Zellen (Colony forming unit assay) durchgeführt.

Um die pSSCs mit mesenchymalen Stammzellen anderer Gewebe zu vergleichen, wurde die Expression der Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 untersucht, die klassischerweise zur phänotypischen Charakterisierung von humanen mesenchymalen

Stammzellen des Knochenmarks und auch embryonaler Stammzellen herangezogen werden. Zudem wurde die Ko-Expression von Nestin und Fibronectin, beides Markerproteine für MSCs und SKPs, immunozytochemisch untersucht.

Wie einleitend geschildert, sind für die Pluripotenz embryonaler Stammzellen vor allem die Transkriptionsfaktoren Stat3, Oc3/4 und Sox2 ausschlaggebend. Neben diesen Faktoren spielen gerade für adulte Stammzellen weitere Gene wie Bcrp1, Bmi1 und Nestin eine bedeutende Rolle und verweisen auf einen undifferenzierten Zustand. Deshalb wurde die Expression dieser Gene von pSSCs mittels RT-PCR analysiert.

Sowohl SKPs als auch MSCs des Knochenmarks besitzen das Potential zur induzierten Differenzierung in neuronale Zelltypen. Diese Differenzierung geht einher mit einer Herunterregulation von Nestin und einer Hochregulation von Proteinen, die mit ausgereiften neuronalen Zelltypen assoziiert sind. Zur Überprüfung des neurogenen Differenzierungspotentials wurden pSSCs den gleichen Differenzierungsbedingungen ausgesetzt wie SKPs und die Expression der Proteine Nestin, β -III-Tubulin, GFAP, NF-M und α -SMA immunozytochemisch und ihre Regulation durchflusszytometrisch ermittelt.

Da bekannt ist, dass oftmals Zellen adulter Stamm- und Vorläuferpopulationen ihre Eigenschaften mit der Expansion (bzw. Anzahl der Populationsverdopplungen) ändern (Gao & Raff, 1997; Panchision & McKay, 2002; Wren *et al.*, 1992), spontan differenzieren (Danner *et al.*, 2007; Kajahn *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2004) oder gar ihr Differenzierungspotential verlieren (Douagi *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), wurde untersucht, inwiefern sich jüngere von älteren Passagen in ihrer Expression von stammzellassozierten Genen und Oberflächenproteinen sowie im neurogenen Differenzierungsverhalten unterscheiden.

Wegen der beabsichtigten Kryokonservierung der Zellen stellt sich die Frage, inwiefern sich herkömmliche Kryokonservierungsmethoden auf die genannten Eigenschaften auswirken. Auch hierzu wurden Expressionsstudien der stammzellassozierten Gene und Oberflächenproteine durchgeführt, sowie neuronale Differenzierungsversuche, die mögliche Auswirkungen der Kryokonservierung auf die pSSCs darlegen.

Mesenchymale Stammzellen besitzen ein sehr breites Differenzierungspotential und können neben der Differenzierung zu neuronalen Zelltypen auch induzierte osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungswege durchlaufen. Dies verdeutlicht das keimblattübergreifende Differenzierungspotential, da neuronale Zelltypen ursprünglich dem Ektoderm entspringen, Fett-, Knorpel-, oder Knochenzellen jedoch ihren Ursprung im

Mesoderm haben. Um die Fähigkeit zur keimblattübergreifenden Differenzierung der pSSCs zu belegen, wurden adipogene Differenzierungsversuche mit einem Differenzierungsmedium durchgeführt, das ursprünglich zur adipogenen Differenzierung humaner MSCs etabliert wurde. Die adipogene Differenzierung geht einher mit der Bildung intrazellulärer Lipidtropfen und der Expression von Leptin, einem Proteohormon, das nahezu ausschließlich von Adipozyten gebildet wird. Klassischerweise wurde die Bildung von zytoplasmatischen Lipidtropfen durch eine Färbung mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red O und die Expression des Leptingens mittels RT-PCR untersucht.

7. Material

7.1 Materialien und Lösungen für die Zellkultur

7.1.1 pSSC Isolation und Zellkultur

CASY [®] ton-Lösung	CASY [®] Technology, Reutlingen, Deutschland
Fetal Bovine Serum Gold (FCS Gold)	PAA, Cölbe, Deutschland
Hautproben (Hausschwein)	Elmars Metzgerei, Kordel, Deutschland
HBSS ohne Ca & Mg	PAA, Cölbe, Deutschland
1 x PBS ohne Ca & Mg	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

7.1.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Für alle Medien wurden, wenn nicht anders erwähnt, die Nährmedien DMEM und Ham's F12 im Verhältnis 1:1 als Grundmedium verwendet. Grundsätzlich, wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Medien mit 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM/ml L-Glutamin und FCS Gold (10%) ergänzt.

DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ham's F12	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	PAA, Cölbe, Deutschland
Penicillin 10.000 Units/ml	PAA, Cölbe, Deutschland
Streptomycin 10 mg/ml	PAA, Cölbe, Deutschland

7.1.2.1 Transportmedium

Fungizone (Amphotericin B) 12,5 µg/ml ohne FCS Gold	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
---	------------------------------------

7.1.2.2 Proliferationsmedium (PM)

B27 Neuromix (10x)	PAA, Cölbe, Deutschland
--------------------	-------------------------

7. Material

Rec. Human EGF	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rec. Human FGF-Basic	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

7.1.2.3 Neurogenes Differenzierungsmedium (NDM)

B27 Neuromix ohne FCS Gold	PAA, Cölbe, Deutschland
-------------------------------	-------------------------

7.1.2.4 Adipogenes Differenzierungsmedium (ADM)

DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dexamethasone	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Indometacin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Insulin aus dem Schweinepankreas	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ohne Ham's F12	

7.1.2.5 Kryokonservierungsmedium

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum Gold (FCS Gold)	PAA, Cölbe, Deutschland
ohne DMEM/Ham's F12, ohne Antibiotika, ohne L-Glutamin	

7.2 Lösungen und Reagenzien für die Gen-Expressionsanalysen

RNase DNase free Water	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
------------------------	---

7.2.1 Puffer und Lösungen für die RNA Isolation

Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
1 x Tris HCl	ICN Biomedical Inc., Aurora, USA
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

7.2.2 Enzyme, Puffer und Lösungen für die cDNA Synthese

dNTP Mix

MuLV Reverse Transcriptase

PCR Puffer II + MgCl₂-Lösung

Random Hexameres

RNase Inhibitor

alle Applied Biosystems, Darmstadt,
Deutschland

7.2.3 Enzyme, Puffer und Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

dNTP Mix

MgCL2-Lösung

Taq DNA Polymerase

10x Taq Polymerase Puffer

alle Fermentas, St. Leon-Rot,
Deutschland

7.2.4 Oligonukleotide

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen

Gen	5' DNA Sequenz 3'	Produktgröße (bp)	Annealing Temp
Oct3/4*	F:GCCTTTCCTCGGTGTCT R: CCTTTGTGTTCCCAATTCCTT	182	58°C
Sox2**	F: AATGCCTTCATGGTGTGGTC R: CGGGGCCGGTATTTATAATC	203	62°C
Stat3*	F: CCGTACCTGAAGACCAAGT R:GGTTCAGCAGCTTCACCATT	129	56°C
Bcrp1/ABCG2**	F: GGCTTAGACTCCAGCACAGC R:TGGAGGCAAAGTATCCCAAG	196	62°C
Bmi1**	F: ATATTTACGGTGCCCAGCAG R: GAAGTGGCCCATTCCTTCTC	179	62°C
Nestin*	F: GGCTTCTCTCAGCATCTTGG R: AAGGCTGGCATAGGTGTGTC	150	65°C
Leptin*	F: CAAGACGATTGTCACCAGGA R: TTGGATCACATTTCTGGAA	184	56°C
HPRT*	F: CCAGTAAACGGGCGATATAA R: CTTGACCAAGGAAAGCAAGG	130	60°C

* Primer zuvor veröffentlicht in Dyce et al. 2004, ** Primer zuvor veröffentlicht in Iohara et al. 2006

Alle Primer wurden synthetisiert von Biomers, Ulm, Deutschland.

7.2.5 Materialien und Lösungen für die Gel-Elektrophorese

Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
50bp DNA Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green	Lonza, Köln, Deutschland
10 x TBE-Puffer	Merk, Darmstadt, Deutschland

7.3 Lösungen für die Immunocytochemie und Durchflusszytometry

7.3.1 Lösungen und Reagenzien zur Zellpreparation

Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BD Cytoperm/Cytofix Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield Abdeckmedium mit DAPI	Linaris, Wertheim, Deutschland
Poly-D-Lysin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ziegenserum	PAA, Cölbe, Deutschland

7.3.2 Antikörper

7.3.2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper und angewandte Verdünnungen

Antigen	Art/Unterklasse/Konjugat	Verdünnung IF	Verdünnung FACS	Hersteller
CD9	Maus monoklonal, FITC		1:5	Abcam, Cambridge, England
CD29	Maus monoklonal, FITC		1:5	Abcam, Cambridge, England
CD44	Maus monoklonal, PE		1:5	Abcam, Cambridge, England
CD90	Maus monoklonal, FITC		1:100	Biozol, München, Deutschland
CD105	Maus monoklonal, FITC		1:5	Abcam, Cambridge, England
Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA)	Maus monoklonal	1:100	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Beta-III-Tubulin (β -III-tubulin)	Maus monoklonal	1:100	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fibronectin	Kaninchen monoklonal	1:100		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Maus monoklonal	1:100	1:100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Medium Neurofilament (NF-M)	Maus monoklonal	1:100		Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Nestin	Maus monoklonal	1:100	1:100	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

7.3.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper und angewandte Verdünnungen

Antigen	Art/Unterklasse/Konjugat	Verdünnung IF	Verdünnung FACS	Hersteller
Maus IgG	monoklonal, FITC	1:100		Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Ziege IgG	monoklonal, PE	1:100		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

7.4. Gebrauchswaren

Chambersslides	Nunc GmbH und Co. KG Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Reaktionsgefäße, Plastikware	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland BD Falcon, Heidelberg, Deutschland Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Skalpellsklingen	Swann Morton, Sheffield, England

7.5 Ausstattung

CO ₂ -Inkubator	Hera Cell 240, Heraeus
Durchflusszytometer	FACSCalibur, BD Biosciences
Eismaschine	AF 80, Scotsman
Elektrophorese Apparatur	Hoefer® HE 33, Pharmacia Biotech.
Elektrophorese Apparatur	Biozym
Fluoreszenz Mikroskop	Orthoplan SM-Lux SN, Leica Microsystems
Haemocytometer	Blaubrand®, Brand
Kamera	Kodak Digital Science 1D, Kodak
Mikroskop Axiovert	40 CFL, Carl Zeiss AG
Mikroskope Kamera	MS 140, Intas
pH-Meter	Digital pH-meter780, Metrohm
Power Supply	Power Pack P25, Biometra
Spektrophotometer	Synergy™ HT, BioTek
Sterilwerkbank	Hera Safe, Heraeus
Thermaocycler	T-Gradient, Biometra
Thermomixer	Thermomixer Compact, Eppendorf
UV-Illuminator	TFX-35 M, Life Technologies
Vortexer	VX 100, Labnet
Wasserbad	TW20, Julabo Labortechnik GmbH
Zellzähler	DT, CASY® Technology
Zentrifugen	5417 R, Eppendorf; Multifuge 1 S-R, Heraeus

8. Methoden

8.1 Biopsie und Probentransport

Zur Isolation potentieller Stammzellen aus der Schweinehaut (porcine skin derived stem cell-like cells; pSSCs) wurden von sechs Monate alten Sauen (*Sus scrofa domestica*) Hautbiopsien am Unterschenkel entnommen. Die Proben wurden von Elmars Metzgerei (Kordel) zur Verfügung gestellt. Die Biopsie erfolgte unmittelbar nach Tötung der Tiere im Rahmen der Routineschlachtung des Betriebes. Diese wird nach der Richtlinie 93/119/EG des Rates vom 22. Dezember 1993 über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Schlachtung oder Tötung durchgeführt.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Bioplat in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit Transportmedium (DMEM/Ham's F12 [1:1], 1 µg/ml Fungizone, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamine) überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert. Die Aufarbeitung der Bioplate erfolgt grundsätzlich innerhalb einer Stunde bis zwei Stunden nach der Entnahme.

8.2 Isolation primärer Zellen

Die pSSCs wurde nach einer modifizierten Methode nach Thoma *et al.* isoliert (Thoma *et al.*, 2001). Dabei wurden die Hautbiopsien eines Tieres in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 25 ml HBSS überführt und durch leichtes Schütteln gewaschen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt, wobei zwischen jedem Waschschrift die Proben in jeweils neue 50 ml Falcon-Röhrchen mit frischem HBSS gegeben wurden. Anschließend wurde unerwünschtes Fett- und Muskelgewebe sorgfältig mittels Skalpell und Pinzette entfernt. Um ein Austrocknen der Proben während der Aufreinigung zu vermeiden, wurden diese zuvor in eine Petrischale (Ø 10 cm) überführt und mit ausreichend HBSS benetzt.

Die von unerwünschtem Gewebe befreiten Hautbiopsien wurden erneut in Petrischalen (Ø 10 cm) mit HBSS gegeben und mit Skalpell und Pinzette in 2-3 mm² große Stücke zerschnitten. Diese wurden anschließend dreimal mit HBSS in 50 ml Falcon-Röhrchen durch leichtes Schütteln gewaschen.

Zur Isolation der Zellen wurden anschließend die Hautfragmente in einer Petrischale (Ø 3,2 cm) mit 5 ml 0,25%-iger Trypsin/EDTA Lösung gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nachfolgend wurden die Hautfragmente samt Trypsin/EDTA Lösung in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 37 °C 30 min im Wasserbad inkubiert.

Die Trypsinaktivität wurde durch die Zugabe von 15 ml HBSS mit 10% FCS Gold gestoppt. Die angedauten Hautfragmente wurden dann durch abwechselndes vortexen und auf- und abpipettieren mit sterilen 10 ml Einwegpipetten über einen Zeitraum von fünf Minuten mechanisch dissoziiert. Die unverdauten Hautreste wurden entfernt und die erhaltene Zellsuspensionen je Tier durch einen 40 µm Zellstrainer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gefiltert.

Anschließend wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei Raumtemperatur bei 160 x g zentrifugiert und die erhaltenen Zellpellets in 10 ml frischem HBSS resuspendiert und erneut für fünf Minuten bei 160 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt. Ein dritter Waschschrift erfolgte in frischem Transportmedium (DMEM/Ham's F12 [1:1], 1 µg/ml Fungizone, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamine). Jedes erhaltene Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Proliferationsmedium (PM: DMEM/Ham's F12; [1:1], 10% FCS Gold, 2% B27, 40 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamine) resuspendiert.

8.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurde mittels Trypan-Blau-Inkorporation und anschließender Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurden 10 µl pro Zellsuspension entnommen und mit 10 µl einer 0,4%-igen Trypan-Blau-Lösung vermischt. Der Diazofarbstoff Trypan-Blau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, da er die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Abgestorbene Zellen dagegen nehmen den Farbstoff auf, der dann an intrazelluläre Proteine bindet und die toten Zellen blau färbt. Unmittelbar nach der Zugabe der Trypan-Blau-Lösung wurde die Probe in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die Anzahl lebender Zellen (ungefärbt) bestimmt. Hierzu wurden vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die mittlere Zellzahl zu berechnen.

Die Zellen wurden dann initial in 5 ml PM mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche in T25 Zellkulturflaschen ausgesät.

8.4 Zellaufreinigung und Zellkultur

Der erste Mediumwechsel erfolgte in Abhängigkeit von Spenderunterschieden hinsichtlich der Zelladhärenz nach 1-4 Tagen. Durch diesen ersten Mediumwechsel wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt. Da die gesamte Hautbiopsie zur Isolation von pSSCs

herangezogen wurde, enthielt die primäre Zellpopulation sowohl Keratinozyten aus der Epidermis als auch bereits differenzierte Zellen aus der Dermis.

Zur Aufreinigung der Zellen wurde das Medium entfernt und die adhärenierten Zellen mit 5 ml HBSS (37 °C) gewaschen. Die Zellen wurden für 60-90 Sekunden mit einer 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Dadurch lösten sich die undifferenzierten pSSCs, wogegen differenzierte Zellen und Keratinozyten immer noch adherierten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Trypsinaktivität durch die Zugabe von 5 ml HBSS mit 10% FCS Gold gestoppt und die pSSCs enthaltende Zellsuspension in ein 10 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur bei 160 x g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde erneut in 5ml PM resuspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche gegeben. Die noch immer adhärenierten Zellen wurden verworfen.

Wurden nach der ersten Aufreinigung nach dem Adhärenieren der Zellen an der Wachstumsoberfläche weitere Verunreinigungen mit differenzierten Zellen oder Keratinozyten festgestellt, wurde der Aufreinigungsprozess wiederholt. Dies wurde sofort durchgeführt, bis mikroskopisch eine morphologisch einheitliche Zellpopulation zu erkennen war. Die Aufreinigung erforderte generell 2-4 Wiederholungen.

Die isolierten und aufgereinigten pSSCs wurden dann routinemäßig in einer Dichte von 3000 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultur erfolgte im Proliferationsmedium unter Standardkulturbedingungen (37 °C und 5% CO₂-Begasung). Das Medium wurde regelmäßig nach 3 Tagen gewechselt.

8.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung der pSSCs wurden diese bis zur Konfluenz in T75 Zellkulturflaschen kultiviert, mit HBSS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach der Zentrifugation (160 x g, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 4 ml kaltem Einfriermedium (90% FCS Gold, 10% DMSO) resuspendiert, die Zellsuspension in 4 Kryoröhrchen aliquotiert (entspr. ca. 2 x 10⁶ Zellen pro Aliquot) und mit einem Einfriergerät („Mr. Frosty“, Nunc und Co. KG Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden, Deutschland) langsam (1 °C/min) auf -80 °C abgekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C (Wasserbad) aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und das im Einfriermedium enthaltene DMSO durch Zugabe von 10 ml HBSS herausverdünnt. Nach Zentrifugation (160 x g, 5 min) wurden die Zellen in PM aufgenommen und in Abhängigkeit der Versuchskonzeption in T25- oder T75-Zellkulturflaschen ausgesät.

8.6 Proliferationsrate und Verdopplungszeit

Zur Ermittlung der Proliferationsrate wurden die Zellen unmittelbar nach der Aufreinigung mit 3000 Zellen/cm² Wachstumsfläche in T25 Zellkulturflaschen in PM ausgesät und unter beschriebenen Bedingungen kultiviert. Regelmäßig wurden die Zellen bei nahezu 90%-iger Konfluenz nach sieben Tagen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml HBSS (37 °C) gewaschen. Das Ablösen der Zellen von der Wachstumsfläche erfolgte durch Zugabe von 1 ml 0,25%-iger Trypsin/EDTA Lösung und einer nachfolgenden Inkubation bei 37 °C für 3 min. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 4 ml HBSS mit 10% FCS Gold gestoppt und die Zellsuspension bei 160 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden erneut in 1 ml PM resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauerkammer nach vorangegangener Inkubation eines Zellalliquots mit einer 0,4%-igen Trypan-Blau-Lösung. Die pSSCs wurden anschließend erneut mit 3000 Zellen pro cm² Wachstumsfläche in T25 Zellkulturflaschen in PM ausgesät und wie beschrieben bis zur nächsten Passage kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 126 Tagen. Aus zeitlichen und finanziellen Gründen wurde der Versuch nach 126 Tagen beendet.

Die Populationsverdopplung wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$PD = (\ln N - \ln N_0) / \ln 2$$

PD = Anzahl der Populationsverdopplungen

N = Zellzahl

N₀ = Initiale Zellzahl

Die ermittelten Populationsverdopplungen pro Passage wurden zur Kalkulation der kumulativen Populationsverdopplung addiert.

Die Verdopplungszeit ergibt sich aus der Anzahl der Tage in Zellkultur, dividiert durch die Anzahl erreichter Populationsverdopplungen.

8.7 Messung des Zelldurchmessers

Die Messung des Zelldurchmessers erfolgte mit einem CASY DT Zellzähler. Dazu wurden die Zellen vor den jeweiligen durchflusszytometrischen Messungen trypsinisiert und in 10 ml HBSS resuspendiert. 25 µl der Zellsuspension wurden in 10 ml CASY[®]ton-Lösung

aufgenommen und anschließend jeweils in 400 µl Zellsuspension dreimal gemessen. Die Werte der drei Messungen werden vom CASY-System automatisch gemittelt, und die mittlere Verteilung des Zelldurchmessers wird als Histogramm dargestellt.

8.8 Assay zur Ermittlung koloniebildender Einheiten

Zur Ermittlung der Koloniebildungseffizienz wurden Zellen der Passage 5 von drei Tieren trypsinisiert und nach DiGirolamo mit 10 Zellen pro cm² Wachstumsfläche in für die Zellkultur geeignete Petrischalen (Ø 6 cm) ausgesät (DiGirolamo *et al.*, 1999). Die Kultivierung erfolgte in PM unter den beschriebenen Bedingungen jeweils über einen Zeitraum von 11 Tagen. Pro untersuchtem Tier und pro Passage wurden drei Petrischalen zur Versuchsabsicherung angesetzt. Nach Ablauf der 11 Tage wurden die Zellkolonien in 95%-igem Isopropanol für 5 min fixiert und nachfolgend mit 1 ml einer 0,4%-igen Trypan-Blau-Lösung 30 min gefärbt und anschließend mit jeweils 5 ml deionisiertem H₂O dreimal gewaschen.

Die Zellkolonien wurden fotografisch dokumentiert (Canon IXUS 70) und unter Verwendung digitaler Analysesoftware (Image J) ausgezählt und vermessen. Zur Vermessung der einzelnen Kolonien wurde der Durchmesser der Petrischale von 6 cm als Vergleichsmaß herangezogen und der Durchmesser der Kolonien dazu in Relation gesetzt. Kolonien, die kleiner als 1 mm waren, wurden nicht berücksichtigt. Die erfassten Kolonien wurden in 4 Größenklassen eingeteilt (1-2 mm, 2-3 mm, 3-4 mm, >5 mm) und die Ergebnisse der Triplikate pro Tier gemittelt. Die Kolonie-Bildungs-Effizienz ergibt sich aus dem prozentuellen Anteil der ausgesäten Zellen, die in der Lage sind, Kolonien zu bilden.

8.9 Gen-Expressionsanalyse

8.9.1 RNA-Isolation

Zur Analyse der Genexpression der isolierten pSSCs wurde die Gesamt-RNA isoliert und nachfolgend die Expression ausgewählter Genfragmente mittels Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Die Gesamt-RNA wurde unter Anwendung des vom Hersteller empfohlenen Protokolls mit TRIzol® isoliert (Guanidinium Thiocyanat-Chloroform-Phenol Extraktion nach Chomczynski & Sacchi, 1987). Hierzu wurden die in T25 kultivierten Zellen mit 5 ml HBSS gewaschen und durch Zugabe von 3 ml TRIzol® und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Die 3 ml Zelllysate wurden zu je 1 ml in 3 x 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert. Zu

jedem Aliquot wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben kurz geschüttelt und bei Raumtemperatur weitere 10 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Aliquote bei 14000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Dies bewirkt eine Phasenseparation, wobei die untere organische Phase die DNA enthält, die mittlere Phase die Proteine und eine wässrige obere Phase die RNA enthält.

Die wässrige Phase wurde abgehoben und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol, einer erneuten Inkubation für 10 min und einem anschließenden Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C wurde die RNA ausgefällt und am Boden des Reaktionsgefäßes als gel-artiges Pellet sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet nach kurzem Lufttrocknen in 50 µl DNase-RNase-freiem Wasser eluiert.

Der RNA-Gehalt und die Reinheit jedes RNA-Aliquots wurde photometrisch bestimmt. Die Konzentration der RNA kann durch Ihre Absorption bei 260 nm berechnet werden.

Eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen kann durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden, da das Absorptionsmaximum von Proteinen, basierend auf der Absorption aromatischer Aminosäureresten, bei 280 nm liegt. Bei einem Verhältnis zwischen 1,8-2,0 kann davon ausgegangen werden, dass keine Proteinverunreinigung vorliegt. Liegen gemessene Werte außerhalb dieses Bereiches wurde die jeweilige RNA-Probe mit 70% Ethanol gewaschen und erneut der RNA Gehalt photometrisch bestimmt.

Die RNA-Aliquote wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung zur RT-PCR bei -80°C gelagert.

8.9.2 DNase I Verdauung

Um generell eine Verunreinigung der Isolierten RNA mit genomischer DNA ausschließen zu können, bedarf es einer DNA-Verdauung mittels DNase I und einer nachfolgenden Aufreinigung der RNA durch eine Alkoholfällung.

Der DNase I Reaktionsansatz bestand aus 0,5 Kuniz units DNase I, einem Volumen RNA-Lösung, entsprechend 2 µg RNA, 2 µl RDD Puffer, und 0,5 µl RNase Inhibitor. Dieser wurde mit DNase-RNase-freiem H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz durch sanftes Pipettieren gemischt und für 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Durch eine abschließende Inkubation bei 65°C für 5 min wurde die Aktivität der DNase durch Denaturierung gestoppt.

Die RNA wurde erneut, wie oben beschrieben, mit Isopropanol gefällt und mit 500 µl Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 min bei 14000 rpm wurde der Überstand

verworfen und nach kurzem Lufttrocknen das saubere RNA Pellet in 10 µl DNase-RNase-freiem H₂O eluiert.

8.9.3 cDNA Synthese

Zum Umschreiben der RNA in cDNA (complementary DNA) wurden 2 µg RNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Komponenten des Reaktionsansatzes gibt Tabelle 5 wieder.

Tabelle 5: Verwendete Komponenten des Mastermix zur cDNA Synthese

Mastermix (20 µl Ansatz/Probe)	
2 µl	10 x RT-Puffer
4 µl	MgCl ₂ 25 mM
1 µl	dNTPs 100 mM
1 µl	Random Hexameres 500 µM
1 µl	RNase Inhibitor 20 u/µl
1 µl	Reverse Transkriptase 50 u/µl
10 µl	Mastermix

Der Mastermix wurde für die entsprechende Probemenge hergestellt und in die jeweiligen Reaktionsgefäße eingefüllt, 2 µg RNA in 10 µl DNase-RNase-freiem Wasser verdünnt, zum Mastermix hinzugegeben und gut durchmischt. Die Übersetzung der RNA erfolgte im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) in Abhängigkeit der verwendeten Reversen Transkriptase bei 22°C für 10 min, 42 °C für 15 min und einem finalen Schritt bei 99°C für 5 min. Die cDNA wurde dann entweder direkt zur PCR weiter verwendet oder bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

8.9.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur PCR wurden 5 µl cDNA eingesetzt. Tabelle 6 gibt die Zusammensetzung des verwendeten Mastermixes wieder.

Tabelle 6: Verwendete Komponenten des Mastermix zur PCR

Mastermix (50 µl Ansatz/Probe)	
5 µl	10 x Taq-Puffer
4 µl	MgCl ₂ 25 mM
1 µl	dNTPs jeweils 2 mM
0,25 µl	Taq-DNA-Poymerase 5 u/µl
10,25 µl	Mastermix

Die notwendige Menge des Mastermix wurde in Abhängigkeit der Probenmenge hergestellt und in die entsprechende Anzahl an Reaktionsgefäßen vorgelegt. Für die Reaktion wurde 1 µl des jeweiligen Forward- und Reverse-Primers in 32,75 µl DNase-RNase-freiem Wasser pro Reaktionsansatz aufgenommen und zu den vorgelegten Reaktionsansätzen beigemischt. Letztendlich wurden 5 µl cDNA pro Reaktionsansatz hinzugegeben, wodurch ein Endvolumen von 50 µl gegeben war. Die Reaktionsansätze wurden durch Pipettieren gut durchmischt und zur Reaktion in den Thermocycler eingesetzt.

Die verwendeten Primersequenzen wurden aus bereits veröffentlichten Publikationen entnommen. Um eine Selektivität der Primer für mRNA zu erreichen, wurden diese so synthetisiert, dass sie exonübergreifend binden, wodurch keine genomische DNA amplifiziert werden kann. Tabelle 2 gibt die Sequenzen der verwendeten Primer wieder.

Ausnahme stellen die verwendeten Sox2 Primer und die Oct3/4 Primer dar. Da die DNA Sequenz des Sox2 Genes keine Introns enthält, konnten keine exonübergreifenden Primer hergestellt werden. Die Oct3/4 Primer liegen im letzten Exon der 3'UTR Region des Gens. Auch hier befinden sich keine Introns.

Um jegliche Interferenzen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde, wie oben beschrieben, die genomische DNA vor der Reversen Transkription verdaut. Zur weiteren Absicherung wurden bei jeder RT-PCR Kontrollreaktionen durchgeführt, bei denen im RT-Schritt die Reverse Transkriptase weggelassen wurde. Sollte nach der PCR dennoch ein PCR-Produkt in dieser Kontrolle nachweisbar sein, kann dieses nur durch eine Kontamination mit genomischer DNA hervorgerufen worden sein.

Die PCR wurde mit einer initialen Denaturierung bei 94°C für 3 min, gefolgt von 35 Zyklen von 30 sec bei 94°C, 30 sec bei der primerabhängigen Annealingtemperatur und 45 sec bei 72°C durchgeführt. Die Reaktion endete mit einem finalen Schritt von 3 min bei 72°C.

Die PCR-Produkte wurden gel-elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid oder SYBR Green und entsprechender UV-Beleuchtung visualisiert.

8.10 Differenzierungsassays

8.10.1 Neurogene Differenzierung

Zur neurogenen Differenzierung wurden die pSSCs je nach benötigter Zellzahl für die unterschiedlichen Versuchskonzeptionen in T25 (RNA Isolation) oder T75 (Durchflusszytometrie), oder auf Poly-D-Lysin beschichteten Chamberslides (Immunocytochemie) kultiviert.

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in PM kultiviert. Anschließend wurden sie mit HBSS (37°C) gewaschen und über einen Zeitraum von 30 Tagen in neuronalem Differenzierungsmedium nach Dyce *et al.* 2004 (DMEM/Ham's F12, 2mM L-Glutamine, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2% B27) kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig alle 3 Tage erneuert.

Während der neurogenen Differenzierung wird, wie einleitend bereits erklärt, das Vorläuferprotein Nestin typischer herunterreguliert. Diese Abnahme der Nestinexpression geht einher mit einer Hochregulation von Proteinen ausdifferenzierter neuronaler Zelltypen.

Deshalb wurde nach der Differenzierung die Expression der intrazellulären Proteine, Beta-III-Tubulin (β -III-Tubulin), GFAP und NF-M durch immunocytochemische Färbungen überprüft.

Die Quantität der Expression der genannten Proteine inklusive Nestin wurden nach der Differenzierung durchflusszytometrisch ermittelt. Hierbei dienten undifferenzierte pSSCs gleicher Passagen als Referenz.

Auch die Expression des alpha Aktins glatter Muskelzellen (α -SMA, alpha smooth muscle actin) wurde sowohl qualitativ immunocytochemisch als auch quantitativ durchflusszytometrisch gemessen. Zur Ermittlung der Signifikanz gemessener Expressionsänderungen wurde der Studentsche t-Test verwendet.

8.10.2 Adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung wurden die Zellen bei 90%-iger Konfluenz in einem Medium nach Pittenger kultiviert (Pittenger *et al.*, 1999). Dieses Medium setzt sich zusammen aus DMEM, 10% FBS Gold, 0.5 mM Isobutyl-Methylxanthine (IBMX), 10 µg/ml Insulin, 1 µM Dexamethasone, 100 µM Indomethacin und 100 Units/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen. Das Medium wurde regelmäßig alle drei Tage gewechselt.

Die adipogene Differenzierung wurde nachfolgend durch die Färbung intrazellulärer Lipidtropfen mit Oil Red O überprüft. Zudem wurde die mRNA Expression des von Adipozyten synthetisierten Proteohormons Leptin mittels RT-PCR vor und nach induzierter Differenzierung ermittelt.

8.11 Methoden zur Untersuchung der Proteinexpression

8.11.1 Immunozytochemie

Zum Nachweis intrazellulärer Markerproteine wurden die isolierten pSSCs auf Poly-D-Lysin beschichteten Chamberslides (Nunc GmbH und Co. KG Thermo Fisher Scientific, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät (4×10^3 Zellen pro Kammer). Nach der Anhaftung an der Wachstumsfläche (24 h) oder nach abgeschlossener neurogener Differenzierung (30 Tage) wurde das Medium verworfen, die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und mit eiskaltem Methanol:Aceton (7:3) bei -20°C für 5 min fixiert und permeabilisiert (Kruse *et al.*, 2006). Nach drei darauffolgenden Waschschrritten mit HBSS wurden unspezifische Bindungen durch eine 15 minütige Inkubation der Zellen mit einer Blockierungslösung (HBSS + 10% Ziegenserum) bei Raumtemperatur geblockt. Die Zellen wurden dann mit den in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen der primären Antikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C .

Nach drei weiteren Waschschrritten mit HBSS wurde die Bindung der primären Antikörper durch die Inkubation mit den korrespondierenden sekundären Antikörpern Ziege anti-Maus IgG (FITC konjugiert 1:100, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) bzw. Ziege anti-Kaninchen IgG (R-Phycoerythrin konjugiert 1:100, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) detektiert (siehe Tabelle 4). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte bei 37°C für 45 min. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen mit Vectashield Abdeckmedium mit DAPI (Vector; Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland) abgedeckt.

Zur Kontrolle der spezifischen Bindung der verwendeten Antikörper wurden parallel zu jeder Färbung Negativkontrollen durchgeführt. Hierbei wurden die Färbungen ohne primäre Antikörper durchgeführt, was eine Bindung der sekundären Antikörper nicht ermöglichen sollte. Hierdurch konnte die spezifische Bindung aller verwendeten Antikörper bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Färbungen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan SM-Lux SN, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland, 400x Vergrößerung) und der dazugehörigen Kamera (Intas, Göttingen, Deutschland) und Computersoftware (Image-Pro Plus 5.0, MediaCybernetics, Deutschland) photographisch dokumentiert.

8.11.2 Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung der Zellen, die ein spezifisches Markerprotein exprimieren wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert und zwei Mal in PBS

gewaschen. Die Detektion von Oberflächenproteinen erfolgte durch die Inkubation der Zellen bei 4°C für 30 min mit den jeweiligen Antikörpern gegen CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 mit den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen. Tabelle 3 gibt die angewandten Antikörper wieder.

Zur Quantifizierung der intrazellulären Proteinexpression wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit Perm/Wasch-Lösung unter Verwendung des BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit nach den Vorgaben der Herstellers fixiert und permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen mit den bereits oben beschriebenen primären Antikörpern gegen Nestin, Beta-III-Tubulin, GFAP und α -SMA unter Verwendung der gleichen Konzentrationen bei 4°C für 30 min inkubiert.

Nach weiteren drei Waschschritten folgte die Inkubation der Zellen mit dem FITC-konjugierten entsprechenden zweiten Antikörper für 30 min bei 4 °C.

Zur Berücksichtigung eines durch mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper hervorgerufenen Hintergrundsignals wurden bei jeder Messung die Zellen mit einer dem verwendeten Antikörper entsprechenden Isotypenkontrolle inkubiert und gemessen.

Ein Fluoreszenzsignal, das oberhalb der Isotypenkontrolle lag, galt als positiv. Hierbei wurde eine Toleranzgrenze von 2% gesetzt.

Die Messungen erfolgten mit einem FACScalibur Durchflusszytometer. Für jedes untersuchte Protein wurde die Expression von 10.000 Zellen gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels CellQuest Software analysiert und die Proteinexpression quantifiziert als prozentualer Anteil positiver Zellen in Bezug auf die durchgeführten 10.000 Messungen.

8.12 Oil Red O Färbung

Zum Nachweis intrazellulärer Lipide nach der adipogenen Differenzierung der pSSCs wurde der fettlösliche Diazofarbstoff Oil Red O verwendet (Ramírez-Zacarías *et al.*, 1992), welcher spezifisch an Triglyceride, ein Hauptbestandteil tierischen und humanen Fettes, bindet.

Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 60 min mit 10%-igem Formalin fixiert. Nach erneutem Waschen mit deionisiertem H₂O erfolgte eine 10 minütige Inkubation mit 0,3%-igem Oil Red O, gelöst in 60%-igem Isopropanol. Der überschüssige Oil Red O Farbstoff wurde nachfolgend durch mehrmaliges Waschen mit deionisiertem H₂O entfernt.

Die Ergebnisse der Färbung wurden bei 400-facher Vergrößerung photographisch dokumentiert.

9. Ergebnisse

9.1 Isolation und Zellkultur

Ein großes Problem hinsichtlich der Isolation von Stammzellen aus der Dermis ist das Fehlen spezifischer oberflächlicher Markerproteine, die eine Isolation mittels magnetischer Beads oder Durchflusszytometrie ermöglichen würden. Deshalb wurden zur Isolation der pSSCs die gereinigten und zerkleinerten Hautstücke mit Trypsin/EDTA verdaut und nach einem modifizierten Protokoll nach Toma *et al.* isoliert (Toma *et al.*, 2001).

Die isolierten Zellen wurden initial mit einer sehr hohen Dichte (2×10^5 Zellen pro cm^2 Wachstumsfläche) im Proliferationsmedium ausgesät. Nach ein bis zwei Tagen aggregierten die Zellen zu schwimmenden Zellclustern, die sich nachfolgend am Boden der Zellkulturflasche absetzten. Während der darauffolgenden ein bis zwei Tage konnte ein Auswachsen von Zellen aus den Zellclustern beobachtet werden (Abb. 5 A, B).

Da zur Isolation der pSSCs die gesamte Haut inklusive Epidermis und Dermis verwendet wurde, zeigte sich, dass sich verschiedene Zelltypen in der Kultur etablierten. Hierbei bestand ein Großteil der adhären Zellen aus Keratinozyten (Abb. 5 B, C).

In Abhängigkeit der Zelladhäsion erfolgte ein erster Mediumwechsel nach ein bis vier Tagen. Dadurch wurden alle sich noch in Suspension befindenden Zellen entfernt.

Eine Inkubation der Zellkultur zu diesem Zeitpunkt mit 0.25% Trypsin/EDTA bei 37°C über 5 min zeigte ein zeitlich versetztes Ablösen verschiedener Zelltypen von der Wachstumsoberfläche. Hierbei lösten sich die Zielzellen sehr rasch nach 60-90 Sekunden, wogegen Keratinozyten und mögliche differenzierte Zellen weiterhin adhären (Abb. 5 D).

Nach erneutem Aussähen der Zellen wurde in den darauffolgenden Tagen mikroskopisch kontrolliert, ob weitere Keratinozyten oder andere Zelltypen die Kultur verunreinigten. Die Aufreinigung wurde solange wiederholt bis eine einheitliche Zellmorphologie in der Kultur erkennbar war (Abb. 5 E, F). Um eine reine pSSC-Kultur zu erhalten, bedurfte es einer 2-4maligen Wiederholung der Aufreinigungsschritte.

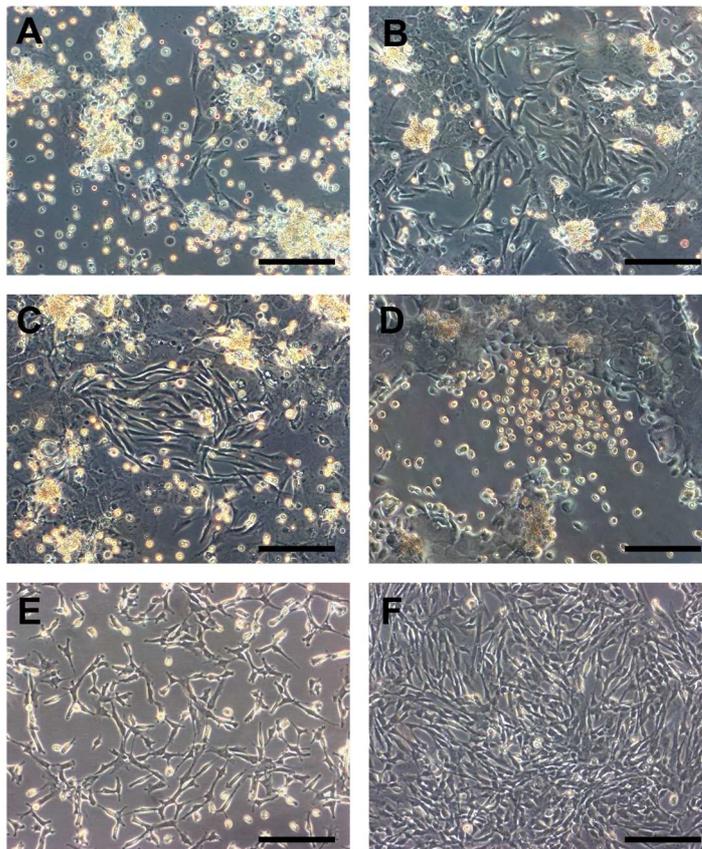


Abb. 5: (A) Primäre Zellkultur 1-2 Tage nach dem initialen Aussähen. (B, C) Zellkultur nach 2-4 Tagen. (D) Ablösen der Zielzellen durch kurzzeitige Inkubation mit Trypsin/EDTA. (E, F) Morphologisch einheitliche pSSC-Kultur nach 2-4maliger Wiederholung der Aufreinigung. Größenbalken: 200µm.

9.2 Charakterisierung der isolierten pSSCs

9.2.1 Morphologie, Zellgröße und Proliferationsverhalten

Abb. 6 zeigt repräsentative Bilder der Morphologie undifferenzierter pSSCs in Passage 5 (entspr. CDP 22). Sie erscheinen als spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Zellen.

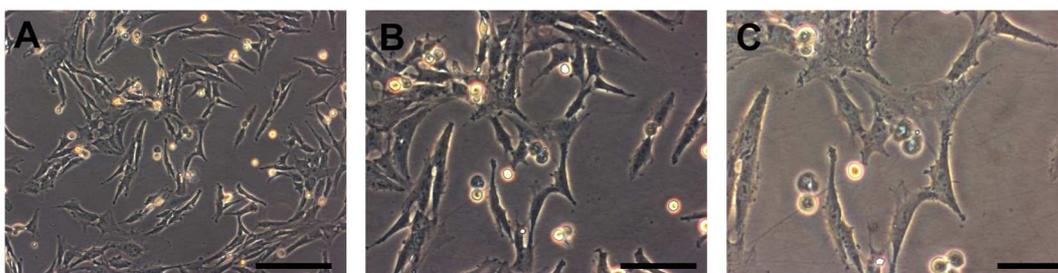


Abb. 6: pSSCs erscheinen als spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Zellen. Größenbalken: (A) 200µm, (B) 100µm, (C) 50 µm.

9. Ergebnisse

Zum Vergleich mit humanen mesenchymalen Stammzellen und als Referenz für zukünftige Untersuchungen von Stammzellen aus dem Schwein wurde der Zelldurchmesser der pSSCs mit einem CASY® Zellzähler ermittelt. Abb. 7 zeigt eine repräsentative CASY-Messung des Zelldurchmessers.

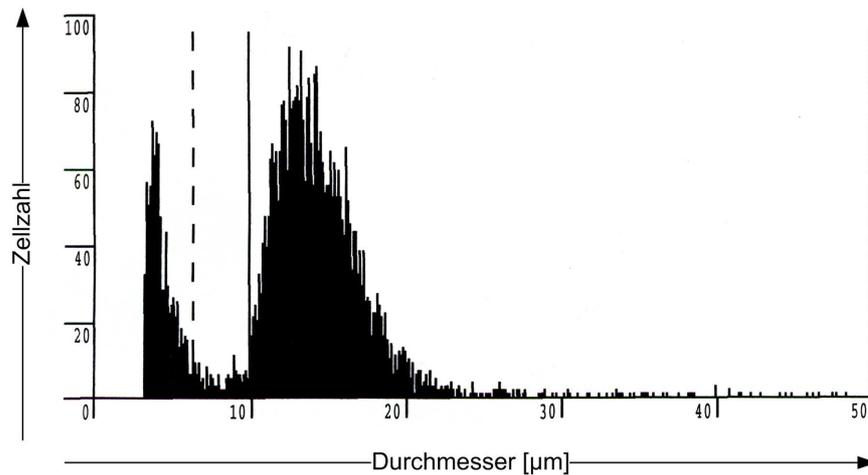


Abb. 7: Repräsentative CASY-Messung des Zelldurchmessers.

Der gemittelte Zelldurchmesser undifferenzierter pSSCs in Suspension aller sechs untersuchten Zelllinien früher Passagen (P2-P5) liegt bei $14,86 \mu\text{m}$ ($\pm 0,21 \text{ SEM}$). Spätere Passagen (P10-15) zeigen einen leichten Größenzuwachs und haben einen mittleren Durchmesser von $16,39 \mu\text{m}$ ($\pm 0,44 \text{ SEM}$).

Abb. 8 zeigt die mittlere Zellgröße der einzelnen pSSC-Linien.

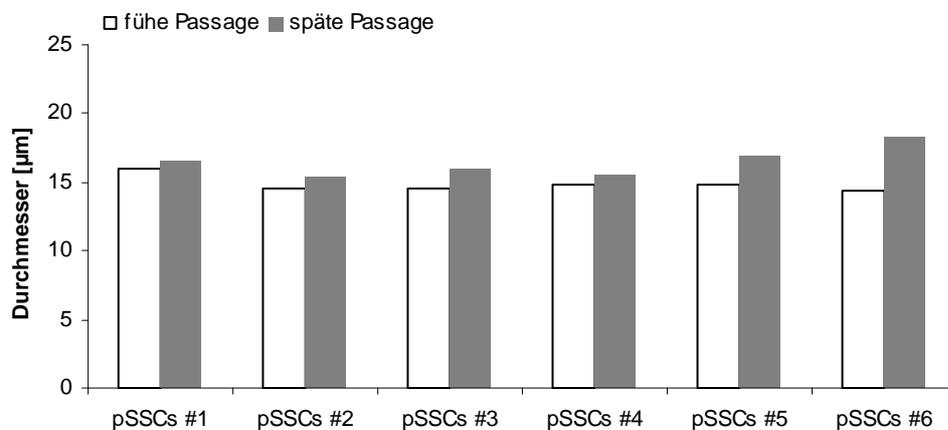


Abb. 8: Mittlerer Durchmesser undifferenzierter pSSCs in frühen (P2-P5; weiße Balken) und späten (P10-P15; graue Balken) Passagen aller sechs pSSC-Linien.

Zur Ermittlung der kumulativen Populationsverdopplung (CPD - cumulative population doubling) und der Verdopplungsdauer wurden vier pSSC-Linien (pSSC #1-4) über einen Zeitraum von 126 Tagen im Proliferationsmedium kultiviert. Hierzu wurden die pSSCs mit 3000 Zellen/cm² ausgesät und alle sieben Tage, bei 90%-iger Konfluenz passagiert. Der Versuch wurde nach besagtem Zeitraum eingestellt und die pSSCs kryokonserviert. Die pSSCs waren zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs weiterhin proliferativ.

Die Ergebnisse des Versuches zeigen, dass unter den beschriebenen Kulturbedingungen pSSCs 18 Passagen und somit 68,2 ($\pm 4,0$ SEM) Populationsverdopplungen erreichten (Abb. 9). Hieraus resultiert eine mittlere Verdopplungsdauer von 44,3 Stunden.

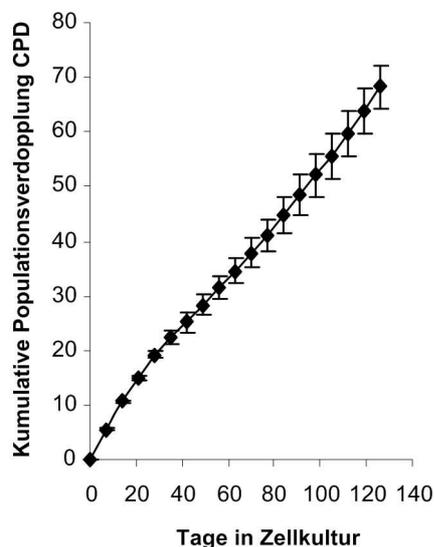


Abb. 9: Kumulative Populationsverdopplung als Funktion zur Zeit in Kultur. Diagramm zeigt die Mittelwerte (\pm SEM) von vier unabhängigen pSSC-Linien über einen Zeitraum von 126 Tagen.

9.2.2 Assay zur Ermittlung koloniebildender Einheiten

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark wurden erstmals beschrieben als koloniebildene Fibroblasten (Colony Forming Units Fibroblasts, Friedenstein *et al.*, 1970). Die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien wird seither genutzt als Indikator für das replikative Potential von Stammzellen (Bianco *et al.*, 2001; Castro-Malaspina *et al.*, 1980; Chailakhyan *et al.*, 1970; Deans & Moseley, 2000; Friedenstein *et al.*, 1987; Hoogduijn *et al.*, 2006; Kuznetsov *et al.*, 1997b; Ogawa & LaRue, 2007). Mit abnehmender Fähigkeit zur Koloniebildung wurde auch ein abnehmendes Differenzierungspotential nachgewiesen

(DiGirolamo *et al.*, 1999). Ein wesentlicher Aspekt zur Identifikation von Stammzellen ist somit unter anderem die Fähigkeit zur Bildung von Zellkolonien aus einzelnen Zellen.

Zur Überprüfung dieser Fähigkeit wurden pSSCs der Passage 5 (entspr. 22 Populationsverdopplungen) von drei unabhängigen pSSC-Linien nach DiGirolamo *et al.* mit 10 Zellen pro cm² Wachstumsfläche in Petrischalen für die Zellkultur (Ø 6 cm) ausgesät (DiGirolamo *et al.*, 1999). Abb. 10 (A-C) zeigt die Entstehung einer Zellkolonie aus einer einzelnen Zelle. Nach 11 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Trypan-Blau angefärbt (Abb. 10 D-F).

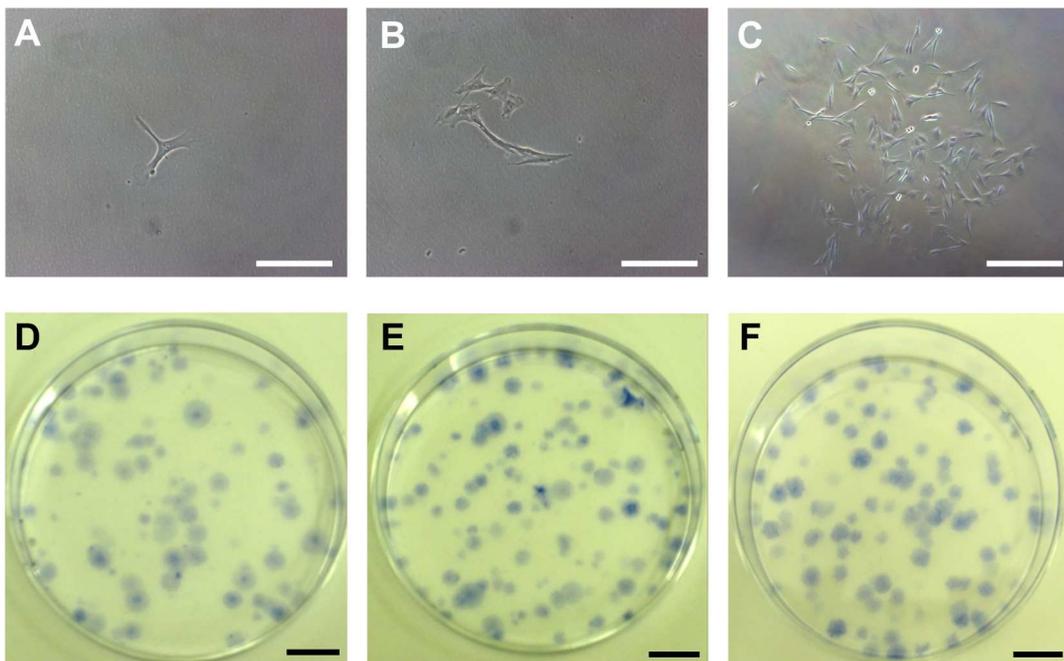


Abb. 10: pSSCs besitzen die Fähigkeit zur Koloniebildung. (A) Einzelne Zelle unmittelbar nach dem Adhären an der Wachstumsoberfläche. (B) Zellkolonie nach vier Tagen im Proliferationsmedium. (C) Zellkolonie nach 11 Tagen. (D-F) Repräsentative Bilder gefärbter Zellkolonien der drei untersuchten pSSC-Linien. Größenbalken (A, B) 100 μ m, (C) 500 μ m, (D-F) 1 cm.

Die Koloniebildungseffektivität (CFU-Effektivität) von Stammzellen ergibt sich aus dem prozentualen Anteil der Zellen, die zur Koloniebildung fähig sind, in Bezug zur Gesamtzellzahl.

Die Größe und Anzahl der entstandenen Kolonien der drei untersuchten pSSC-Linien gibt Abb. 11 (A-C) wieder.

Die CFU-Effektivität ist in Abb. 11 (D) dargestellt. Sie lag nach 11 Tagen bei der pSSC-Line #1 bei 28,86% (\pm 2,05 SEM). Dabei erreichten 38,36% (\pm 4,95 SEM) der Kolonien einen Durchmesser zwischen 1-2 mm, 31,43% (\pm 4,09 SEM) einen Durchmesser zwischen 2-3 mm, 17,93% (\pm 0,97 SEM) einen Durchmesser zwischen 3-4 mm, 8,95% (\pm 0,19 SEM) einen Durchmesser zwischen 4-5 mm und 1,23% (\pm 0,09 SEM) einen Durchmesser > 5 mm.

Die pSSC-Linie #3 erzielte eine CFU-Effektivität von 37,33% ($\pm 2,24$ SEM). Von den gebildeten Kolonien hatten 46,31% ($\pm 3,52$ SEM) einen Durchmesser zwischen 1-2 mm, 37,37% ($\pm 3,29$ SEM) einen Durchmesser zwischen 2-3 mm, 11,98% ($\pm 1,05$ SEM) einen Durchmesser zwischen 3-4 mm, 3,44% ($\pm 0,13$ SEM) einen Durchmesser zwischen 4-5 mm und 0,89% ($\pm 0,51$ SEM) einen Durchmesser > 5 mm.

Die CFU-Effektivität der pSSC-Linie #4 lag bei 37,69% ($\pm 1,43$ SEM). 28,11% ($\pm 2,74$ SEM) der Kolonien hatten einen Durchmesser zwischen 1-2 mm, 46,85% ($\pm 1,18$ SEM) einen Durchmesser zwischen 2-3 mm, 21,65% ($\pm 2,58$ SEM) einen Durchmesser zwischen 3-4 mm und 3,38% ($\pm 0,99$ SEM) einen Durchmesser zwischen 4-5 mm. Kolonien mit einem Durchmesser > 5 mm wurden von dieser Zelllinie nicht gebildet.

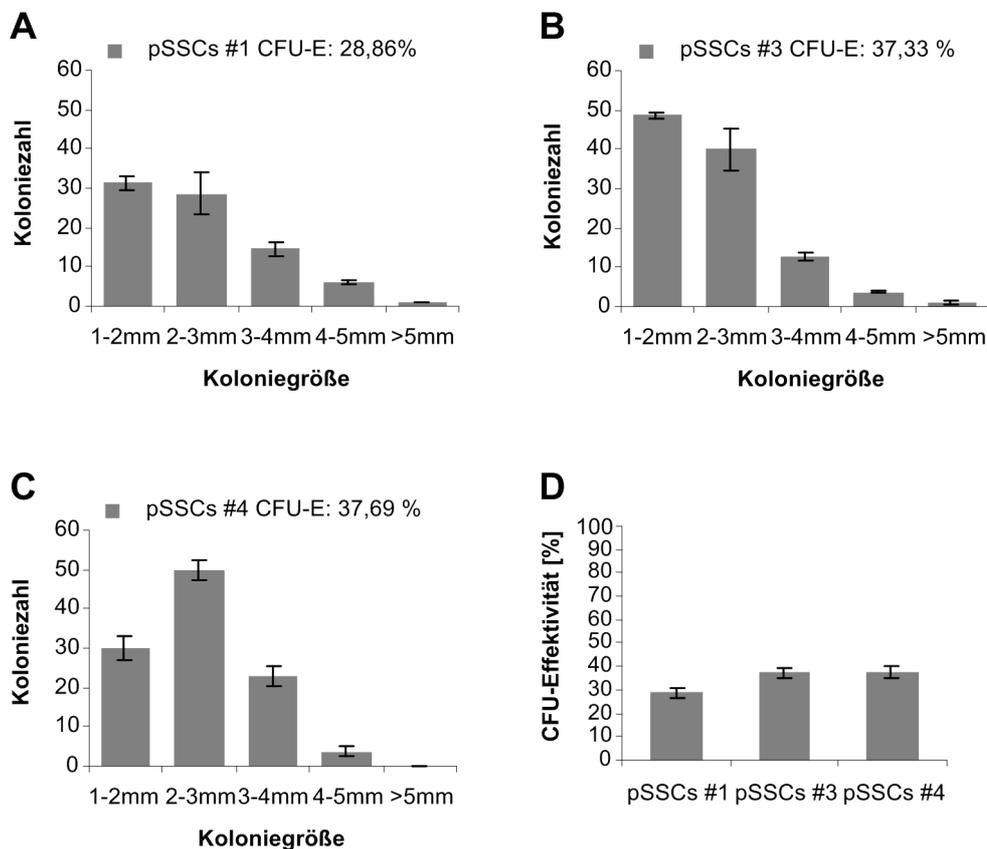


Abb. 11: (A-C) Größe und Anzahl der entstandenen Zellkolonien dreier untersuchter pSSC-Linien (#1, #3, #4) in Passage 5 (entspr. CPD 22). Daten sind dargestellt als Mittelwerte dreier Experimente \pm SEM. (D) CFU-Effektivität der drei untersuchten pSSC-Linien dargestellt als prozentualer Anteil der koloniebildenden Zellen zur Gesamtzellzahl \pm SEM.

9.2.3 Phänotypische Charakterisierung der pSSCs

9.2.3.1 Untersuchungen zur Expression von Oberflächenproteinen

Eine grundlegende phänotypische Charakterisierung von humanen adulten mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark mittels Durchflusszytometrie wurde von Pittenger *et al.* 1999 durchgeführt. Spezifische Oberflächenproteine, welche die Eigenschaften adulter Stammzellen identifizieren, konnten in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Die nachgewiesenen Expressionsmuster verschiedener Oberflächenproteine gelten seither als charakteristischer Phänotyp mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark und werden oftmals zum Vergleich mit adulten Stammzellen aus unterschiedlichem Ursprungsgewebe herangezogen (De Ugarte *et al.*, 2003; Gorjup *et al.*, 2009; Kajahn *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004b; Zhao *et al.*, 2005). Auch murine dermale Stammzellen aus dem Haarfollikel wurden bereits charakterisiert (Hoogduijn *et al.*, 2006).

Da nicht alle Antikörper zur Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen des Hausschweins zur Verfügung stehen, wurde hier zur phänotypischen Charakterisierung der pSSCs die Expression der Proteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 untersucht.

Das Tetraspanin CD9 ist ein Typ III Membranprotein mit drei transmembranen Domänen. Bisher wurde es auf undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus (Oka *et al.*, 2002) und des Menschen (Xu *et al.*, 2005), auf Keimzellen von Ratte und Maus (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004), auf murinen Stammzellen aus dem Knochenmark (Aoyama *et al.*, 1999; Baddoo *et al.*, 2003; Peister *et al.*, 2004), humanen Stammzellen aus Fettgewebe (Kim *et al.*, 2007b) und auf murinen und humanen neuronalen Vorläuferzellen (Klassen *et al.*, 2001) nachgewiesen.

CD29 (β 1-Integrin) und CD44 (Hyaluron Rezeptor) spielen eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Migration mesenchymaler Stammzellen (Ip *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2006). Die Funktion von CD90 (Thy-1) für mesenchymale Stammzellen ist bisher nicht eindeutig bekannt. CD90 wird jedoch von humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen unterschiedlicher Gewebe exprimiert (Hoogduijn *et al.*, 2006; Pittenger *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001). CD105 (Endoglin), der TFG- β -Rezeptor, ist von großer Bedeutung für Differenzierungsprozesse mesenchymaler Stammzellen (Barry *et al.*, 1999). Alle untersuchten Oberflächenproteine sind klassische Proteine mesenchymaler Stammzellen und werden generell zur Charakterisierung von adulten Stammzellen herangezogen (Baddoo *et al.*, 2003; Chunmeng & Tianmin, 2004a; De Ugarte *et al.*, 2003; Deans & Moseley, 2000; Hoogduijn *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004b; Peister *et al.*, 2004; Pittenger *et al.*, 1999; Wexler *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006).

Um mögliche Auswirkungen der Zellexpansion und mögliche Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Expression der ausgewählten Oberflächenproteine zu

untersuchen, wurden sechs pSSC-Linien früher (P2-P5) und später (P12-P15) Passagen, sowie vier ausgewählte pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) nach der Kryokonservierung bis zur ca. 90%-igen Konfluenz im Proliferationsmedium kultiviert, anschließend fixiert und mit den entsprechenden FITC (grün) bzw. R-PE (rot) konjugierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Oberflächenproteine inkubiert.

Abb. 12 zeigt repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen der Expression stammzellassoziierter Oberflächenproteine.

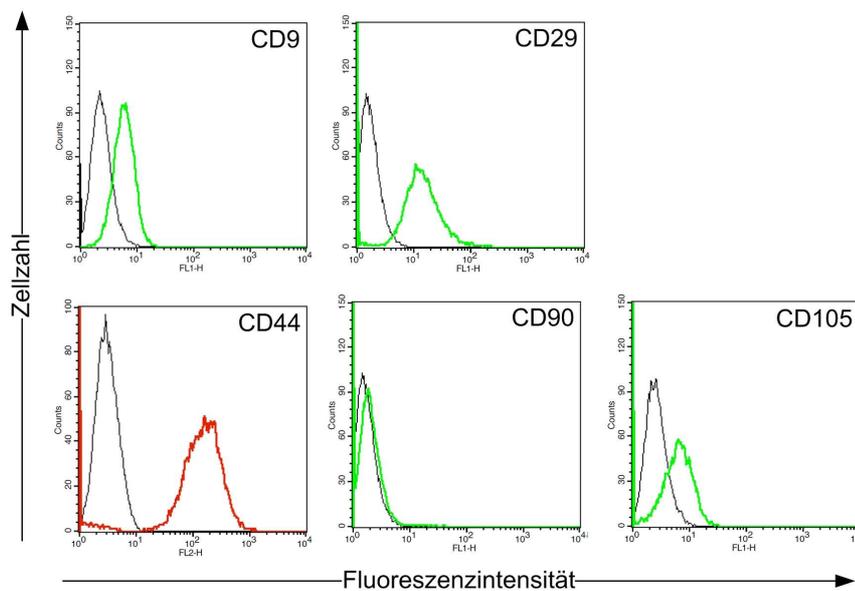


Abb. 12: Repräsentative Histogramme der gemessenen Expression stammzellassoziierter Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105. Grüne bzw. rote Kurve zeigt die gemessene Fluoreszenz des jeweiligen Proteins. Schwarze Kurve zeigt die gemessene Fluoreszenz der Isotypenkontrolle als Referenzwert.

Eine Übersicht der erhaltenen Messergebnisse hinsichtlich der Expression stammzellassoziierter Oberflächenproteine der sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) gibt Abb. 13 wieder. Hierbei zeigt sich ein recht einheitlicher Phänotyp aller sechs pSSC-Populationen mit hohen Anteilen CD29 und CD44 positiver Zellen und sehr niedrigen Anteilen CD90 positiver Zellen. Variabel erscheint die Anzahl positiver Zellen für die Proteine CD9 und CD105.

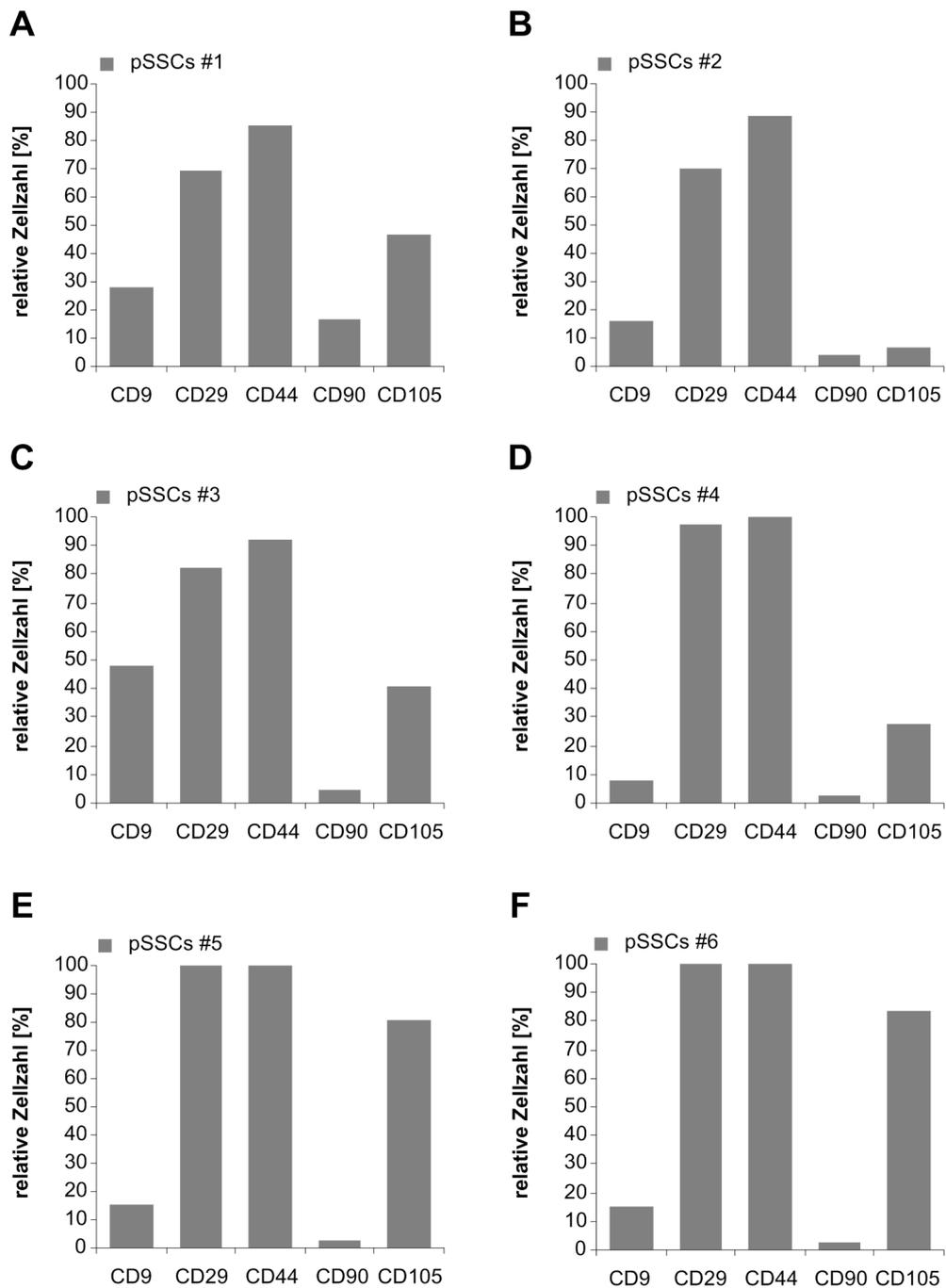


Abb. 13: (A-F) Expression der stammzelloassoziierten Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 in frühen Passagen (P2-P5) der sechs untersuchten pSSC-Linien.

Auch in späteren Passagen (P12-P15) erscheinen die untersuchten sechs pSSC-Populationen als relativ einheitlich, wobei wiederum die Anteile an CD9 und CD105 positiver Zellen bei den sechs Zelllinien stark variieren (Abb. 14 A-F)

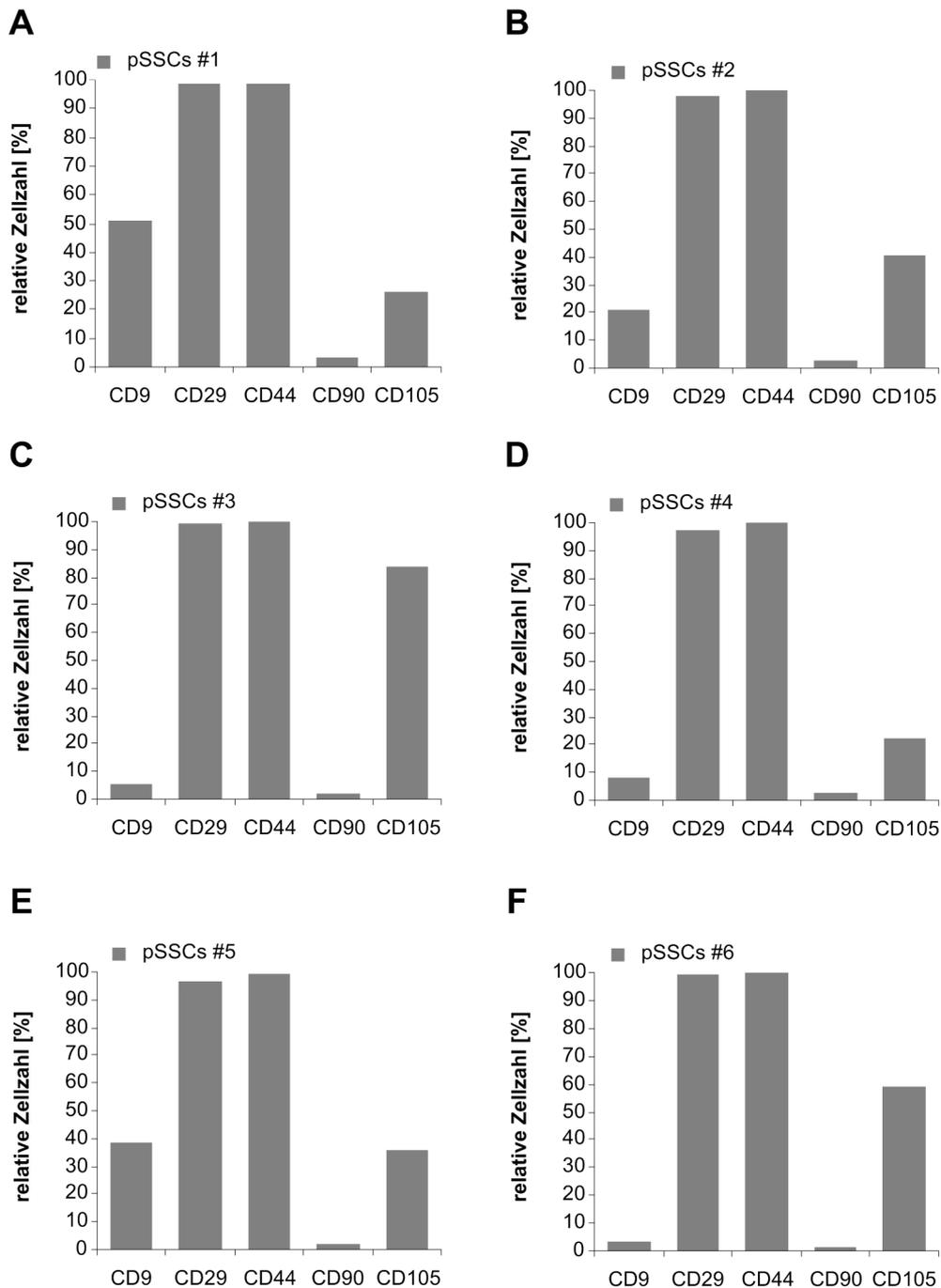


Abb. 14: (A-F) Expression der stammzellassoziierten Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 in späten Passagen (P10-P15) der sechs untersuchten pSSC-Linien.

Um mögliche Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Expression der untersuchten Oberflächenproteine zu untersuchen, wurden Zellen früher Passagen (P2-P5) der ersten vier pSSC-Linien (#1-#4) kryokonserviert. Nach 3-6 monatiger Kryokonservierung wurden die Zellen aufgetaut, erneut wie beschrieben kultiviert und die Expression der Oberflächenproteine durchflusszytometrisch ermittelt. Abb. 15 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse.

Auch nach der Kryokonservierung erscheinen die pSSC-Populationen (P2-P5) bezüglich der Expression der untersuchten Oberflächenproteine sehr einheitlich in ihrem Phänotyp. Hervorzuheben sind allerdings die sehr niedrigen Anteile CD9 positiver Zellen und die hohen Anteile CD105 positiver Zellen in allen vier untersuchten pSSC-Populationen.

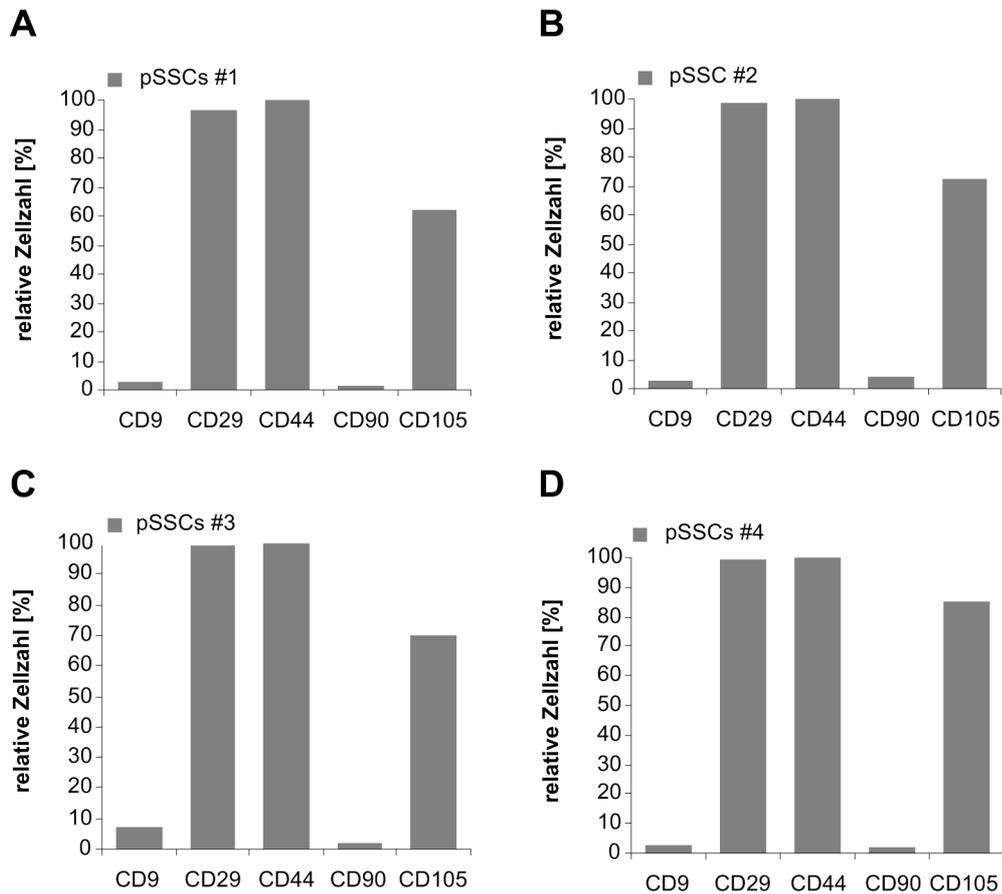


Abb. 15: (A-F) Expression der stammzellassoziierten Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 in frühen Passagen (P2-P5) von den pSSC-Linien #1-#4 nach Kryokonservierung.

9.2.3.2 Untersuchungen zur Ko-Expression von Nestin und Fibronectin

Eine früh erkannte charakteristische Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark ist die Ko-Expression der beiden intrazellulären Proteine Nestin und Fibronectin (Azizi *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 2001; Tropel *et al.*, 2004; Woodbury *et al.*, 2000). Neuere Studien zeigten, dass diese Ko-Expression ebenfalls charakteristisch für SKPs und ähnliche dermale Stammzellen sowohl aus adulter Haut von Maus (Toma *et al.*, 2001) und Mensch (Toma *et al.*, 2005), sowie aus fötaler Schweinehaut ist (Dyce *et al.*, 2006; Dyce *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009).

Um zu untersuchen, ob pSSCs, und somit potentielle Stammzellen aus adulter Schweinehaut, ebenfalls Nestin und Fibronectin exprimieren, wurden undifferenzierte pSSCs früher Passagen (P2-P5) auf Poly-D-Lysin beschichteten Chamberslides ausgesät. Die adhärenierten Zellen wurden nach 24h in Zellkultur mit Methanol:Aceton (7:3) fixiert, permeabilisiert und mit den primären Antikörpern gegen Nestin und Fibronectin inkubiert. Die Detektion der Antikörperbindung wurde nachfolgend durch die Inkubation der Zellen mit dem korrespondierenden FITC bzw. R-PE konjugierten sekundären Antikörper ermöglicht. Die immunozytochemisch gefärbten Zellen wurden mit einem DAPI enthaltenden Medium zur Färbung der Zellkerne abgedeckt.

In allen sechs untersuchten pSSC-Linien konnte die Ko-Expression von Nestin und Fibronectin nachgewiesen werden. Abb. 16 zeigt an Hand repräsentativer Bilder die nachgewiesene Ko-Expression von Nestin und Fibronectin in den pSSCs.

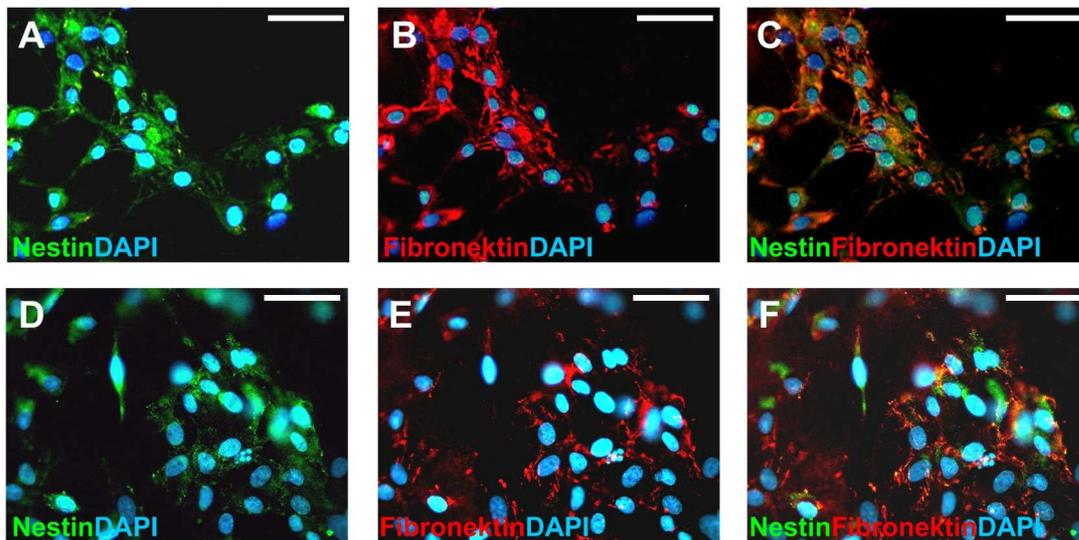


Abb. 16: Ko-Expression der intrazellulären Proteine Nestin und Fibronectin. (A, D) Grün: Nestin, Blau: Zellkerne. (B, E) Rot: Fibronectin, Blau: Zellkerne. (C, F) Überlagerung der beiden vorherigen Bilder A, B bzw. D, E zeigt die Ko-Expression von Nestin und Fibronectin in pSSCs.

9.2.3.3 Quantifizierung der Nestin-Expression

Die immunozytochemischen Ergebnisse zeigen hohe Anzahlen Nestin exprimierender Zellen (Abb. 16 A,D), deren Quantität durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Abb. 17 gibt die gemessene relative Anzahl Nestin positiver Zellen zur Gesamtzahl von jeweils 10.000 gemessenen Zellen der einzelnen pSSC-Linien wieder. Gemessen wurde die Nestinexpression von pSSCs sowohl früher Passagen (P2-P5) als auch später Passagen (P10-P15).

Hierbei wird deutlich, dass die einzelnen pSSC-Linien zwar im Anteil Nestin positiver Zellen schwanken, grundsätzlich jedoch große Subpopulationen der pSSCs (P2-P5: 41-94%, P10-P15: 41-93%) Nestin exprimieren.

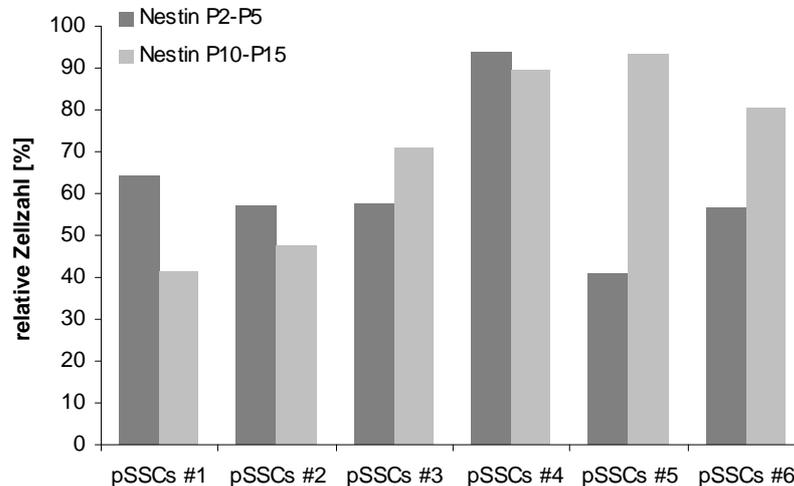


Abb. 17: Relative Anzahl Nestin exprimierender Zellen der sechs untersuchten pSSC-Linien in frühen Passagen (P2-P5, dunkel graue Balken) und späten Passagen (P10-P15, hell graue Balken).

9.2.3.4 Untersuchung zur Expression stammzell- und vorläuferassoziierter Gene

Zur Untersuchung der Expression weiterer Marker, die mit einem undifferenzierten Zustand von Stammzellen assoziiert sind, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt.

Neben Nestin existieren weitere Gene, deren Transkription und Translation zu Proteinen von großer Relevanz für die Erhaltung stammzelltypischer Eigenschaften sind.

Das Onkogen Bmi1 fungiert in manchen Geweben als Repressor von Genen, die für die Einleitung der Seneszenz und der Apoptose verantwortlich sind (Jacobs *et al.*, 1999a). Zudem gilt es als wichtiger Faktor zur Erhaltung der charakteristischen Proliferationseigenschaften adulter Stammzellen (Molofsky *et al.*, 2005; Molofsky *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004).

Der ABC-Transporter ABCG2 bzw. sein murines Homolog Bcrp1 ist verantwortlich für die Fähigkeit von adulten Stammzellen den Farbstoff 33342 (Höchst) nach vorheriger Färbung wieder auszuschleusen. Hierdurch wird es möglich, diese als ungefärbte Nebenpopulation durchflusszytometrisch zu isolieren (Kim *et al.*, 2002b; Scharenberg *et al.*, 2002; Summer *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2002).

Im Hinblick auf neuronale Stamm- und Vorläuferzellen inhibiert die Sox2 Expression die Differenzierung in neuronale Zelltypen (Graham *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2005). Ebenso

wie die beiden Transkriptionsfaktoren Stat3 (Matsuda *et al.*, 1999; Niwa, 2001; Niwa *et al.*, 1998; Raz *et al.*, 1999a; Takeda *et al.*, 1997) und Oct3/4 (Masui *et al.*, 2007; Niwa H., 2000) bzw. sein murines Homolog POU5F1 übernimmt Sox2 zudem wichtige Funktionen zur Erhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (Avilion *et al.*, 2003; Masui *et al.*, 2007; Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005; Rodda *et al.*, 2005).

Wegen ihrer Fähigkeit zur Induktion der Pluripotenz bei somatischen Zellen (sog. iPS Zellen) rückten Sox2, Stat3 und Oct3/4 kürzlich in den Vordergrund neuerer Untersuchungen (Shi *et al.*, 2008; Takahashi & Yamanaka, 2006; Wernig *et al.*, 2007).

Um mögliche Auswirkungen des Passagierens und mögliche Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Transkription der ausgewählten Gene hin zu untersuchen, wurden von Zellen früher (P2-P5) und später (P12-P15) Passagen, sowie von vier ausgewählten pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung, bei ~90% iger Konfluenz der Zellen mittels Trizol die Gesamt-RNA isoliert, DNA Reste mit DNase I verdaut und die RNA in cDNA umgeschrieben. Die Detektion der transkribierten genspezifischen RNA (cDNA) erfolgte in einem nachfolgenden PCR-Schritt.

Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genexpression von pSSCs früher Passagen (P2-P5) und später Passagen (P12-P15).

Alle sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen exprimieren die Gene Nestin, Bmi1, Bcrp1 und Stat3. Die mRNA Expression der beiden Transkriptionsfaktoren Sox2 und Oct3/4 konnte in frühen Passagen nur bei den pSSC-Linien #2, #3, #4 und #6 nachgewiesen werden. In späten Passagen wird Nestin nur noch von fünf der sechs untersuchten Linien in nachweisbarer Menge exprimiert, Bmi1, Bcrp1 und Stat3 werden jedoch weiterhin von allen Linien exprimiert. Interessanterweise tritt in späten Passagen eine heterogene Expression der beiden Gene Oct3/4 und Sox2 auf, wobei die Linien #1, #2 und #5 Oct3/4, jedoch kein Sox2, die Linien #3, #4 und #6 Sox2, aber kein Oct3/4 in nachweisbarer Menge exprimieren. Als interne PCR-Kontrolle diente das Housekeeping Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT).

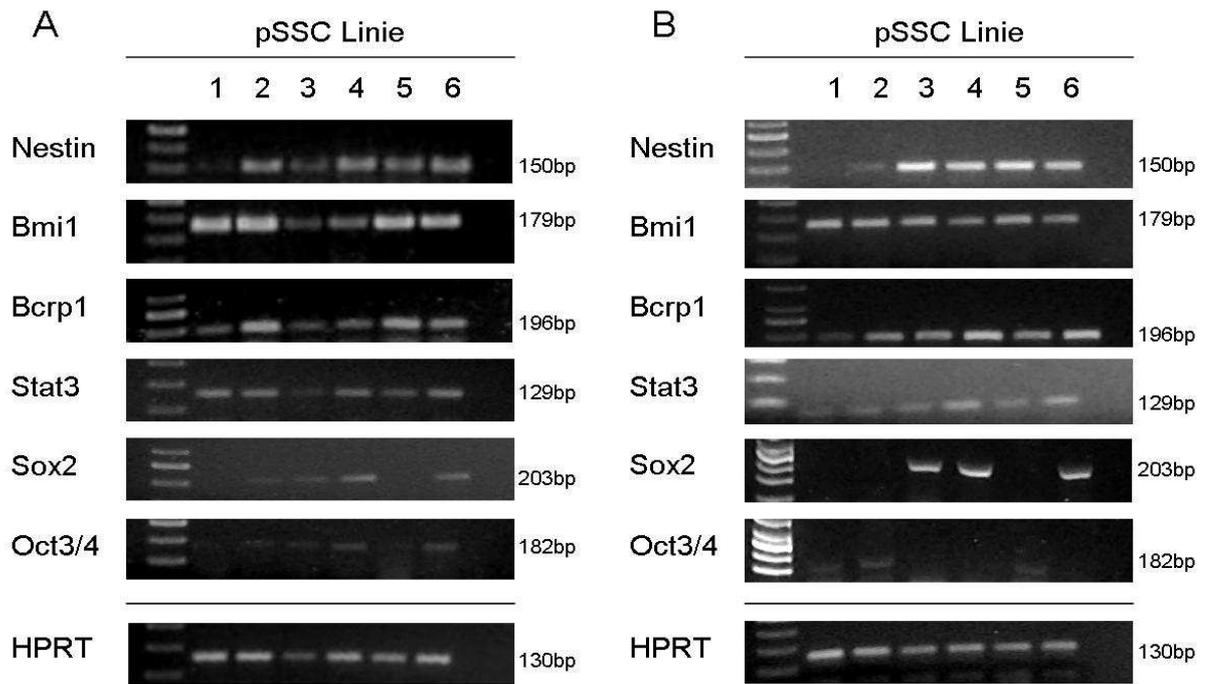


Abb. 18: (A) Ergebnis der RT-PCR-Analyse der Expression von mit Stammzeleigenschaften assoziierter Gene in pSSCs früher Passagen (P2-P5). (B) Ergebnis der RT-PCR-Analyse der Expression von mit Stammzeleigenschaften assoziierter Gene in pSSCs später Passagen (P12-P15). Interne PCR-Kontrolle: HPRT.

Die Untersuchungen der kryokonservierten pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen ergaben, dass nach erneutem Auftauen und erneuter Kultivierung der Zellen im Proliferationsmedium alle der untersuchten Gene Nestin, Bmi1, Bcrp1, Stat3, Sox2 und Oct3/4 exprimiert wurden (Abb. 19).

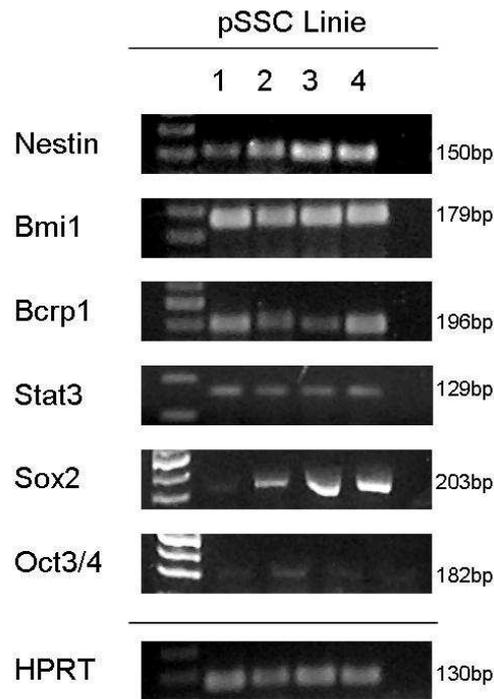


Abb. 19: Ergebnis der RT-PCR-Analyse der Expression von mit Stammzeleigenschaften assoziierter Gene in pSSCs früher Passagen nach Kryokonservierung (P2-P5). Interne PCR-Kontrolle: HPRT.

9.3 Differenzierungs-Assays

9.3.1 Neurogene Differenzierung

Fötale Stammzellen, die aus der Haut pränataler Schweine mit einer ähnlichen Methode isoliert wurden, können zu hautuntypischen Zelltypen des zentralen Nervensystems (z.B. Neuronen und Astrozyten) differenzieren (Dyce *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte dies auch für adulte Stammzellen aus der Haut der Maus (Fernandes *et al.*, 2006; Toma *et al.*, 2001) und des Menschen (Fernandes *et al.*, 2004; McKenzie *et al.*, 2006) belegt werden. Folglich sollte überprüft werden, ob die hier aus adulter Schweinehaut isolierten pSSCs ebenfalls das Potential zu einer neurogenen Differenzierung unter gleichen Kulturbedingungen besitzen.

Hierzu wurden pSSCs bis zur Konfluenz im Proliferationsmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der Differenzierung durch die Kultivierung im neuronalen Differenzierungsmedium (NDM).

Zur standardisierten Versuchsumsetzung wurden die untersuchten sechs pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) über einen definierten Zeitraum von 30 Tagen in NDM nach Dyce *et al.*, 2004 kultiviert.

9.3.1.1 Morphologische Auswirkungen der Differenzierung

Das zur neuronalen Differenzierung eingesetzte Medium enthält, im Gegensatz zum Proliferationsmedium, weder fötales Kälberserum (FCS) noch die beiden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF. Der Entzug dieser Substanzen führt zur starken Einschränkung der Proliferation der Zellen und zur Initiation der Differenzierung.

Während der dreißigtägigen Differenzierung konnte in allen sechs pSSC-Linien beobachtet werden, dass sich die Morphologie der pSSCs erheblich veränderte. Viele der Zellen migrierten in den ersten acht bis 14 Tagen zusammen und bildeten dreidimensionale Cluster (Abb. 20 A-C). Diese erinnern an neuronale Vorläuferzellen, die nach der Isolation aus dem Gehirn in serumfreier Kultur als Sphäroide (sog. Neurosphären) proliferieren (Bez *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2005).

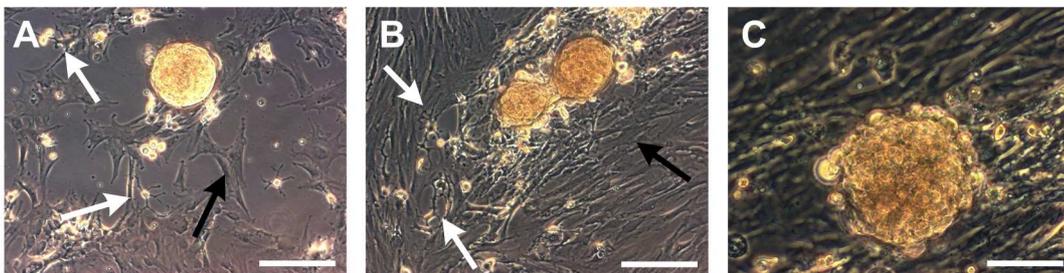


Abb. 20: Während der Kultivierung der pSSCs in NDM bilden sich dreidimensionale Strukturen. In der Peripherie dieser Cluster befinden sich Zellen mit ähnlichen Morphologien wie neuronale Zelltypen (A, B weiße Pfeile) und glatte Muskelzellen (A,B schwarze Pfeile) Größenbalken: A, B: 200 μm , C: 100 μm .

Bereits zu diesem Zeitpunkt entwickelten Subpopulationen der Zellen, meist in näherer Umgebung zu den dreidimensionalen Zellclustern, eine Morphologie, die denen von neuronalen Zelltypen ähnelte (Abb. 20 A, B weiße Pfeile). Andere zeigten eine Morphologie, die denen glatter Muskelzellen ähnlich war (Abb. 20 A, B schwarze Pfeile).

Grundsätzlich wurde die Ausprägung der Morphologie neuronaler Zelltypen und Zellen, die glatten Muskelzellen ähnelten, mit andauernder Differenzierung deutlicher (Abb. 21 B, C). Erwähnenswert ist vor allem die deutliche Zunahme der Länge der gebildeten Axone neuronaler Zellen bis zur Beendigung der induzierten Differenzierung nach 30 Tagen (Abb. 21 D-F)

Ebenso konnte bis zum Ablauf des definierten Differenzierungszeitraumes eine Zunahme der unterschiedlichen Zellmorphologien (neuronale Zelltypen und potentielle glatte Muskelzellen) festgestellt werden (Abb. 21 G-I).

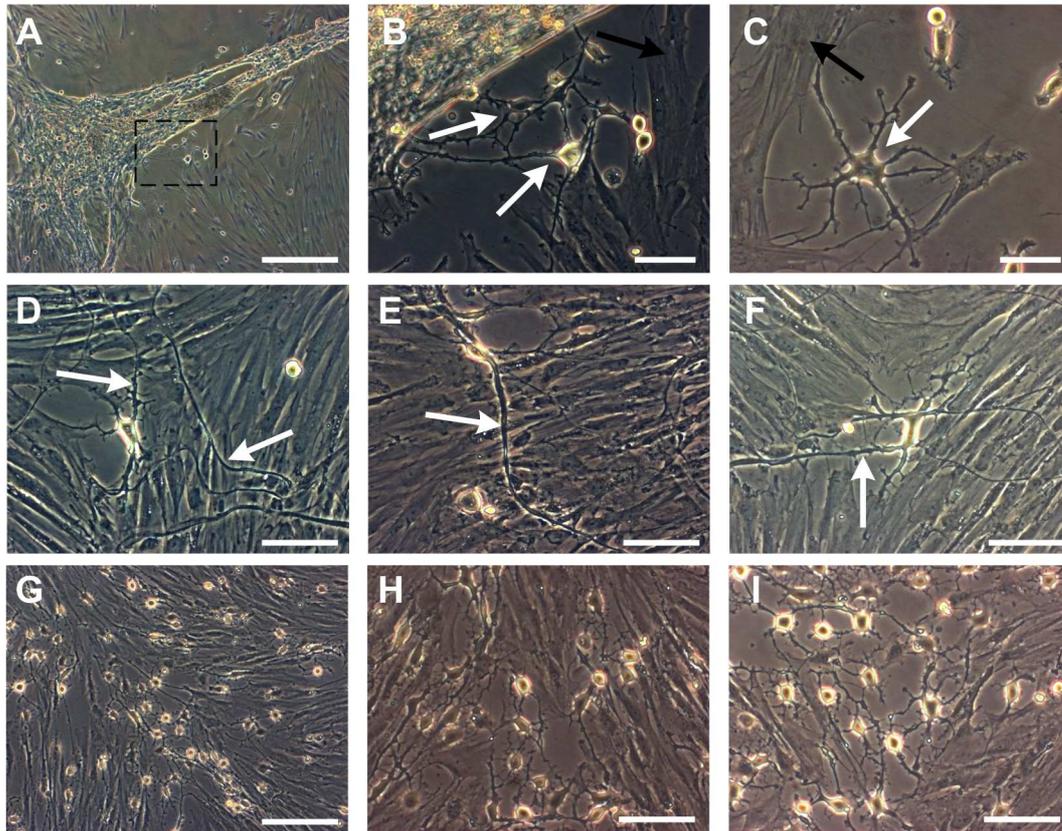


Abb. 21: Subpopulationen der in NDM differenzierten pSSCs entwickelten Morphologien, die der neuronaler Zelltypen und der glatter Muskelzellen ähneln. (A) Teil des in Abb. 27 gezeigten Netzwerkes. Größenbalken: 500 μm . (B) Vergrößerung des markierten Ausschnittes in (A). (B, C) Unterschiedliche Morphologie der differenzierten pSSCs. Weiße Pfeile markieren neuronale Zelltypen, schwarze Pfeile den muskulären Zelltyp. Größenbalken: 50 μm . (D-F) Deutliche Ausprägung langer Axone (weiße Pfeile) der neuronenenähnlichen Zellen bis zum Ende der induzierten Differenzierung. Größenbalken 100 μm . (G-I) Deutliche Zunahme der unterschiedlichen Zelltypen bis zum Ende der induzierten Differenzierung. Größenbalken: G: 200 μm , H, I: 100 μm .

9.3.1.2 Immunocytochemischer Nachweis von Proteinen neuronaler Zellen und Muskelzellen in differenzierten pSSCs.

Zur Überprüfung, ob die nach der Differenzierung morphologisch neuronalen und glatten Muskelzellen ähnelnden Zellen auch als solche betrachtet werden können, wurde mittels Immunocytochemie die Expression von Markerproteinen, die für die jeweiligen Differenzierungsrichtungen und Zelltypen charakteristisch sind, untersucht.

Die Zellen wurden zur Färbung auf Poly-D-Lysin beschichtete Chamberslides ausgebracht und nach 14-tägiger bzw. 30-tägiger Differenzierung in NDM mit Methanol:Aceton (7:3) fixiert und permeabilisiert und mit den primären Antikörpern gegen die untersuchten Proteine inkubiert. Die Detektion der Antikörperbindung wurde nachfolgend durch die Inkubation der Zellen mit dem korrespondierenden sekundären FITC konjugierten Antikörper ermöglicht.

Die immunozytochemisch gefärbten Zellen wurden mit einem DAPI enthaltenden Abdeckmedium zur Färbung der Zellkerne konserviert.

Abb. 22 gibt die Ergebnisse der immunozytochemischen Färbung der entstandenen Zellcluster nach 14-tägiger Kultivierung in NDM wieder.

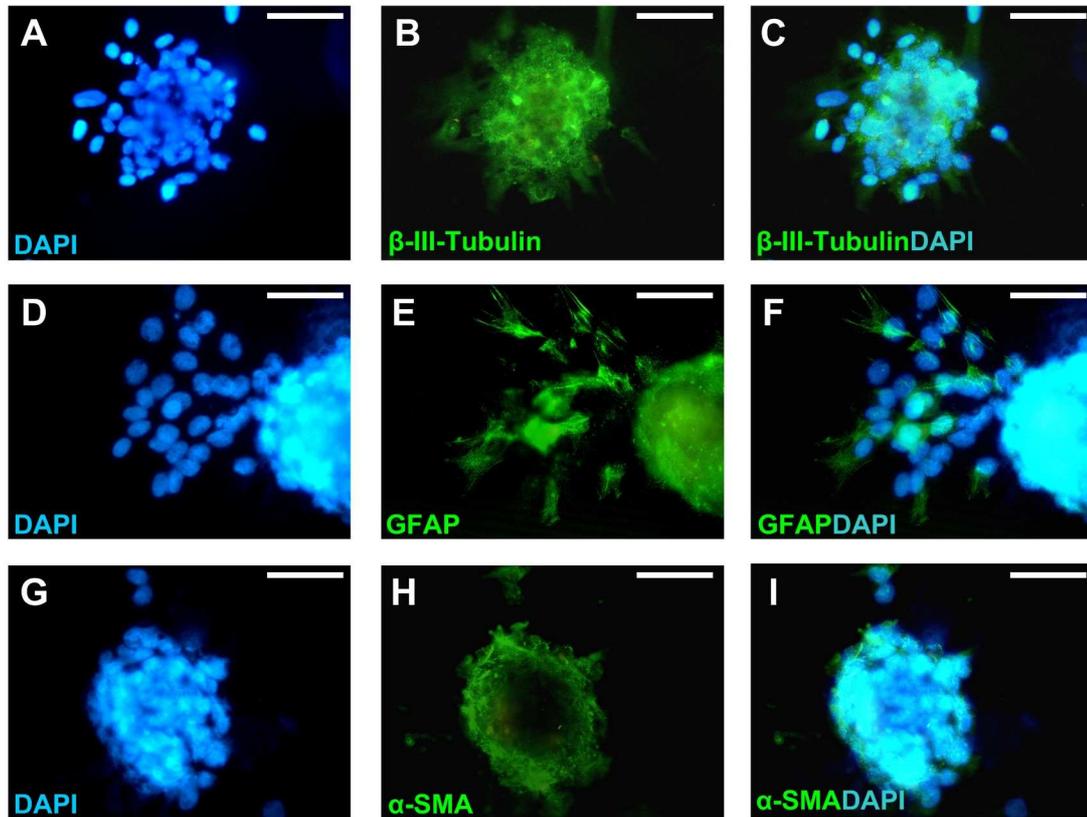


Abb. 22: Expression spezifischer intrazellulärer Proteine differenzierter Zelltypen in den entstandenen Zellclustern. (A-C): Nachweis des Proteins β -III-Tubulin. Grün: β -III-Tubulin, blau: Zellkerne. (D-F) Nachweis des Astrozyten- und Gliazellenmarkers GFAP. Grün: GFAP, blau: Zellkerne. (G-I) Nachweis von α -SMA, eines Markers für glatte Muskelzellen. Grün: α -SMA, blau: Zellkerne. Größenbalken: 50 μ m.

β -III-Tubulin, sowie das saure Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP), ein Marker für Astrozyten und Gliazellen, konnten homogen in den entstandene Zellclustern nachgewiesen werden (Abb. 22 B, E). Das alpha Actin glatter Muskelzellen (alpha Smooth Muscle Actin, α -SMA) konnte hauptsächlich in den Randbereichen der Zellcluster nachgewiesen werden (Abb. 22 H).

Die immunozytochemische Färbung der differenzierten Zellen nach 30 Tagen in NDM zeigte, dass Zellen mit typischer Morphologie neuronaler Zelltypen wie Neuronen und Astrozyten auch das für sie charakteristische Protein β -III-Tubulin exprimieren (Abb. 23).

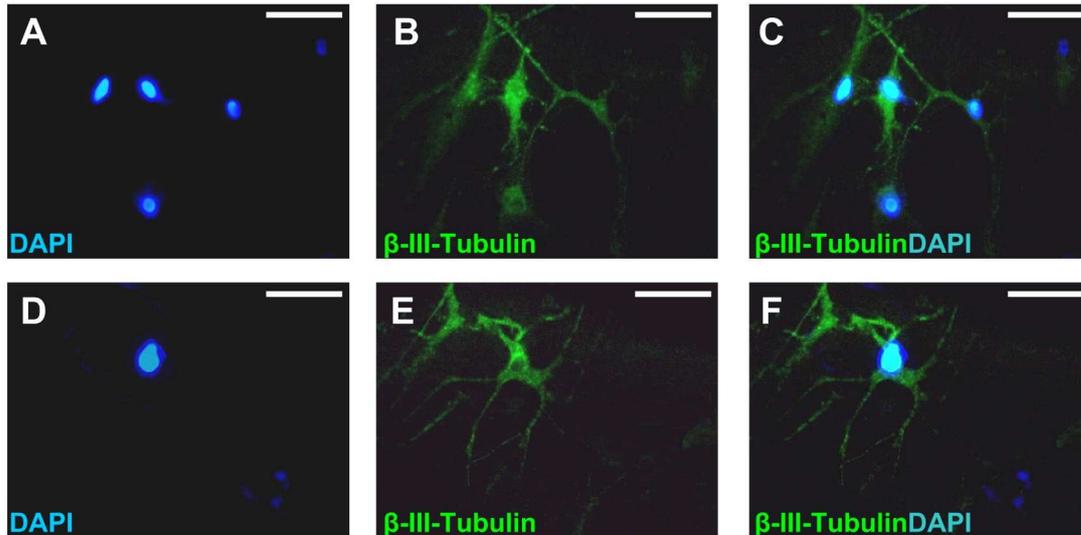


Abb. 23: Immunocytochemischer Nachweis des Neuronen spezifischen Proteins β -III-Tubulin in Subpopulationen differenzierter pSSCs mit neuronaler Morphologie. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μ m.

Zudem konnte das saure Gliafaserprotein GFAP in Subpopulationen differenzierter pSSCs immunocytochemisch nachgewiesen werden (Abb. 24).

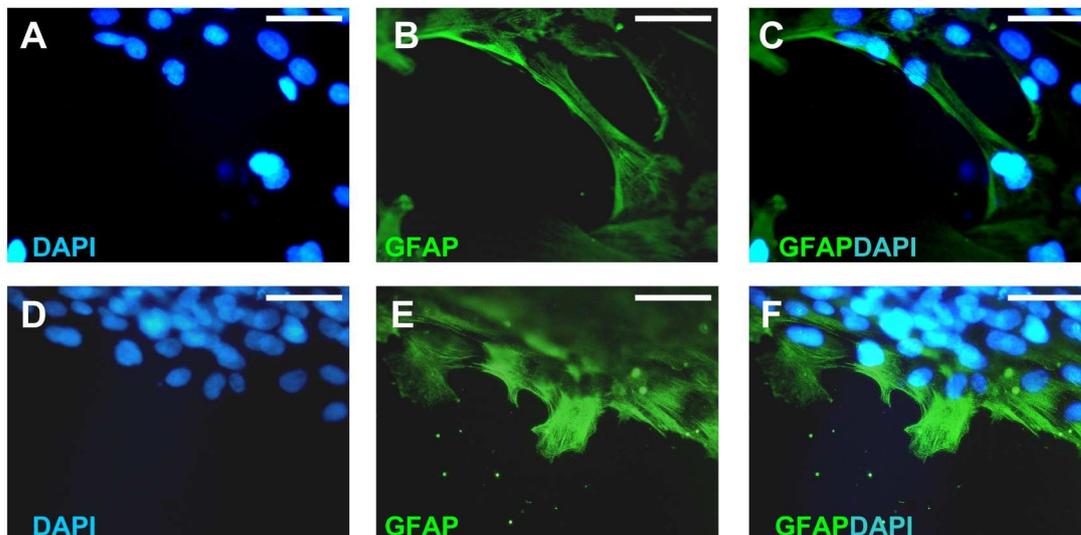


Abb. 24: Immunocytochemischer Nachweis des Astrozyten- und Gliamarkers GFAP in Subpopulationen differenzierter pSSCs. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μ m.

Eine weitere Bestätigung einer neurogenen Differenzierung ist der Nachweis des mittleren Neurofilamentes (NF-M), das ebenfalls von Subpopulationen differenzierter pSSCs exprimiert wurde (Abb. 25).

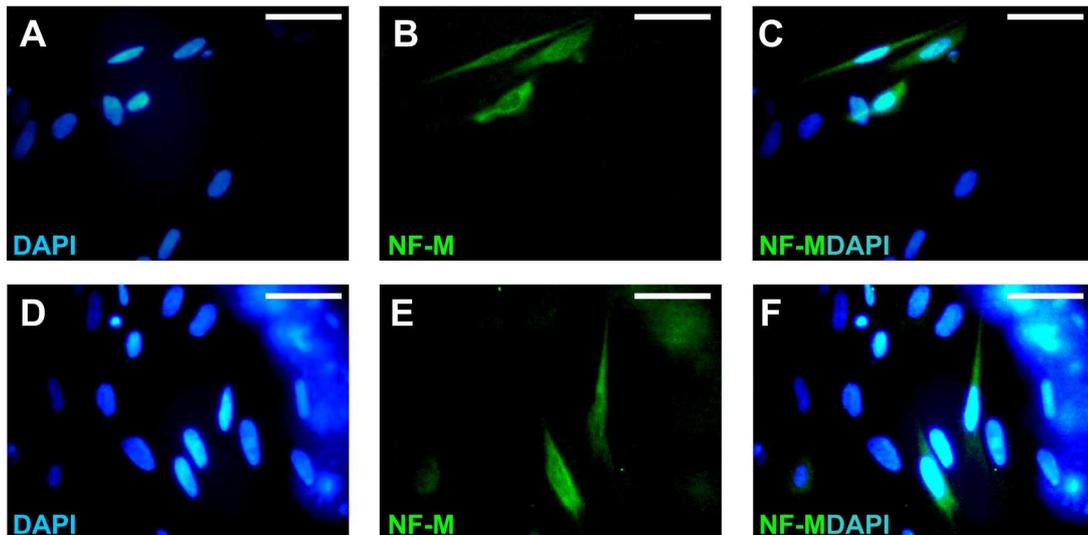


Abb. 25: Immunocytochemischer Nachweis des mittleren Neurofillaments NF-M in differenzierten pSSCs. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μm .

Neben Zellen mit neuronaler Morphologie konnte unter den neuronalen Differenzierungsbedingungen zudem mikroskopisch ein weiterer Zelltyp beobachtet werden, dessen Morphologie den glatten Muskelzellen ähnelte. Die Ergebnisse der immunocytochemischen Färbung differenzierter pSSCs gegen α -SMA, einem Markerprotein für glatte Muskelzellen ist in Abb. 26 dargestellt.

Subpopulationen der pSSCs mit typischer Morphologie glatter Muskelzellen exprimierten nach abgeschlossener Differenzierung auch das für sie charakteristische Protein α -SMA.

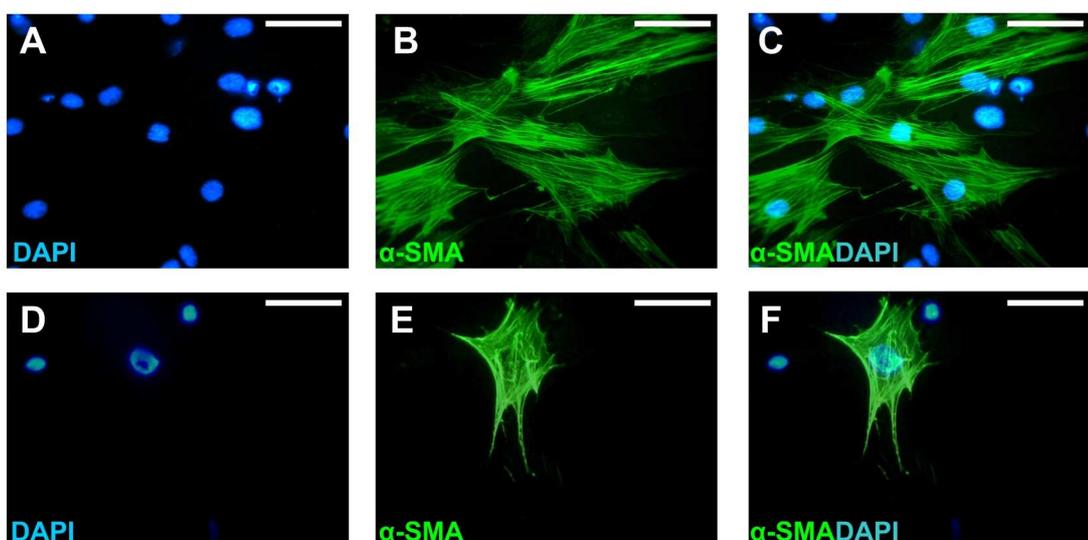


Abb. 26: Immunocytochemischer Nachweis des Proteins α -SMA in Subpopulationen differenzierter pSSCs. (A, D) Zellkerne, (B, E) Protein, (C, F) Überlagerung der Bilder A und B, bzw. D und E. Größenbalken: 50 μm .

Während des weiteren Verlaufs der Differenzierung konnte in einer pSSC-Linie (Linie #4) die Vernetzung der entstandenen dreidimensionalen Strukturen beobachtet werden (Abb. 27).

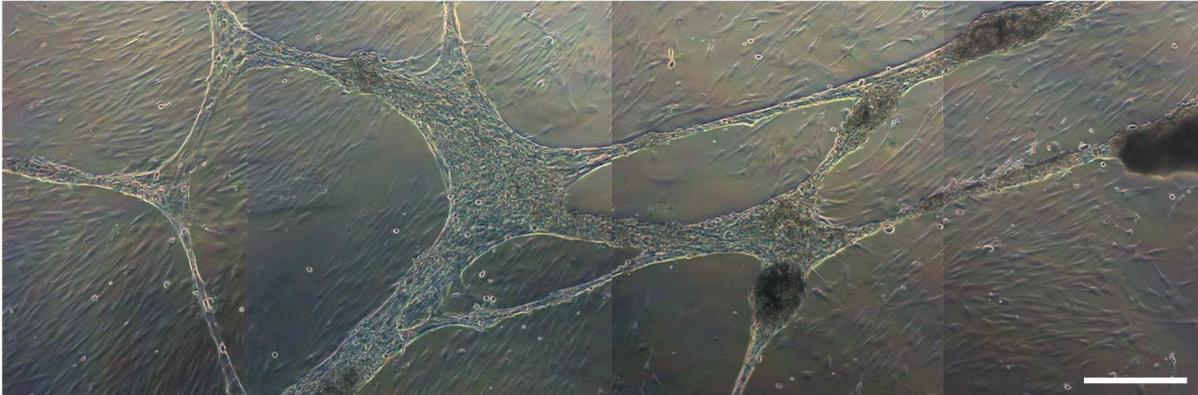


Abb. 27: Strukturiertes Zellnetzwerk nach 30 Tagen Differenzierung der pSSCs (Linie #4) in NDM. Größenbalken: 500 μm .

Deutlich zeigt sich die neuronale Vernetzung der entstandenen Stränge (Abb. 28 A-C). Der Nachweis von β -III-Tubulin in Zellen dieser Stränge identifiziert diese als mögliche Neuronenbündel (Abb. 28 D-F).

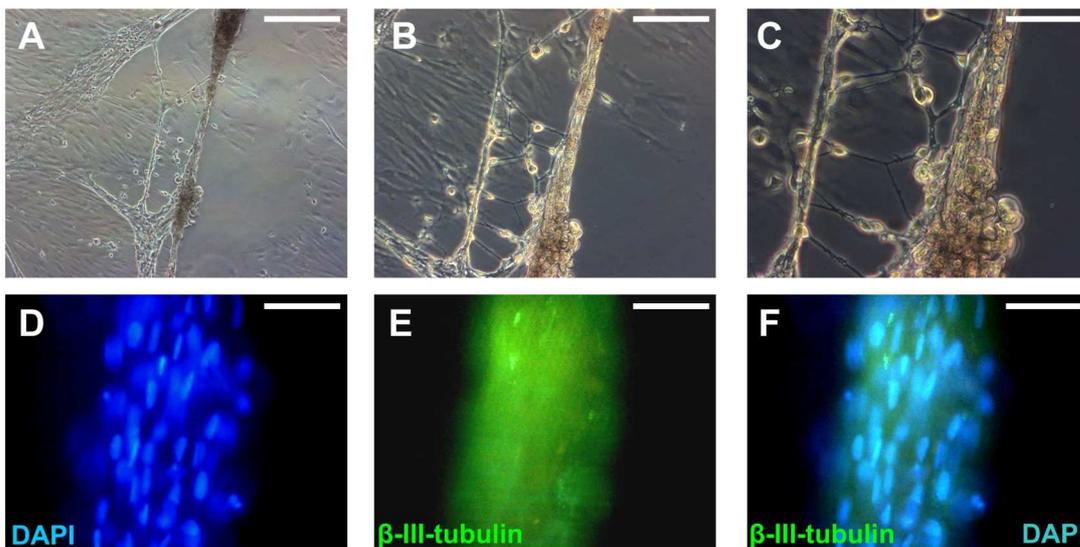


Abb. 28: (A-C) Deutliche Ausprägung eines neuronalen Netzwerkes der pSSC-Linie #4 in NDM. Größenbalken: A: 500 μm , B: 200 μm , C: 100 μm . (D-E) Immunocytochemischer Nachweis von β -III-Tubulin. (D) Zellkerne, (E) Protein, (F) Überlagerung der beiden Bilder D und E. Größenbalken: 50 μm .

9.3.1.3 Untersuchungen zur differenzierungsbedingten Regulation zelltypspezifischer Markerproteine

Die vorherigen Ergebnisse der immunozytochemischen Färbungen legten nahe, dass unter den neuronalen Differenzierungsbedingungen pSSCs in Zelltypen zweier unterschiedlicher Keimblätter (Ektoderm: neuronale Zelltypen; Mesoderm: glatte Muskelzellen) differenzieren können.

Neuronale Vorläuferzellen exprimieren das intermediäre Filamentprotein Nestin. Während der Differenzierung zu neuronalen Zelltypen wird die Expression von Nestin typischerweise herunterreguliert. Einhergehend mit dieser Abnahme der Nestinexpression ist die Hochregulation der Expression typischer Proteine ausdifferenzierter neuronaler Zellen wie dem neuronenspezifischen β -III-Tubulin und GFAP, einem Marker für Astrozyten und Gliazellen (Corti *et al.*, 2003; Dyce *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 1994; Wislet-Gendebien *et al.*, 2005).

Zur Beantwortung der Frage wie viele der pSSCs in Zellen neuronaler Linien oder der Linie glatter Muskelzellen differenzieren, wurde die Anzahl nestin-, β -III-Tubulin-, GFAP- und α -SMA-exprimierender Zellen nach 30-tägiger Differenzierung in NDM durchflusszytometrisch bestimmt.

Als Referenz dienten undifferenzierte pSSCs der gleichen Passagen, die ebenfalls auf die Expression der Proteine hin untersucht wurden.

Um zudem mögliche Auswirkungen der Expansion der Zellen und ebenfalls mögliche Auswirkungen der Kryokonservierung auf das Differenzierungspotential zu untersuchen, wurden pSSCs früher (P2-P5) und später Passagen (P10-15) aller sechs Tiere und kryokonservierte pSSCs früher Passagen (P2-P5) von vier ausgewählten Tieren untersucht.

Abb. 29 zeigt repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Expression der Proteine Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA vor der Differenzierung (undiff; obere Reihe) und nach 30-tägiger Differenzierung in NDM.

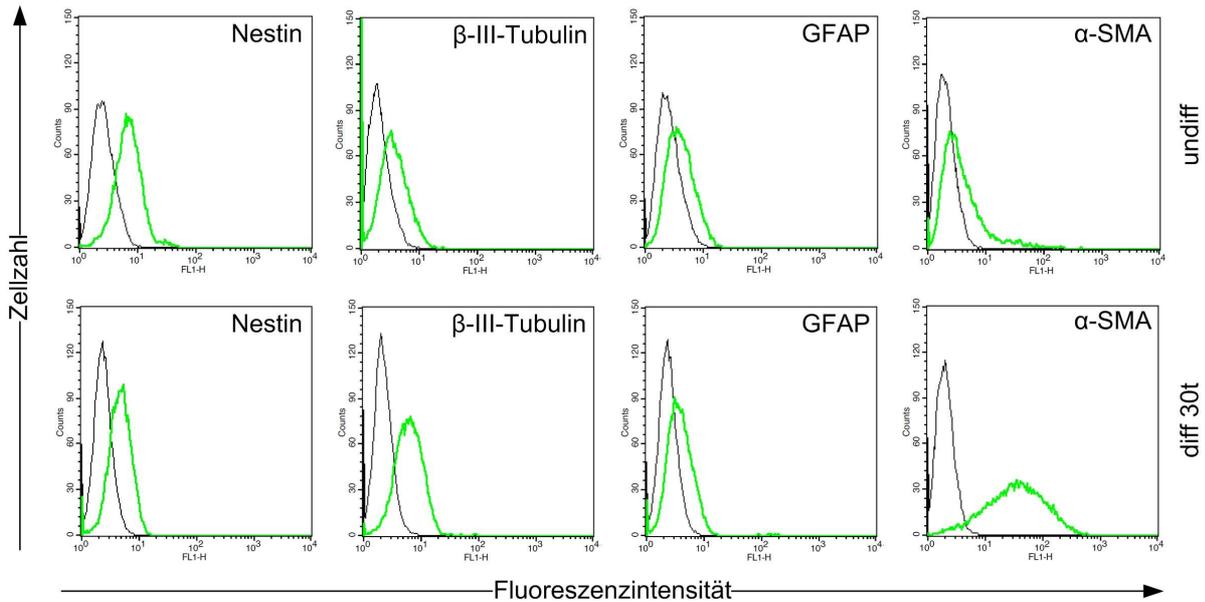


Abb. 29: Repräsentative Histogramme der gemessenen Expression der Proteine Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA vor (undiff; obere Reihe) und nach 30-tägiger Differenzierung (diff 30t; untere Reihe) unter neurogenen Kulturbedingungen. Schwarze Kurve: Isotypenkontrolle, grüne Kurve: Protein.

Wie in Abb. 30 gezeigt wird, konnte eine deutliche Abnahme Nestin positiver Zellen nach der Differenzierung in fünf der sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) nachgewiesen werden (Abb. 30, pSSC #1-4, #6). Im Mittel reduzierte sich die Anzahl Nestin positiver Zellen um 8,65% (\pm 10,89 SEM, Abb. 34).

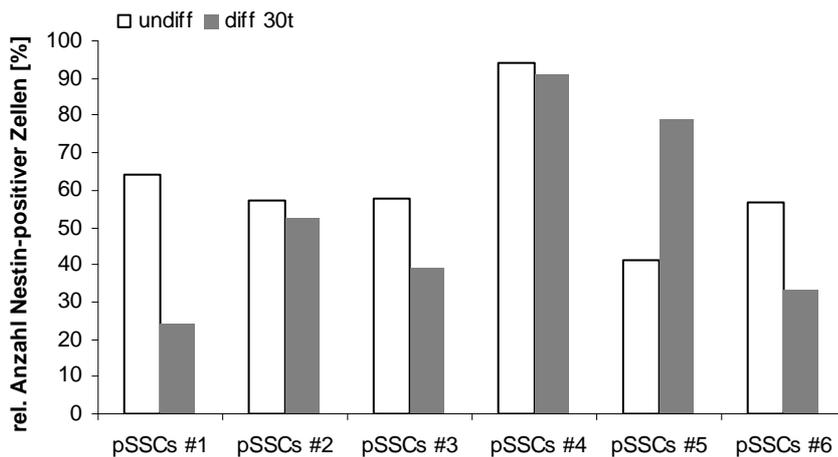


Abb. 30: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung Nestin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5).

Die Analyse der undifferenzierten pSSCs (P2-P5) bezüglich ihrer β -III-Tubulin Expression ließ erkennen, dass Subpopulationen bereits vor der Differenzierung β -III-Tubulin exprimieren. Jedoch zeigte sich eine deutliche Zunahme β -III-Tubulin positiver Zellen nach der Differenzierung in vier von sechs untersuchten Zelllinien (Abb. 31, pSSC #3-#6). Im Mittel konnte eine signifikante Erhöhung der β -III-Tubulin positiven Zellen um 19,49% (\pm 8,98 SEM, Abb. 34) nachgewiesen werden.

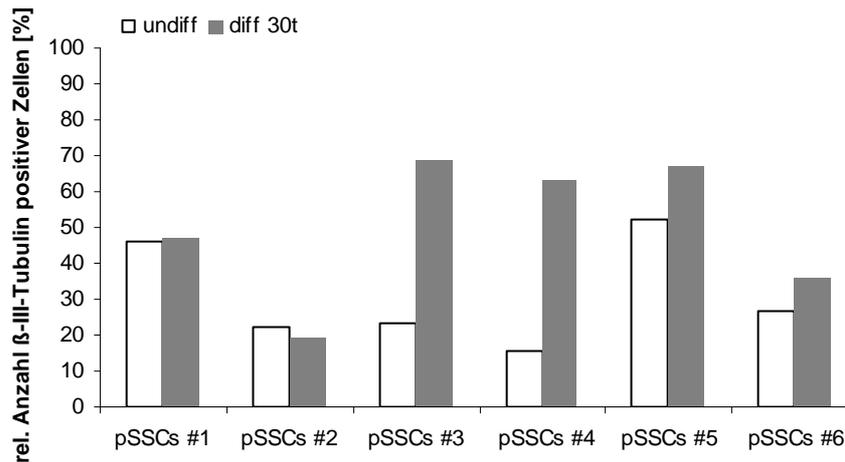


Abb. 31: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung β -III-Tubulin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5).

Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen bezüglich GFAP. Auch hier ergaben die durchflusszytometrischen Messungen, dass undifferenzierte pSSCs (P2-P5) bereits zu einem geringen Anteil GFAP exprimieren. Wie in Abb. 32 gezeigt wird, konnte auch bezüglich dieses Proteins in vier von sechs untersuchten pSSC-Linien eine deutliche Zunahme GFAP positiver Zellen durch die Differenzierung erreicht werden. Im Mittel erhöhte sich die Anzahl 7,59% (\pm 5,04, Abb. 34) GFAP positiver Zellen.

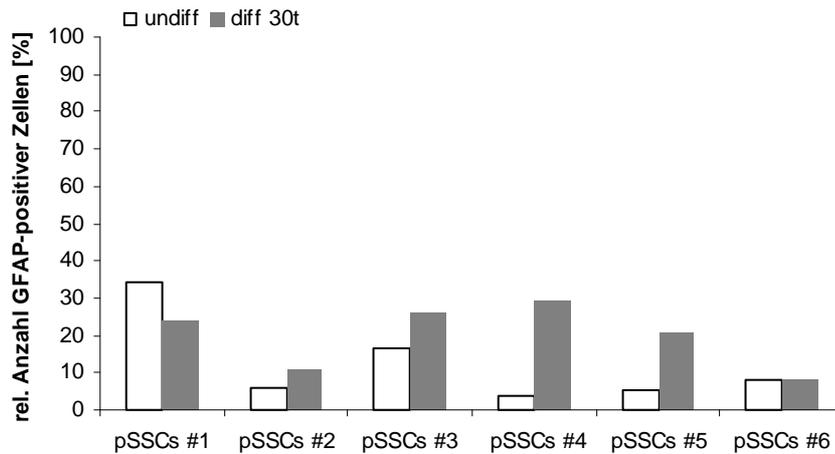


Abb. 32: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung GFAP positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5).

Auch bezüglich der Expression von α -SMA konnten bereits positive Subpopulationen in den sechs untersuchten pSSC-Linien (P2-P5) vor der Differenzierung nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist jedoch die enorme Zunahme α -SMA positiver Zellen in allen untersuchten pSSC-Linien nach abgeschlossener Differenzierung (Abb. 33). Im Mittel stieg die Anzahl α -SMA positiver Zellen hoch signifikant um 58,7% ($\pm 10,06$ SEM, Abb. 34).

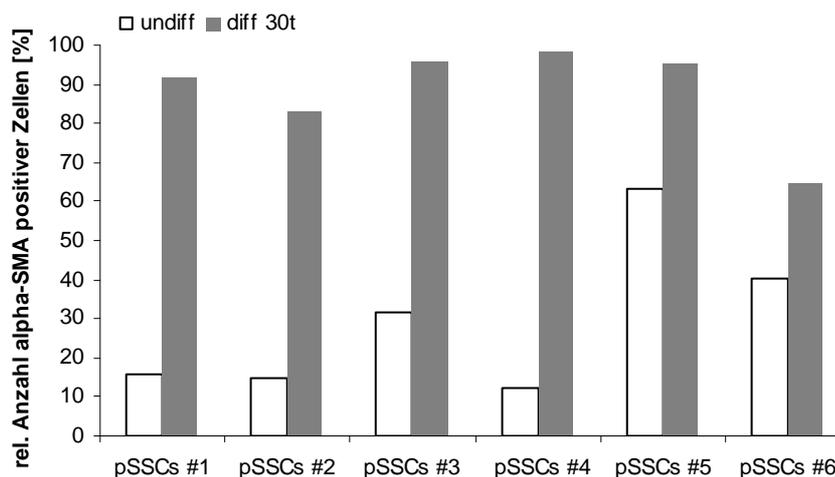


Abb. 33: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung α -SMA positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs früher Passagen (P2-P5).

Die oben dargestellten Ergebnisse für die einzelnen Proteine als Mittelwerte aller sechs untersuchten pSSC-Linien (\pm SEM) sind in Abb. 34 zusammengefasst.

9. Ergebnisse

Im Mittel wurde eine generelle Abnahme Nestin positiver Zellen während der Differenzierung, die einhergeht mit einer signifikanten Zunahme β -III-Tubulin positiver Zellen, einer geringen Zunahme GFAP positiver Zellen und einer hoch signifikanten Zunahme α -SMA positiver Zellen nachgewiesen.

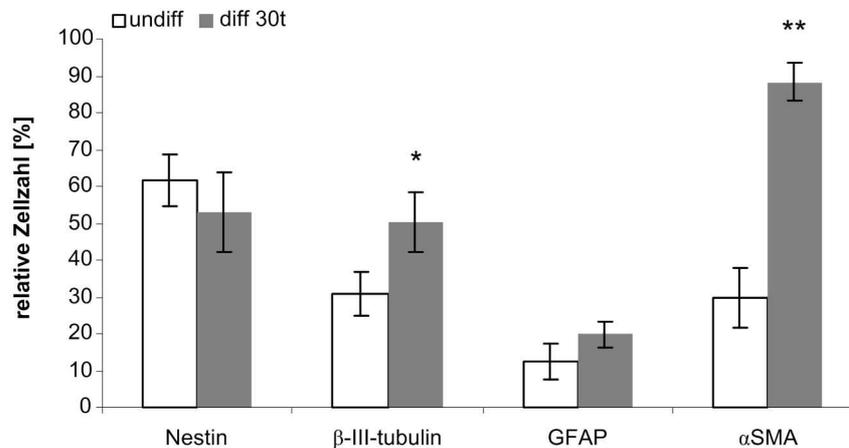


Abb. 34: Mittelwerte der relativen Anzahl Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA positiver Zellen aller sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5) vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung \pm SEM. Sterne verweisen auf die statistische Signifikanz der Mittelwerte des relativen Anteils positiver Zellen. $P \leq 0.05$ (*) und $P \leq 0.005$ (**).

Die Untersuchungen der differenzierungsbedingten Nestinregulation von pSSCs später Passagen (P12-P15) ergaben ebenfalls eine deutliche Abnahme Nestin positiver Zellen in fünf der sechs untersuchten pSSC-Linien (Linie #2-#6) nach beendeter Differenzierung. pSSC-Linie #1 zeigte keine Abnahme Nestin positiver Zellen (Abb. 35). Im Mittel reduzierte sich die Anzahl Nestin positiver Zellen signifikant um 17,14% (\pm 5,91 SEM, Abb. 39).

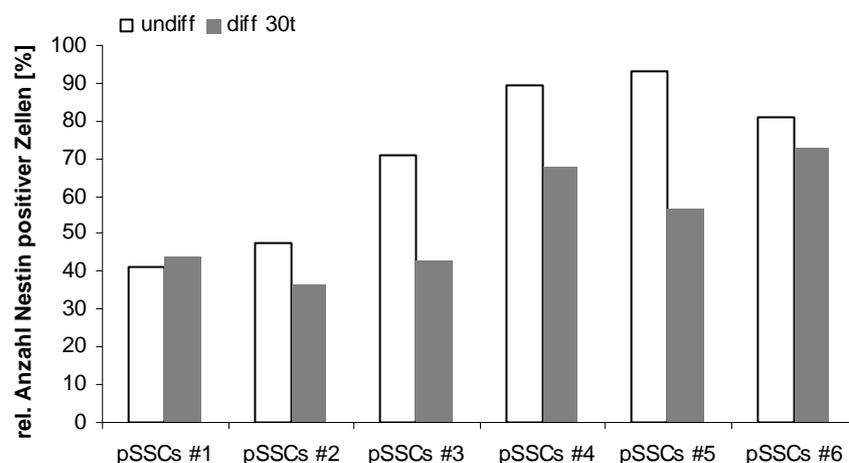


Abb. 35: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung Nestin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15).

Hinsichtlich der Regulation von β -III-Tubulin zeigten auch pSSCs später Passagen eine deutliche Zunahme an positiven Zellen aller sechs untersuchten Linien nach der induzierten Differenzierung (Abb. 36). Im Mittel erhöhte sich die Anzahl positiver Zellen hoch signifikant um 18,74% (\pm 3,33 SEM, Abb. 39). Erwähnenswert ist die festgestellte bereits sehr hohe Anzahl β -III-Tubulin positiver Zellen der Linien #3-#6 vor induzierter Differenzierung (Abb. 36).

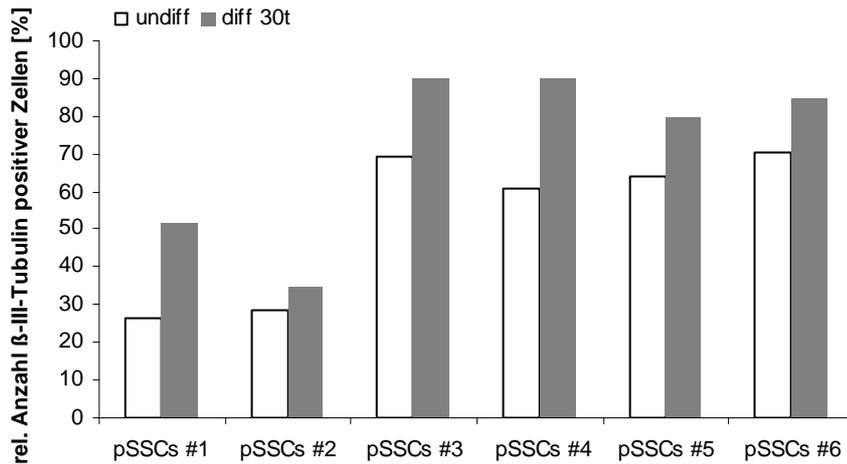


Abb. 36: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung β -III-Tubulin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15).

Die Anzahl GFAP exprimierender Zellen später Passagen erhöhte sich in nur einer pSSC-Linie deutlich (Abb. 37, pSSC #4). Im Mittel erhöhte sich die Anzahl GFAP positiver Zellen unsignifikant um 0,97% (\pm 6,8 SEM, Abb. 39).

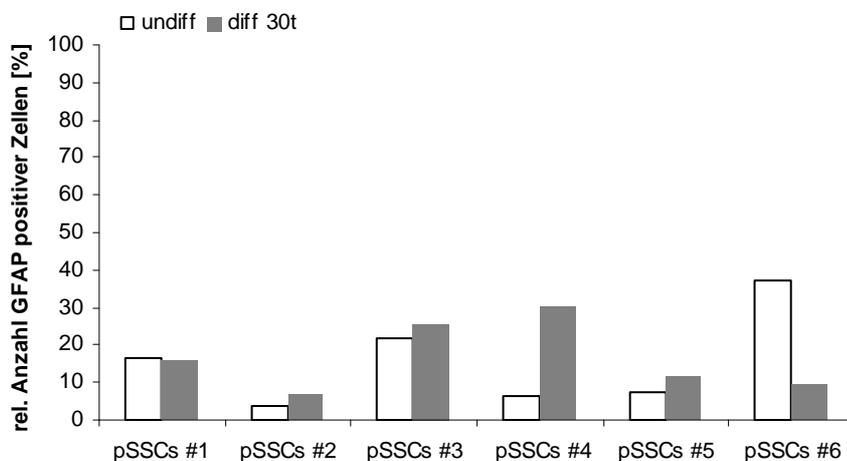


Abb. 37: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung GFAP positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs später Passagen (P12-P15).

Die Messungen der α -SMA Expression ergaben wiederum, ähnlich wie in pSSC-Linien früherer Passagen, eine deutliche Zunahme α -SMA positiver Zellen nach beendeter Differenzierung (Abb. 38). Im Mittel stieg der Anteil positiver Zellen hochsignifikant um $44,43 (\pm 8,28 \text{ SEM})$, (Abb. 39). Auch hier ist im Vergleich zu pSSC-Linien früherer Passagen die deutlich höhere Anzahl α -SMA positiver Zellen vor der induzierten Differenzierung erwähnenswert.

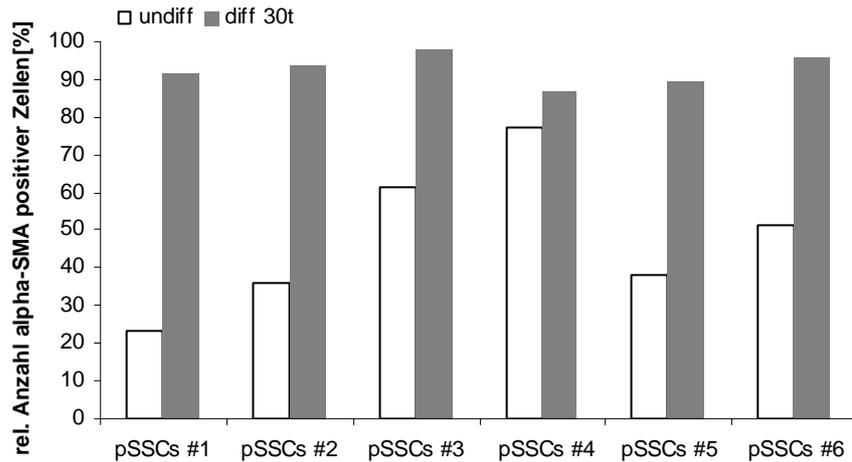


Abb. 38: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung α -SMA positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung von pSSCs späterer Passagen (P12-P15).

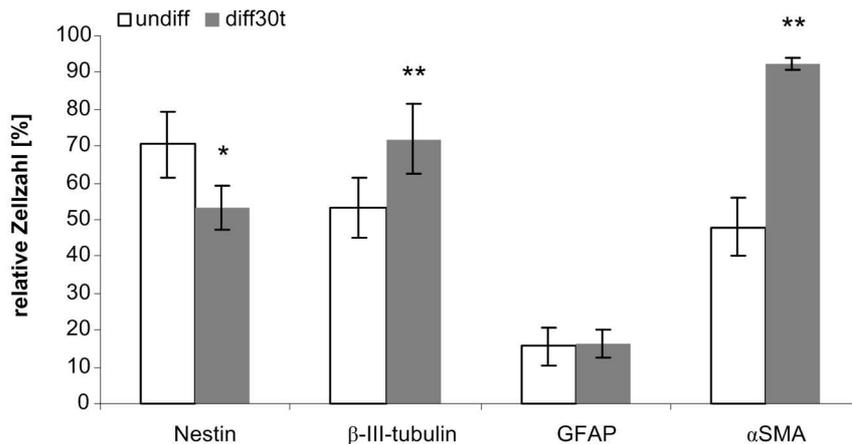


Abb. 39: Mittelwerte der relativen Anzahl Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA positiver Zellen aller sechs untersuchten pSSC-Linien späterer Passagen (P12-P15) vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung \pm SEM. Sterne verweisen auf die statistische Signifikanz der Mittelwerte des relativen Anteils positiver Zellen. $P \leq 0.05$ (*) und $P \leq 0.005$ (**).

Von den vier ausgewählten kryokonservierten pSSC-Linien konnte bei nur zweien eine deutliche Reduktion Nestin positiver Zellen nach 30-tägiger Differenzierung in NDM nachgewiesen werden (Abb. 40, pSSC #1, pSSC #4). Die Kultivierung in NDM verursacht bei den beiden übrigen pSSC-Linien eine leichte Zunahme Nestin positiver Zellen (Abb. 40, pSSC #2, pSSC #3). Die Mittelung der Werte aller vier Tiere ergab jedoch eine nicht signifikante Abnahme Nestin positiver Zellen um 10,99% ($\pm 11,79$ SEM, Abb. 44)

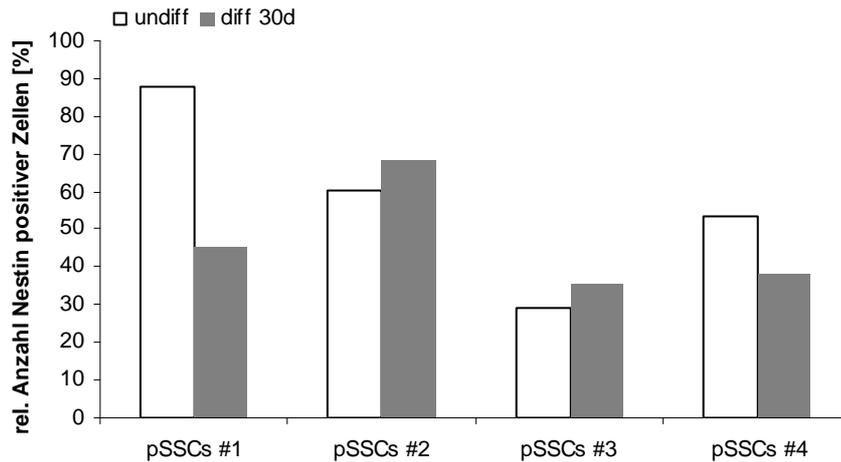


Abb. 40: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung Nestin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung.

Wie Abb. 41 zeigt, konnte auch hinsichtlich der Anzahl β -III-Tubulin positiver Zellen eine Zunahme nur für zwei der vier untersuchten kryokonservierten pSSC-Linien nachgewiesen werden (pSSC #2, pSSC #4). Die übrigen beiden Linien zeigten einen Rückgang der Anzahl β -III-Tubulin positiver Zellen nach beendeter Differenzierung (pSSC #1, pSSC #3). Die Mittelung der Werte ergab eine nicht signifikante Zunahme β -III-Tubulin positiver Zellen um 6,19% ($\pm 10,77$ SEM, Abb. 44).

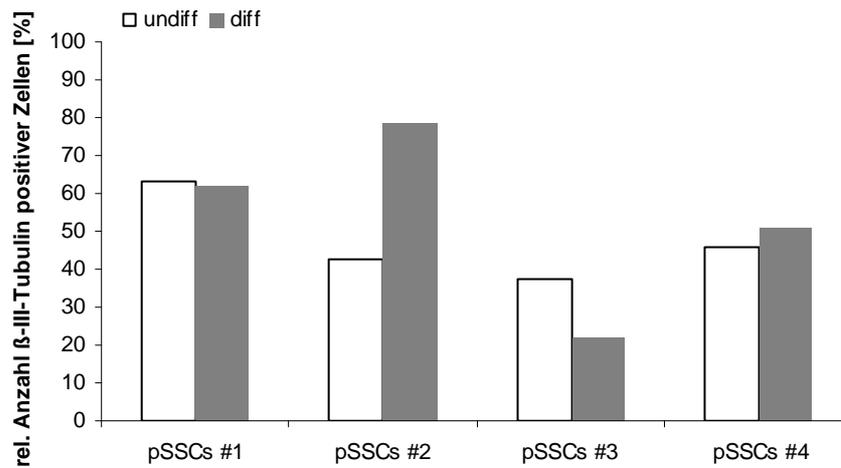


Abb. 41: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung β -III-Tubulin positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung.

Von den vier untersuchten pSSC-Linien, die nach der Kryokonservierung für 30 Tage in NDM kultiviert wurden, konnte nur für eine Linie (Abb. 42 pSSC #3) eine definitive Zunahme GFAP positiver Zellen nachgewiesen werden. Nach beendeter Differenzierung zeigten zwei Linien eine geringere Anzahl GFAP positiver Zellen (Abb. 42, pSSC #1, pSSC #2). Betrachtet man den Mittelwert der GFAP positiven Zellen aller vier Linien, so zeigt dieser eine nichtsignifikante Reduktion positiver Zellen nach der Differenzierung um 3,19% (\pm 8,07 SEM, Abb. 44).

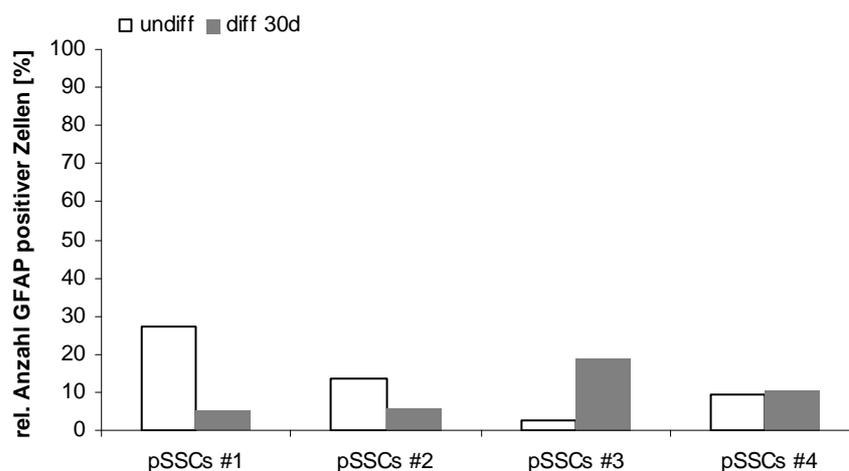


Abb. 42: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung GFAP positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung.

Einzig die Anzahl α -SMA positiver Zellen stieg in allen vier untersuchten kryokonservierten pSSC-Linien nach 30-tägiger Differenzierung in NDM an (Abb. 43). Im Mittel nahm die Zahl α -SMA positiver Zellen um 22,13% ($\pm 9,8$ SEM, Abb. 44) zu. Trotz Anstieg in allen vier untersuchten Linien erreichte die Zunahme α -SMA positiver Zellen mit einem Wert von $p=0,055$ keine Signifikanz.

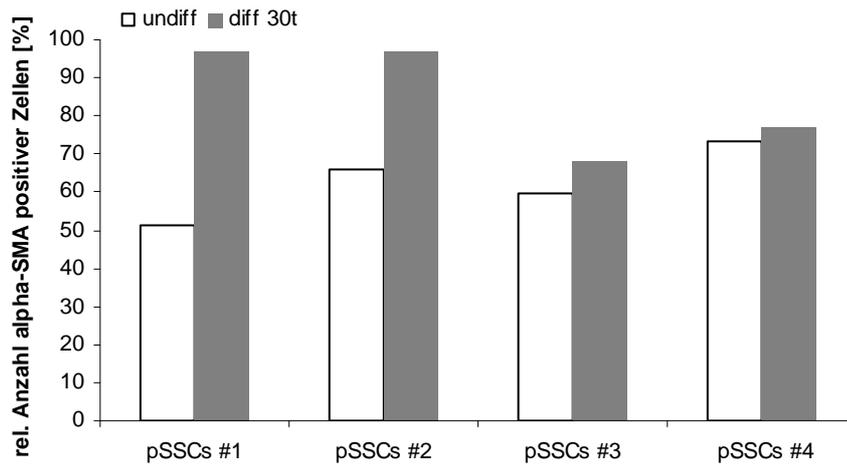


Abb. 43: Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Quantifizierung α -SMA positiver Zellen vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung der pSSC-Linien #1-#4 früher Passagen (P2-P5) nach Kryokonservierung.

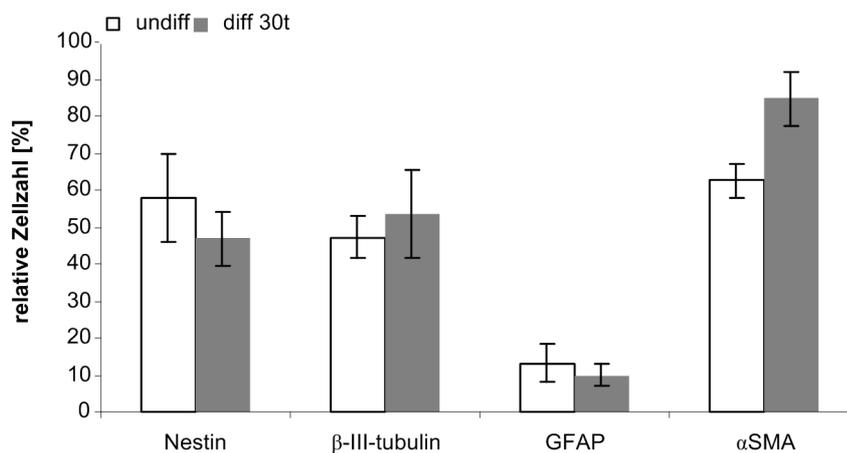


Abb. 44: Mittelwerte der relativen Anzahl Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA positiver Zellen der vier untersuchten kryokonservierten pSSC-Linien (#1-#4) früher Passagen (P12-P15) vor (weiße Balken) und nach (graue Balken) neurogener Differenzierung \pm SEM. Sterne verweisen auf die statistische Signifikanz der Mittelwerte des relativen Anteils positiver Zellen. $P \leq 0.05$ (*) und $P \leq 0.005$ (**).

9.3.2 Adipogene Differenzierung

Um festzustellen, ob pSSCs neben glatten Muskelzellen auch zu einem anderen Zelltyp mesenchymalen Ursprungs differenzieren können, wurde das adipogene Differenzierungspotential des pSSCs untersucht.

Hierzu wurden Zellen dreier ausgewählter pSSC-Linien (pSSC #3, #5, #6) bis zur ca. 90%-igen Konfluenz im Proliferationsmedium kultiviert. Darauf folgend wurde die Differenzierung ausgelöst durch ein adipogenes Differenzierungsmedium (ADM) nach Pittenger *et al.* 1999. Dieses enthält neben fötalem Kälberserum und Antibiotika Insulin, Dexamethason, Indometacin und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) als differenzierungsinduzierende Substanzen und wurde zur adipogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark etabliert.

Da bekannt ist, dass Stammzellen aus fötaler Schweinehaut (SKPs) in Anwesenheit von FCS eine adipogene Differenzierung einleiten (Dyce *et al.*, 2004), wurden die pSSCs zur Kontrolle in einem Medium mit 10% FCS, jedoch ohne die induzierenden Substanzen Insulin, Dexamethason, Indometacin und IBMX kultiviert.

Hinsichtlich ihres adipogenen Potentials verhielten sich die drei untersuchten Linien unterschiedlich. Während sich in der pSSC-Linie #5 bereits nach 8 Tagen in ADM erste Lipidtropfen im Zytoplasma einzelner Zellen bildeten, konnte bei den übrigen beiden untersuchten Linien (#3, #6) eine einsetzende adipogene Differenzierung erst nach 18-22 Tagen festgestellt werden.

Nach 30 Tagen wurden die differenzierten Zellen mit Formalin (10%) fixiert. Die nachfolgende Oil Red O Färbung erbrachte durch eine positive Rotfärbung intrazellulärer Lipidtropfen den Nachweis einer adipogenen Differenzierung der pSSC-Linien, die in ADM kultiviert wurden (Abb. 45 A-C). pSSCs im Kontrollmedium zeigten nahezu keine Oil Red O Inkorporation (Abb. 45 D-F).

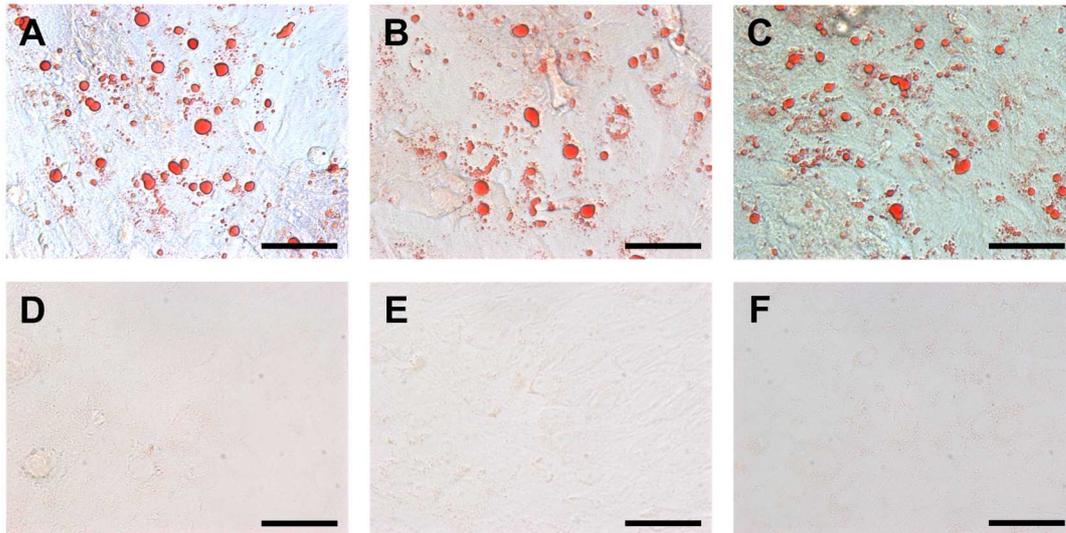


Abb. 45: (A-C) Positive Oil Red O Färbung intrazellulärer Lipidtropfen in pSSCs nach 30 Tagen induzierter adipogener Differenzierung. (D-F) pSSCs im Kontrollmedium zeigen nahezu keine Oil Red O Inkorporation. Größenbalken: 50 μ m.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Adipozyten ist die Synthese und Abgabe von Leptin, einem Proteohormon, das eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Regulation der Nahrungsaufnahme in Vertebraten spielt (Ramsay *et al.*, 1998).

Zur Überprüfung einer differenzierungsbedingten Hochregulation der Expression des Leptin Gens wurde als Stichprobe die pSSC-Linie #5 erneut bis zur Bildung erster Lipidtropfen (10 Tage) adipogen differenziert und anschließend die Gesamt-RNA mit Trizol Isoliert.

Das Ergebnis der nachfolgenden RT-PCR undifferenzierter und adipogen differenzierter pSSCs in ADM der Linie #5 zeigt Abb. 46.

In undifferenzierten pSSCs konnte keine Leptinexpression nachgewiesen werden, wogegen bereits bei erstem Auftreten von intrazellulären Lipidtropfen deutlich die Expression von Leptin nachgewiesen werden konnte.

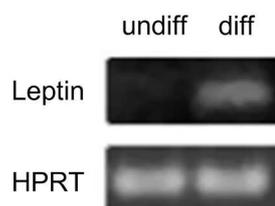


Abb. 46: Expression der Leptin mRNA vor (undiff; linke Spalte) und nach induzierter adipogener Differenzierung zum Zeitpunkt der Bildung erster Lipidtropfen (diff; rechte Spalte). Interne PCR-Kontrolle: HPRT.

10. Diskussion

10.1 Isolation und Zellkultur

Ein wesentliches Problem im Hinblick auf die Isolation von Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben und gerade aus der Haut ist der Mangel an spezifischen Oberflächen-Markerproteinen, an Hand derer diese identifiziert und isoliert werden können.

Mit Ausnahme von adulten Stammzellen aus dem Knochenmark und dem Nabelschnurblut, müssen zur Isolation von Stammzellen anderer Gewebe diese aus dem Gewebeverbund gelöst werden. Dies ist generell durch eine enzymatische Verdauung des Gewebes möglich und wird allgemein angewandt (Kruse *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2003; Toma *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2006; Zuk *et al.*, 2002).

Stammzellen aus dem Knochenmark haben die Eigenschaft, an der Wachstumsfläche schneller zu adhären als andere Zelltypen und können somit durch einen frühen Mediumwechsel von unerwünschten Zelltypen befreit werden (Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1987). Dies ist bei Stammzellen aus der Haut nur bedingt möglich (Shi, Cheng, 2004). Im Hinblick auf die Dermis erfolgt die Aufreinigung und Trennung der potentiellen Stammzellen von unerwünschten Zelltypen meist über eine mediumselektive Proliferation, wie sie für Stammzellen des zentralen Nervensystems etabliert wurde (Collo *et al.*, 2006; Dyce *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2008; Gritti *et al.*, 1996; Nunes *et al.*, 2003; Rietze *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 2001). Diese als SKPs (skin derived precursors) bekannten Stammzellen sind die bisher am besten untersuchten Stammzellen der Dermis. Einige Versuche wurden unternommen, dermale Stammzellen auf andere Weise aufzureinigen, z.B. über das Passagieren (Jahoda *et al.*, 2003; Kruse *et al.*, 2006) oder eine initiale dreidimensionale Kultur in geliertem Medium (Medina *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit beschriebenen pSSCs wurden ebenso durch eine enzymatische Verdauung aus dem Zellverbund isoliert. Die Inkubation der Zellkultur nach einer initialen Wachstumsphase von 1-4 Tagen mit einer 0,25%-igen Trypsin/EDTA-Lösung ergab ein zeitlich versetztes Ablösen unterschiedlicher Zelltypen. Hierbei lösten sich die Zielzellen schneller als Keratinozyten und andere differenzierte Zellen (siehe Abb. 5 D). Sehr schnell, nach nur zwei- bis viermaliger Wiederholung, konnte ein einheitlicher Zelltyp mikroskopisch nachgewiesen werden. Die hier beschriebene wiederholte Kurzzeit-Inkubation der Zellen mit einer 0,25%-igen Trypsin/EDTA-Lösung stellt somit eine weitere standardisierbare Methode dar, die zur Aufreinigung von Stammzellen aus der Haut angewandt werden kann.

Die isolierten pSSCs wurden nachfolgend in einem modifizierten Medium nach Toma *et al.* (2001) und Shih *et al.* (2005) kultiviert. Hierbei wurde ein Kulturmedium, das mit den Wachstumsfaktoren bFGF und EGF ergänzt wurde, verwendet. Wie bereits einleitend beschrieben, spielen beide Wachstumsfaktoren eine Schlüsselrolle für zelluläre Signalwege, die mit der Aufrechterhaltung stammzellassoziierter Eigenschaften und dem Erhalt des undifferenzierten Zustands assoziiert sind (Bikfalvi *et al.*, 1997; Gensburger *et al.*, 1987; Kitchens *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2005). Die von den beiden oben genannten Arbeitsgruppen etablierten Medien unterscheiden sich jedoch in weiteren Zusätzen. Shih *et al.* (2005) ergänzten ihr Medium mit 10% FCS, wogegen Toma *et al.* (2001) FCS durch die Zugabe des synthetischen Serumzusatzes B27 ersetzten. Dieser wurde als Mediumzusatz zur Verbesserung der Wachstumsbedingungen hypokampaler Neuronen entwickelt und enthält verschiedene Vitamine, Hormone und weitere wachstumsfördernde Faktoren wie Insulin, Transferrin, Katalase, Antioxidationsmittel und Fettsäuren (Brewer & Cotman, 1989). In weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, dass B27 sich zudem positiv auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) auswirkt (Svendsen *et al.*, 1995).

Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, einen Stammzelltyp mit möglichst großem Differenzierungspotential zu isolieren, und unter anderem auch die neuronale Differenzierung im Focus dieser Arbeit stand, wurde das Proliferationsmedium so zusammengestellt, dass es den Ansprüchen der verschiedenen, bisher isolierten, dermalen Stammzellen gerecht wird. Folglich wurden die hier isolierten pSSCs in einem Proliferationsmedium kultiviert, das sowohl bFGF, EGF, B27 als auch FCS enthielt.

10.2 Ähnlichkeiten der pSSCs mit MSCs

10.2.1 Morphologie der pSSCs

Ähnlich wie adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSCs), dem Pankreas, dem Haarfollikel und weiterer Gewebe, sowohl vom Menschen (Gorjup *et al.*, 2009; Kruse *et al.*, 2004; Peled *et al.*, 1991) als auch vom Schwein (Ringe *et al.*, 2002), von Ratte (Hoogduijn *et al.*, 2006; Kruse *et al.*, 2004) und Maus (Tropel *et al.*, 2004), zeigen undifferenzierte pSSCs unter diesen Kulturbedingungen eine spindelförmige und fibroblasten-ähnliche Morphologie und wachsen im Gegensatz zu SKPs adhärent als Monolayer (Abb. 6).

10.2.2 Untersuchungen zum Proliferationsverhalten

Die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der pSSCs ergaben eine mittlere Populationsverdopplungszeit von 44,3 Stunden. Verglichen mit den fötalen SKPs aus der Studie von Dyce *et al.* (2004), die zur Populationsverdopplung 55-140 Stunden benötigen, zeigen pSSCs somit eine deutlich schnellere Verdopplung. Mögliche Ursachen für die schnellere Proliferation ist das beigefügte FCS, da dieses neben den zugesetzten Wachstumsfaktoren bFGF und EGF eine Fülle weiterer mitogener Wachstumsfaktoren enthält wie u.a. PDGF (Ross, 1987).

Die von Shih *et al.* 2005 isolierten humanen Stammzellen aus der Kopfhaut (hSCP) benötigten in FCS-haltigem Medium eine mittlere Verdopplungszeit von 40 Stunden und unterscheiden sich im Hinblick auf die Proliferation somit nur geringfügig von pSSCs. Auch die Verdopplungszeit humaner BM-MSCs liegt bei ca. 48 Stunden (Shih *et al.*, 2005).

Fibroplasten-ähnliche Stammzellen, die aus humanem Fettgewebe isoliert werden konnten und in der Präsenz von FCS kultiviert wurden, benötigen im Durchschnitt nur 36 Stunden zur Populationsverdopplung und proliferieren somit geringfügig schneller als pSSCs (Rodriguez *et al.*, 2005). Auch Stammzellen aus Speicheldrüse (55 h) und Pankreas (46 h) zeigen ähnliche Populationsverdopplungszeiten wie pSSCs, wenn sie in FCS haltigem Medium kultiviert werden.

pSSCs konnten über 18 Passagen expandiert werden und erreichten damit $68,2 (\pm 4)$ Populationsverdopplungen, wobei sie zum Zeitpunkt der Versuchseinstellung weiterhin proliferativ waren (Abb. 9). Angaben zur maximalen kumulativen Populationsverdopplung humaner MSCs aus dem Knochenmark variieren in Abhängigkeit der Versuchskonzeptionen stark zwischen 38 ± 4 (Bruder *et al.*, 1997) bis hin zu 100 Populationsverdopplungen (Jiang Y., 2002). Di Girolamo *et al.* 1999 zeigten hierbei, dass zudem die Anzahl an Populationsverdopplungen humaner MSCs aus dem Knochenmark spenderabhängig enorm variieren kann (DiGirolamo *et al.*, 1999).

Eine charakteristische Eigenschaft mesenchymaler Stammzellen ist ihre Fähigkeit zur Koloniebildung aus einzelnen Zellen. Diesbezüglich konnten Di Girolamo *et al.* 1999 zeigen, dass mit zunehmender Passagenzahl, und somit zunehmender Populationsverdopplung, die Fähigkeit zur Koloniebildung zum Erliegen kam. Die Koloniebildungseffizienz - der Anteil an Zellen, die relativ zur Gesamtzellzahl zur Bildung von Kolonien fähig sind - war bei hBM-MSCs der Studie von Di Girolamo *et al.* 1999 sehr spendervariabel und lag zwischen 4 und 25% von Zellen in Passage 4. Auch variierten in dieser Studie die Kolonien in ihrer Größe (\emptyset zw. 2 -7 mm) stark zwischen den Spendern. Ein Vergleich zwischen humanen BM-MSCs und humanen Stammzellen des Haarfollikels (beide Passagen 5) ergaben bei beiden

Zelllinien nahezu identische Ergebnisse, die vergleichbar mit den Ergebnissen von Di Girolamo *et al.* 1999 waren. Im Gegensatz dazu ergaben weitere Versuche, dass dermale Fibroblasten nur zu 6% zur Koloniebildung fähig waren (Hoogduijn *et al.*, 2006). Die hier untersuchten pSSCs drei unterschiedlicher Tiere haben in Passage 5 eine Koloniebildungseffizienz zwischen 28,86% ($\pm 2,05\%$ SEM) und 37,69% ($\pm 1,34\%$ SEM) (Abb. 11 D). Somit erreichen sie teilweise höhere Werte als die von Di Girolamo *et al.* 1999 und Hoogduijn *et al.* 2006 untersuchten hBM-MSCs und Stammzellen des Haarfollikels.

pSSCs zeigen im Hinblick auf ihr Proliferationsverhalten eine deutlich Ähnlichkeit zu mesenchymalen Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben. Sie unterscheiden sich von SKPs durch ihr adhärentes Wachstum und ihre bedeutend schnellere Proliferation.

10.2.3 Untersuchungen zur Expression stammzellassoziierter Proteine

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark können eine Vielzahl verschiedener Oberflächenproteine präsentieren, wie unter anderem die in der Einleitung beschriebenen CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106 und CD166. Zudem sind sie negativ für Oberflächenproteine hämatopoetischer Stammzellen wie CD34 oder CD11, CD14 und CD45 und auch für ko-stimulierende Proteine wie CD80, CD86 und CD40 (Chamberlain *et al.*, 2007; Deans & Moseley, 2000).

Zur Charakterisierung von Stammzellpopulationen wird in neueren Studien vielfach die Expression dieser Proteine durchflusszytometrisch untersucht, um Stammzellen verschiedenen Ursprungs vergleichbar zu machen (Gorjup *et al.*, 2009; in 't Anker *et al.*, 2003; Kajahn *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2004b).

Die meisten Studien dazu werden an murinen oder humanen Zelllinien durchgeführt, wodurch die dazu kommerziell erhältlichen Antikörper hauptsächlich spezifisch zur Reaktion mit der murinen oder humanen orthologen Ausbildung des entsprechenden Proteins hergestellt werden. Somit war nicht für jedes der genannten Oberflächenproteine ein mit porzinen Zelllinien kompatibler Antikörper erhältlich. Auch wurde bisher keine phänotypische Charakterisierung der Oberflächenproteine von embryonalen oder adulten Stammzelllinien des Hausschweins durchgeführt. Deshalb wurde in dieser Studie erstmalig die Expression einer Auswahl an Oberflächenproteinen untersucht, die ein möglichst breites Spektrum abdecken und auch von embryonalen Stammzellen exprimiert werden.

Untersucht wurden hierbei die Expression des von murinen und humanen embryonalen Stammzellen exprimierten Oberflächenproteins CD9 (Tetraspanin) und den bei humanen

und murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nachgewiesenen CD29 (β -1 Integrin), CD44 (Hyaluronsäurerezeptor), CD90 (Thy-1) und der TGF- β Rezeptor CD105 (Endoglin).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von pSSCs früher Passagen (P2-P5) zeigten generell eine heterogene Expression der untersuchten Oberflächenproteine (Abb. 13). Hierbei konnten bei allen untersuchten pSSC Linien einheitlich hohe Werte für die Proteine CD29 und CD44, mittlere Expressionswerte für die Proteine CD9 und CD105 und nur eine geringe Expression von CD90 nachgewiesen werden. Pittenger *et al.* 1999 beschrieben eine einheitlich positive Expression von CD29, CD44, CD90 und CD105 für humane MSCs aus dem Knochenmark. Die Ergebnisse nachfolgender Expressionsanalysen humaner BM-MSCs und mesenchymaler Stammzellen aus humanem Fettgewebe zeigen allerdings, gerade im Hinblick auf die Expression der Proteine CD29, CD44 und CD105, eine heterogene Expression und eine starke Ähnlichkeit mit den Expressionsergebnissen der hier untersuchten pSSCs früher Passagen (Dicker *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004b; Tondreau *et al.*, 2004). Auch mesenchymale Stammzellen aus humaner fötaler und adulter Dermis (Shih *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), aus dem humanen Pankreas (Kajahn *et al.*, 2008), der Speicheldrüse (Gorjup *et al.*, 2009) und dem Haarfollikel (Hoogduijn *et al.*, 2006) zeigten ähnliche Expressionsmuster bezüglich der Expression von CD29, CD44 und CD105.

Verglichen mit Daten aus der Literatur unterscheiden sich pSSCs somit im Phänotyp von humanen MSCs verschiedener Ursprungsgewebe durch die deutlich geringere CD90-Expression. Studien zur CD90-Expression muriner MSCs aus dem Knochenmark legten dar, dass diese sich ebenfalls durch eine sehr geringe CD90-Expression von humanen MSCs unterscheiden (Baddoo *et al.*, 2003; Jiang Y., 2002; Peister *et al.*, 2004). Da bisher keine Expressionsanalysen der hier untersuchten Oberflächenproteine von Stammzellen des Hausschweins vorliegen, die zum Vergleich herangezogen werden können, ist anzunehmen, dass die hier festgestellte geringe CD90-Expression eine artspezifische Variation im Phänotyp porziner mesenchymaler Stammzellen darstellt.

Die CD9-Expression der sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen dieser Studie variierte zwischen 8 und 48% (Abb. 13). Der Anteil CD9 positiver Zellen an humanen embryonalen Stammzellen in Zellkultur variiert ebenfalls stark zwischen 32 und nahezu 100% (Carpenter *et al.*, 2004). Adulte mesenchymale Stammzellen aus humanem Fettgewebe exprimieren CD9 zu durchschnittlich 28% (Gronthos *et al.*, 2001) wohingegen mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Katzen CD9 zu mehr als 90% exprimieren. Allerdings zeigte die Studie nur das Ergebnis einer untersuchten Zelllinie (Martin *et al.*, 2002). Untersuchungen zur CD9-Expression von Stammzellen aus humanem Pankreas und humaner Speicheldrüse dagegen ergaben einheitlich eine sehr hohe Anzahl

CD9 positiver Zellen (Gorjup *et al.*, 2009). Auch diese Studie zeigte Ergebnisse von jeweils nur einer untersuchten Zelllinie, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass, ähnlich wie hier für pSSCs der adulten Schweinehaut festgestellt, auch bei humanen pankreatischen Stammzellen oder Stammzellen der Speicheldrüse die CD9-Expression variieren kann.

10.2.3.1 Auswirkungen der Expansion und der Kryokonservierung auf die Expression von Oberflächenproteinen

Da bekannt ist, dass gerade adulte Stammzellpopulationen ihre Eigenschaften während der Expansion in Zellkultur ändern (Gao & Raff, 1997; Panchision & McKay, 2002; Wren *et al.*, 1992), wurde die Expression der genannten Oberflächenproteine neben der Messung an pSSCs früher Passagen auch in späteren Passagen (P10-P15) untersucht.

Im Vergleich zu pSSCs früher Passagen (P2-P5) variierten die Anzahlen CD9, CD29, CD44, CD90 und CD105 positiver Zellen nur geringfügig, wodurch sich die Zellen im Hinblick auf die Expansion als phänotypisch stabil erwiesen (Abb. 14).

Auch die Kryokonservierung der pSSCs verursachte bezüglich der Expression von CD29, CD44, CD90 und CD105 keine wesentliche Veränderung. Dies entspricht den Ergebnissen von Ying *et al.* (2007), die die Auswirkung der Kryokonservierung bei Verwendung eines vergleichbaren Einfriermediums auf humane BM-MSCs untersuchten. Lediglich die CD9-Expression zeigt eine Abnahme im Vergleich zu nicht kryokonservierten pSSCs (Abb. 15).

CD9 formiert zusammen mit CD63, CD81 und CD82 ein Netzwerk an Tetraspaninen der Zelloberfläche und interagiert mit Integrienen wie VLA (very late antigen) und dem MHC II (major histocompatibility complex II) Rezeptor HLA-DR (Charrin *et al.*, 2001; Rubinstein *et al.*, 1994; Rubinstein *et al.*, 1996) und ist somit bedeutend für die Zellmigration, Zelladhäsion und auch die Zellfusion. Auch ist bekannt, dass die CD9-Expression mit einem reduzierten metastatischen Potential vieler Tumorzellen korreliert (Lagaudrière-Gesbert *et al.*, 1997). Ferner ist CD9 von großer Bedeutung bei der Aktivierung von T-Zellen (Tai *et al.*, 1996). Weiterhin können in verschiedenen Zelllinien Wachstumsfaktoren durch CD9 hochreguliert werden, was sich positiv auf die Proliferation auswirkt (Lagaudrière-Gesbert *et al.*, 1997; Shigeki *et al.*, 1997). Im Hinblick auf murine embryonale Stammzellen ist die CD9-Expression mit dem undifferenzierten Zustand der Stammzellen direkt korreliert. Hierbei führt der Differenzierungsprozess unmittelbar zur Herunterregulation von CD9. Ebenso ist CD9 notwendig für die Proliferation und Migration verschiedener adulter Stammzellen und funktional essentieller Bestandteil von Differenzierungsprozessen (Aoyama *et al.*, 1999; Kim

et al., 2007b). CD9 gilt in Bezug auf embryonale Stammzellen als ein möglicher Effektor, der durch den einleitend beschriebenen LIF/gp130/Jak/Stat-Signalweg reguliert wird (Oka *et al.*, 2002). Möglicherweise wird durch die Abwesenheit der beiden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF im Kryokonservierungsmedium, auch bei tiefen Temperaturen, dieser Signalweg beeinflusst, wodurch eine Herunterregulation der CD9-Expression denkbar wäre.

Zudem ist bekannt, dass auch das zugesetzte Kryoprotektionsmittel DMSO deutlich die Expression stammzellassoziierter Proteine negativ beeinflussen und eine Differenzierung embryonaler Stammzellen auslösen kann, wodurch oben genannte Veränderungen erklärt werden könnten (Adler *et al.*, 2006; Katkov *et al.*, 2006). Im Hinblick auf humane BM-MSCs zeigten Studien allerdings, dass sie auch nach der Kryokonservierung ihr multipotentes Differenzierungspotential nicht verloren haben (Ying *et al.*, 2007).

Versuche zur Kryokonservierung von Oozyten zeigten, dass auch bei diesem Zelltyp CD9 nach der Kryokonservierung dramatisch herunterreguliert ist (Behr *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2007). Wen *et al.* 2007 schließen daraus auf eine geringere Vitalität der Zellen.

Obwohl die Anzahl der Messungen gering ist, kann hieraus geschlossen werden, dass sich die Kryokonservierung negativ auf die CD9-Expression auswirkt. Da keine nachfolgenden Messungen der CD9-Expression im Verlauf einer weiteren Zellexpansion nach der Kryokonservierung vorliegen, kann eine mögliche Hochregulation von CD9 durch das verwendete Proliferationsmedium bei weiterer Expansion nicht ausgeschlossen werden.

10.2.3.2 Expression von Nestin und Fibronectin

Neben den untersuchten Oberflächenproteinen exprimieren pSSCs zudem die beiden intrazellulären Proteine Nestin und Fibronectin (Abb. 16). Diese Ko-Expression konnte bisher sowohl bei mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, als auch bei einer Vielzahl von adulten Stammzellen unterschiedlichster Ursprungsgewebe nachgewiesen werden (Reyes *et al.*, 2001; Tropel *et al.*, 2004). Gerade für dermale Stammzellen sowohl aus fötalem als auch adultem Gewebe scheint diese Expression charakteristisch (Dyce *et al.*, 2004; Toma *et al.*, 2001; Toma *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009).

Die durchflusszytometrische Quantifizierung der Nestinexpression früher Passagen sowie später Passagen zeigte, dass die untersuchten pSSC-Linien untereinander und auch zwischen frühen und späten Passagen im Anteil nestin-positiver Zellen variieren. Letztlich exprimieren große Subpopulationen der pSSCs Nestin (41-94%, Abb. 17). Ähnliche Ergebnisse wurden sowohl für mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (Tondreau *et al.*, 2004) als auch für SKPs nachgewiesen (Dyce *et al.*, 2004). Im Hinblick auf die

neuronale Differenzierung spielt Nestin eine besondere Rolle, die nachfolgend noch diskutiert wird.

10.2.4 Expression stammzellassoziierter Gene

Wie durch die vorangegangene Diskussion bereits deutlich geworden ist, besitzen pSSCs einige Eigenschaften, die sowohl embryonalen Stammzellen als auch mesenchymalen Stammzellen verschiedener Gewebe innewohnen.

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Transkriptionsfaktoren Stat3, Sox2 und Oct3/4 essentiell für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen sind. Neben diesen Faktoren wurden für die Erhaltung stammzellassoziierter Eigenschaften adulter Stammzellen die Expression der Gene Bmi1, Bcrp1/ABCG2 und Nestin einleitend beschrieben.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR zeigten, dass pSSCs früher Passagen die mit adulten Stammzellen assoziierten Gene Nestin, Bcrp1/ABCG2 und Bmi1 konstitutiv exprimierten (Abb. 18 A).

Auch zeigten die Ergebnisse, dass pSSCs früher Passagen die Marker embryonaler Stammzellen Stat3, Sox2 und Oct3/4 exprimieren. Deutlich wird hierbei vor allem, wie einleitend diskutiert, die unabhängige Regulation der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands durch den Stat3-Signalweg auf der einen und den Sox-Oct-Signalweg auf der anderen Seite. Dies zeigt sich dadurch, dass ausnahmslos in allen sechs untersuchten pSSC Linien der Transkriptionsfaktor Stat3 exprimiert ist. Sox2 und Oct3/4 dagegen wurden nur bei vier der sechs Linien in nachweisbarer Menge exprimiert (Abb. 18 A). Ähnliche Ergebnisse zeigten Zhao *et al.* 2006 bei dermalen Stammzellen aus fötaler Schweinehaut.

Stat3, Sox2 und Oct3/4, deren Expression als charakteristisch für embryonale Stammzellen angesehen wird, wurden für das Hausschwein bisher nur bei Stammzellen aus fötaler Haut und aus adultem Knochenmark nachgewiesen (Dyce *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2009). Die Expression dieser Faktoren in potentiellen Stammzellen aus der Haut des adulten Hausschweins wurde hiermit zum ersten Mal erbracht. Der Nachweis von Sox2, Oct3/4 und Stat3 in weiteren adulten Stammzellpopulationen des Menschen (Go *et al.*, 2008; Gorjup *et al.*, 2009; Graham *et al.*, 2003; Kajahn *et al.*, 2008; Tai *et al.*, 2005; Wislet-Gendebien *et al.*, 2005) bestätigt diese Ergebnisse und zeigt, dass diese Faktoren auch im adulten Organismus erhalten bleiben und für dessen Stammzellen ebenfalls relevant sind. Die Bedeutung von Oct3/4 für adulte Stammzellen wird allerdings kontrovers diskutiert (Kotoula *et al.*, 2008; Liedtke *et al.*, 2008; Tai *et al.*, 2005; Zangrossi *et al.*, 2007).

Aktuelle Studien zeigen die Reprogrammierbarkeit bereits differenzierter somatischer Zellen hin zu Zellen mit Eigenschaften embryonaler Stammzellen. Dies wurde erstmals ermöglicht durch die Transfektion muriner embryonaler Fibroblasten mit vier Genen: Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006; Wernig *et al.*, 2007). Die auf diese Weise modifizierten Zellen werden dadurch aus ihrem differenzierten Zustand gelöst und erhalten erneut die Eigenschaft der Pluripotenz. Neuere Studien zeigen zudem, dass diese induzierte Pluripotenz auch bereits durch die Applikation der Proteine Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 möglich ist, wodurch die genetische Modifikation der Zellen umgangen werden kann (Kim *et al.*, 2009). Durch die Fähigkeit der Pluripotenz können sich diese sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) erneut in Zellen der drei embryonalen Keimblätter, inklusive Keimzellen, differenzieren. Dies eröffnet für die therapeutische Anwendung in jeglicher Hinsicht enorme Möglichkeiten.

Neuronale Vorläuferzellen, die bereits Sox2 und c-Myc exprimieren, erwiesen sich als deutlich leichter reprogrammierbar, da zur Induktion der Pluripotenz nur noch zwei Faktoren (Oct3/4, Klf4) notwendig waren (Kim *et al.*, 2008).

Durch die autogene Expression der beiden Transkriptionsfaktoren Oct3/4 und Sox2 stellen pSSCs ebenfalls interessante Zellen für die Reprogrammierung zu iPSCs dar.

10.2.5 Auswirkungen der Expansion und der Kryokonservierung auf die Expression stammzellassoziierter Gene

Im Vergleich zu pSSCs früher Passagen zeigten pSSCs später Passagen neben der Expression von Nestin, Bcrp1/ABCG2 und Bmi1 eine Stat3-Expression in allen Linien. Hinsichtlich der Transkriptionsfaktoren Sox2 und Oct3/4 zeigen die sechs untersuchten Linien im Vergleich zu pSSCs früher Passagen eine unterschiedliche und zudem heterogene Expression (Abb. 18).

Zhao *et al.* 2009 untersuchten die Auswirkungen verschiedener Kulturmedien, Wachstumsoberflächen (Substrate) und Kulturbedingungen (Suspensionskultur, Adhäsionskultur) von Stammzellen aus fötaler Schweinedermis. Sie konnten zeigen, dass diese Zellen sowohl in Suspension als auch adhärent proliferieren können. Die Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium, ergänzt mit bFGF und EGF, ergab unter beiden Kulturbedingungen vergleichbare Expressionen der untersuchten stammzellassozierten Gene. Bei Zugabe von FCS änderte sich sowohl in Suspensionskultur als auch in Adhäsionskultur die Expression von Oct3/4 und Sox2 dramatisch. Eine mögliche Ursache der Änderungen im Hinblick auf die Oct3/4 und Sox2 Expression der pSSCs scheint somit die Expansion der Zellen in FCS haltigem Medium.

Wie Untersuchungen adulter Stammzellen des zentralen Nervensystem zeigten, kann Sox2 unabhängig von Oct3/4 von neuronalen Vorläuferzellen exprimiert werden (Brazel *et al.*, 2005; Episkopou, 2005; Graham *et al.*, 2003; Komitova & Eriksson, 2004).

Zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen ist eine regulierte Expression von Oct3/4 von enormer Bedeutung. Sinkt die Expression unter oder steigt sie über ein kritisches Level können Differenzierungsprozesse eingeleitet werden (Niwa *et al.*, 2000). Zudem kann Oct3/4 unabhängig von Sox2 von bereits weiter differenzierten somatischen Zellen exprimiert werden (Atlasi *et al.*, 2008; Kotoula *et al.*, 2008; Liedtke *et al.*, 2008; Zangrossi *et al.*, 2007).

Möglicherweise deuten die ermittelten Daten auf eine bereits einsetzende Differenzierung der pSSCs zu weniger potenten Vorläuferzellen durch die Expansion in FCS-haltigem Medium. Somit kann deduziert werden, dass das hier verwendete Proliferationsmedium sich nur bedingt zur Expansion unter Erhaltung des undifferenzierten Zustands der pSSCs eignet.

Die Analyse der Genexpression kryokonservierter pSSCs früher Passagen zeigte, dass ausnahmslos alle untersuchten pSSC-Linien nach der Kryokonservierung neben Nestin, Bmi1 und Bcrp1/ABCG2 auch die Transkriptionsfaktoren Stat3, Sox2 und Oct3/4 exprimieren (Abb. 19). Dies ist interessant, da der negative Einfluss der verwendeten Kryoprotektanz Dimethylsulfoxid (Me₂SO, DMSO) auf die Expression von Oct3/4 bei embryonalen Stammzellen bereits oft belegt wurde (Adler *et al.*, 2006; Katkov *et al.*, 2006). Allerdings konnten Ying *et al.* (2007) hinsichtlich der Oct3/4 Expression adulter mesenchymaler Stammzellen aus humanem Knochenmark keinerlei Auswirkungen der Kryokonservierung feststellen. Dies konnte zuvor auch für Stammzellen aus dem Knochenmark des Hausschweins belegt werden (Zeng *et al.*, 2006). Stammzellen anderer adulter Gewebe scheinen ebenfalls weniger anfällig für negative Effekte, die durch die Kryokonservierung verursacht werden können (Milosevic *et al.*, 2005; Woodbury *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2008).

Generell exprimieren pSSCs neben den Markergenen adulter Stammzellen die Transkriptionsfaktoren Stat3, Sox2 und Oct3/4. Die Expression der beiden letzteren scheint jedoch in Abhängigkeit der Kulturbedingungen einer Regulation zu unterliegen, deren Ursache womöglich im zugegebenen FCS liegt, in dieser Studie jedoch nicht weiter untersucht werden konnte.

10.3 Untersuchungen zum Differenzierungspotential der pSSCs

10.3.1 Neurogene Differenzierung

Wie bei den von Dyce *et al.* 2004 und Zhao *et al.* 2009 beschriebenen fötalen SKPs des Hausschweins konnte durch den Entzug des fötalen Kälberserums (FCS) und der beiden Wachstumsfaktoren bFGF und EGF bei nachfolgender Kultivierung in B27-haltigem Kulturmedium eine neurogene Differenzierung der pSSCs induziert werden. Die Induktion der Differenzierung erfolgte somit durch den Entzug der Wachstumsfaktoren. Dies ist für Stammzellen des zentralen Nervensystems, die nach Entzug von bFGF und EGF spontan zu Zellen der drei fundamentalen Linien des zentralen Nervensystems (Neuronen, Astrozyten und Oligodentroyten) differenzieren, ebenfalls bereits beschrieben (Martins *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2009; Villa *et al.*, 2000).

Während eines Zeitraums von 30 Tagen etablierte sich eine Ko-Kultur aus neuronalen Zelltypen und interessanterweise aus Zellen, die glatten Muskelzellen ähneln (Abb. 21). Die Identität dieser Zellen wurde immunozytochemisch bestätigt.

Morphologisch komplexe Zellen exprimierten das neuronenspezifische β -III-Tubulin, das Gliazellenprotein GFAP und das mittlere Neurofilament NF-M (Abb. 23-Abb. 26). Der Nachweis der Expression des alpha Aktins glatter Muskelzellen (α -SMA) bestätigte diesen Zelltyp in der etablierten Ko-Kultur (Abb. 26).

Neuronale Zelltypen haben ihren embryonalen Ursprung generell im Ektoderm, Muskelzellen dagegen im Mesoderm (Doe, Goodman, 1985; Gregoire *et al.*, 1998).

Die ermittelten Ergebnisse deuten somit auf ein multipotentes, keimblattübergreifendes Differenzierungspotential der pSSCs.

Diese Plastizität und die Fähigkeit zur Transdifferenzierung zu neuronalen Zelltypen und glatten Muskelzellen konnte vielfach für BM-MSCs beschrieben werden (Alexanian, 2005; Hermann *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002a; Peled *et al.*, 1991; Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Tondreau *et al.*, 2004; Wislet-Gendebien *et al.*, 2005; Woodbury *et al.*, 2000).

Für SKPs aus adulter Dermis des Menschen und der Maus konnte dieses Potential erstmals, bei Verwendung des gleichen Differenzierungsmediums, von Thoma *et al.* 2001 nachgewiesen werden. Weitere Arbeitsgruppen bestätigten diese keimblattübergreifende Differenzierung dermalen Stammzellen für Maus, Ratte und Mensch (Fernandes *et al.*, 2006; Joannides A., 2004; McKenzie *et al.*, 2006). Auch zeigten Studien an adulten Stammzellen aus dem humanen Pankreas eine Differenzierung zu neuronalen Zelltypen und glatten Muskelzellen. Hierbei formten Neuronen lange Axone, um glatte Muskelzellen als ihre möglichen Zielzellen zu kontaktieren und bildeten ein primitives neuro-muskuläres Netzwerk

(Kruse *et al.*, 2004). Wie Abb. 21 zeigt, konnte dies auch in der vorliegenden Studie für pSSCs gezeigt werden.

Alle untersuchten pSSC-Linien entwickelten im vorgegebenen Differenzierungszeitraum dreidimensionale kugelige Strukturen (Abb. 20). Diese Zellkluster ähneln Neurosphären und waren positiv für β -III-Tubulin und GFAP. Alpha-SMA positive Zellen fanden sich hingegen nur peripher dieser Strukturen (Abb. 22). Eine der pSSC-Linien verband während der 30-tägigen Differenzierung diese entstandenen Kluster, wodurch ein strangartiges Zellnetzwerk entstand (Abb. 27). Wegen der positiven Immunreaktivität der unverbundenen kugeligen Strukturen für β -III-Tubulin und GFAP und der nachgewiesenen Expression von β -III-Tubulin in Zellen der Stränge wird vermutet, dass diese pSSC-Linie *in vitro* zur Ausbildung von Nervenbündel fähig war.

Die neurogene Differenzierung *in vivo* und *in vitro* geht grundsätzlich mit einer Herunterregulation des für neuronale Vorläuferzellen charakteristischen Proteins Nestin einher und einer synchronen Hochregulation von Proteinen, die typisch für unterschiedliche postmitotische neuronale Zelltypen sind (Dahlstrand *et al.*, 1995; Lee & Cleveland, 1996; Lendahl *et al.*, 1990; Loo *et al.*, 1994; Martins *et al.*, 2008; Piper *et al.*, 2000).

Deshalb wurde die Expression der Proteine Nestin, β -III-Tubulin und GFAP vor und nach induzierter neuronaler Differenzierung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Da auch glatte Muskelzellen in der differenzierten Kultur nachgewiesen wurden, wurde zudem die Expression von α -SMA bestimmt.

β -III-Tubulin gilt als klassisches Markerprotein für Neuronen und wird vor allem in sich ausbreitenden Axonen exprimiert (Jiang *et al.*, 1994; Khan & Luduena, 1996; Lai *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2003; Roskams *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2000). GFAP wird dagegen von Astrozyten und Gliazellen exprimiert (Bignami & Dahl, 1977; Eng *et al.*, 2000).

Das Aktin α -SMA ist eines von sechs sehr ähnlichen Aktinisoformen. Im Gegensatz zu β - und γ -Aktin, die im Zytoplasma der meisten Zellarten vorkommen, wird α -SMA als Marker für Zellen betrachtet, die dem glatten Muskelgewebe entstammen (Hansson *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1991; Owens *et al.*, 1986; Skalli *et al.*, 1989).

Wie die durchflusszytometrischen Analysen zeigen, exprimieren undifferenzierte pSSCs früher Passagen (P2-P5) neben Nestin bereits die Proteine β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA in geringem Ausmaß (Abb. 30 - Abb. 34).

Verblüffend ähnliche Ergebnisse konnten während der Differenzierung neuronaler Stammzellen aus dem fötalen Telenzephalon von Ratten in Neuronen, Astrozyten und Gliazellen ermittelt werden. In undifferenziertem Zustand exprimierten diese bereits β -III-Tubulin zu ca. 25% und GFAP zu ca. 20% (Martins *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2009).

Tondreau *et al.* 2004 zeigten, dass mesenchymale Stammzellen aus dem humanen Knochenmark, die in FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, in frühen Passagen neben Nestin auch β -III-Tubulin und GFAP exprimieren.

Ferner ist bekannt, dass sowohl embryonale wie auch adulte Stammzellen in Anwesenheit von FCS spontan differenzieren können (Danner *et al.*, 2007; Gorjup *et al.*, 2009; Kruse *et al.*, 2004; Planat-Benard *et al.*, 2004; Talbot *et al.*, 2002).

Das hier verwendete Proliferationsmedium enthielt die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF. Beide sind, wie in der Einleitung beschrieben, von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands adulter und humaner embryonaler Stammzellen durch die Anregung der Proliferation. Allerdings ist auch bekannt, dass je nach Differenzierungszustand der jeweiligen Zellen bFGF sowohl mitogene Wirkung hat (Gensburger *et al.*, 1987; Kitchens *et al.*, 1994; Okabe *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2005), aber auch unterstützend auf Differenzierungsprozesse wirken kann (John *et al.*, 1998; Locklin *et al.*, 1999). Gerade im Hinblick auf die neuronale Differenzierung konnte gezeigt werden, dass bFGF gleichzeitig die Zellteilung, aber auch den neuronalen Differenzierungsprozess und das Auswachsen von Axonen positiv beeinflussen kann (Rydel & Greene, 1987; Stemple *et al.*, 1988; Tropepe *et al.*, 1999; Woodbury *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001). Bei embryonalen oder fötalen Stammzellen wird bFGF oft eingesetzt, um diese in den Zustand neuronaler Vorläuferzellen zu überführen (Beltrami *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2001)

Zusätzlich enthielt das Proliferationsmedium B27, um möglichst gute Bedingungen für neuronale Vorläuferzellen zu schaffen. Dieses wird ohne die hier eingesetzten Faktoren bFGF und EGF verwendet, um das differenzierte Wachstum von neuronalen Zelltypen zu unterstützen (Brewer, 1995; Brewer *et al.*, 1993).

Die geringe Expression von β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA vor induzierter neurogener Differenzierung kann somit aus der Anwesenheit von FCS und den primär neurogenen Konditionen des Proliferationsmediums resultieren.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen aktuelle Studien, die die Auswirkung verschiedener Medien auf fötale SKPs aus der Dermis des Hausschweins untersuchten. SKPs, die in serumfreiem Medium kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen, die in einem Medium mit FCS, B27, bFGF und EGF kultiviert wurden, eine deutlich geringere Expression von β -III-Tubulin und GFAP (Zhao *et al.*, 2009).

Die induzierte neuronale Differenzierung beeinflusste neben der Morphologie der pSSCs auch in hohem Maße die Expression der untersuchten Proteine (Abb. 30 - Abb. 34). Betrachtet man alle sechs untersuchten pSSC-Linien früher Passagen (P2-P5), so reduzierte sich im Mittel - wie für die neuronale Differenzierung typisch - die Nestinexpression, wobei

synchron die Expression von β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA anstieg. Hierbei war die Zunahme β -III-Tubulin positiver und α -SMA positiver Zellen deutlich signifikant (Abb. 34).

Der größte Anteil der pSSCs differenzierte somit zu Neuronen und glatten Muskelzellen. Die ermittelten Expressionsverhältnisse der untersuchten Proteine zueinander (alle addiert > 100%) deuten daraufhin, dass Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA zumindest teilweise ko-exprimiert wurden. Die Feststellung, dass α -SMA von nahezu 90% der Zellen exprimiert wird, aber nur Subpopulationen die Morphologie glatter Muskelzellen haben, stärkt ebenfalls diese Annahme.

Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich, da die Differenzierung der einzelnen Zellen nicht unbedingt synchron verlaufen muss. Zudem können in frühen neuronalen Differenzierungsstadien, wie neueste Untersuchungen zeigen, durchaus Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und auch α -SMA ko-exprimiert werden (Draberova *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008; Moreels *et al.*, 2008). Die Ko-Expression von Nestin und β -III-Tubulin gilt zudem als charakteristisches Merkmal neu entstehender Neuronen (Roy *et al.*, 2000).

Letztlich spiegelt diese Messung eine deutliche neuro-muskuläre Differenzierung wider, wobei der Zeitraum von 30 Tagen vermutlich nicht ausreichend war, um eine endgültige Differenzierung aller Zellen zu erreichen. Die hier gemessenen Ergebnisse reflektieren somit eine heterogen differenzierte Zellpopulation zum Zeitpunkt der Datenerhebung, die sich aus Neuronen, Astrozyten bzw. Gliazellen, glatten Muskelzellen und ihren weniger differenzierten Vorläufern zusammensetzt.

10.3.1.1 Auswirkungen der Expansion auf die Regulation von Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA während der neuronalen Differenzierung

Die Expression von Markerproteinen differenzierter Zellen ist während der Expansion der pSSCs leicht gestiegen (Abb. 35 - Abb. 39). Dies wird aber, wie zuvor diskutiert, durch die neurogenen Bedingungen und die Anwesenheit von FCS im Proliferationsmedium erklärbar. Trotzdem scheint sich die Expansion der pSSCs im Hinblick auf eine Differenzierung zu Neuronen und glatten Muskelzellen keinesfalls negativ ausgewirkt zu haben. Deutlich signifikant wurde in allen sechs untersuchten pSSC-Linien Nestin herunterreguliert und β -III-Tubulin und α -SMA hochreguliert. Im Mittel konnte jedoch keine GFAP Regulation nachgewiesen werden (Abb. 39).

B27 findet zwar weite Verwendung zur Kultivierung neuronaler Zelltypen und auch deren Vorläuferzellen, wurde aber 1989 von Brewer und Cotman entwickelt, um eine Langzeitkultivierung von Neuronen zu ermöglichen (Brewer & Cotman, 1989; Johansson *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005; Svendsen *et al.*, 1995). Weitere Veränderungen der B27

Zusammensetzung mit dem Ziel, möglichst reine Neuronenkulturen zu erhalten, führten zur Entwicklung eines Serumersatzes, der sich nachhaltig negativ auf das Wachstum weiterer neuronaler Zelltypen wie Gliazellen und Astrozyten auswirkte (Brewer, 1995; Brewer *et al.*, 1993).

Dadurch wäre denkbar, dass sich auch in diesem Fall die Expansion der pSSCs in B27-haltigem Medium negativ auf die Differenzierungsfähigkeit der pSSCs zu Gliazellen bzw. Astrozyten ausgewirkt haben könnte.

10.3.1.2 Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Regulation von Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA während der neuronalen Differenzierung

Die Kryokonservierung der undifferenzierten pSSCs schien keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die Morphologie zu haben. Mit der 30-tägigen Differenzierung ging ebenfalls eine morphologische Änderung der kryokonservierten pSSCs einher, wobei die differenzierten pSSCs Morphologien neuronaler Zelltypen und glatter Muskelzellen annahmen.

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Expressionsanalyse der neuronalen Differenzierungsstudie der vier untersuchten pSSC-Linien, so zeigt sich, dass diese im vorgegebenen Zeitraum nur noch bedingt zur Regulation der untersuchten Proteine in der Lage waren (Abb. 44). Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit der ermittelten geringeren CD9-Expression der pSSCs nach der Kryokonservierung. CD9 spielt gerade bei Differenzierungsprozessen hämatopoetischer und neuronaler Linien eine bedeutende Rolle (Aoyama *et al.*, 1999; Banerjee *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2007b).

Bisher wurden die Auswirkungen der Kryokonservierung auf dermale Stammzellen aus der Haut des Hausschweins nicht untersucht. Generell ist jedoch bekannt, dass die Kryokonservierung verschiedene negative Effekte bezüglich der Zellvitalität und Zellfunktionalität verursachen kann. Viele resultieren direkt aus dem Prozess des Einfrierens. Hierbei entstehen osmotische Spannungen, die zu Membrandeffekten führen können. Ebenso kann die intrazelluläre Eisbildung Schäden an der Zellmembran, am Zytoskelett oder an funktional bedeutenden intrazellulären Komponenten verursachen, die sich alle negativ auf die Funktionalität der Zellen auswirken (Han & Bischof, 2004; Hubel, 1997; Meryman, 2007; Meryman, 1971; Meryman, 1974; Muldrew & McGann, 1994).

Weitere Schäden werden auch dem verwendeten Kryoprotektionsmittel Dimethylsulfoxid (Me_2O , DMSO) zugeschrieben (Fahy *et al.*, 1990; Fahy, 1986). DMSO kann bei Penetration der Zellen zu starkem osmotischem Stress und zu intrazellulären Veränderungen führen. Letztere können das Zytoskelett betreffen, epigenetische Prozesse beeinflussen und die Kreuzverlinkung nuklearer Proteine verursachen (Bischof *et al.*, 2002; Hubel, 1997).

Die negativen Effekte der Kryokonservierung auf die pSSCs zeigte sich hauptsächlich im Hinblick auf die Regulation der untersuchten Proteine während der Differenzierung. Möglicherweise führt eine längere Kultivierung undifferenzierter pSSCs nach Kryokonservierung zur Erholung der Zellen. Dies wäre zu erwarten, da sich die Kryokonservierung auf die Expression der untersuchten Oberflächenproteine und auch der stammzellassoziierten Gene nicht wesentlich auswirkte und zudem morphologische Änderungen die neuro-muskuläre Differenzierung der kryokonservierten pSSCs begleiteten. Wegen der geringen Versuchszahl bleibt dies letztlich spekulativ. Zur Klärung bedarf es somit weiterer Versuchsreihen.

10.3.2 Adipogene Differenzierung

Nach induzierter neurogener Differenzierung etablierte sich eine Ko-Kultur aus verschiedenen neuronalen Zelltypen und glatten Muskelzellen. Da neuronale Zellen dem Ektoderm und Muskelzellen dem Mesoderm entstammen, sind pSSCs zur sogenannten Transdifferenzierung, also einer keimblattübergreifenden Differenzierung, fähig.

Zur Überprüfung, ob pSSCs neben glatten Muskelzellen zur Differenzierung in einen weiteren mesenchymalen Zelltyp fähig sind, wurden pSSCs in Medien kultiviert, die eine adipogene Differenzierung verschiedener adulter Stammzellen induzieren können.

SKPs können bereits durch die Kultivierung in einem Medium, das 10% FCS enthält, die adipogene Differenzierung einleiten. Humane BM-MSCs benötigen zur adipogenen Differenzierung neben FCS die stimulierenden Substanzen Dexamethason, Insulin, Indometacin und 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Pittenger *et al.*, 1999).

Zum Vergleich wurden pSSCs in beiden Medien kultiviert. pSSCs, die wie SKPs nur in Anwesenheit von 10% FCS kultiviert wurden, zeigten nahezu keine adipogene Differenzierung. Dagegen löste das adipogene Differenzierungsmedium nach Pittenger *et al.* eine starke Bildung von Lipidtropfen im Zytoplasma aus, wie es für die Differenzierung zu Adipozyten typisch ist (Abb. 45).

Die adipogene Differenzierung konnte zusätzlich durch den Nachweis der Expression von Leptin (Abb. 46), einem Proteohormon, das nahezu ausschließlich von Adipozyten freigesetzt wird, bestätigt werden (Ramsay *et al.*, 1998).

Somit konnte gezeigt werden, dass pSSCs das Potential zur adipogenen Differenzierung haben. Die Notwendigkeit der stimulierenden Substanzen macht sie nicht nur mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks vergleichbar (Dicker *et al.*, 2005; Pittenger *et al.*, 1999), sondern auch mit Stammzellen aus dem Pankreas, der Speicheldrüse (Gorjup

et al., 2009), dem Fettgewebe (De Ugarte *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004b), der humanen Dermis und dem Muskelgewebe (Young *et al.*, 2001), dem Haarfollikel (Hoogduijn *et al.*, 2006; Jahoda *et al.*, 2003) und dem Zahnbulbus (Iohara *et al.*, 2006).

Kritische Anmerkung

An dieser Stelle bleibt kritisch anzumerken, dass die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Charakterisierung der pSSCs, im Hinblick auf eine abschließenden Aussage, sicherlich noch weitere Untersuchungen erforderlich machen werden.

Durchflusszytometrische Messungen sowie RT-PCR-Analysen weniger Proteine und Gentranskripte, wie hier dargestellt, stellen nur einen Anfang in der Charakterisierung und Klassifizierung bestimmter Zelltypen dar. Im Laufe der letzten Dekade wurden neue hocheffiziente Labortechniken entwickelt, wie zum Beispiel Real-Time qPCR, Next Generation Sequencing Platforms (NGS), Chromatin-Immunopräzipitations-Assay (ChiP-Assays), aber auch Methoden zur Bestimmung der erstmals 1993 beschriebenen Mikro-RNAs (miRNA). Diese technisch und finanziell sehr aufwändigen Methoden haben bereits jetzt Einzug in die Stammzellforschung gefunden und werden sicherlich auch in Zukunft eine maßgebliche Rolle in der funktionellen Charakterisierung von Zellen spielen (Boyer *et al.*, 2006; Ginzinger, 2002; Greco & Rameshwar, 2007; Houbaviv *et al.*, 2003; Kuwabara *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Maitra *et al.*, 2005; Mardis, 2008; Reya *et al.*, 2003; Shendure, 2008; Takahashi & Yamanaka, 2006; Tay *et al.*, 2008).

11. Zusammenfassung

Primäres Ziel dieser Studie war es, an Hand eines Modellorganismus, des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*) eine Methode zur Isolation von Stammzellen aus der Haut zu erarbeiten. Nachfolgend sollten die isolierten Zellen zum Vergleich mit weiteren adulten Stammzellen bezüglich ihres Proliferationsverhaltens und ihres Phänotyps stammzellassoziierter Gene und Oberflächenproteine charakterisiert werden. Durch Differenzierungsversuche sollte der Stammzellcharakter bestätigt und die Fähigkeit zur Transdifferenzierung in Zellen unterschiedlicher Keimblätter gezeigt werden. Zudem sollten die Auswirkungen der Expansion und der Kryokonservierung auf den Phänotyp und das Differenzierungspotential durch weitere Expressionsanalysen und Differenzierungsversuche ermittelt werden.

Die hier untersuchten pSSCs können durch eine enzymatische Verdauung der Haut und nachfolgende Aufreinigungsschritte durch die wiederholte kurzzeitige Inkubation mit einer Trypsin/EDTA Lösung isoliert werden. Diese Zellen haben eine spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Morphologie, die für mesenchymale Stammzellen typisch ist.

Ebenso wie mesenchymale Stammzellen haben sie ein enormes Expansionspotential und exprimieren die Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44 und CD105. Wie murine MSCs aus dem Knochenmark unterscheiden sie sich von humanen BM-MSCs durch ihre sehr geringe CD90 Expression.

Zudem exprimieren pSSCs die Gene Nestin, Bcrp1/ABCG2 und Bmi1, die klassische Marker adulter Stammzellen darstellen. Auch konnte die Expression der Transkriptionsfaktoren Stat3, Oct3/4 und Sox2 nachgewiesen werden, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen von essentieller Bedeutung sind. Die autogene Expression von Sox2 und Oct3/4 macht somit pSSCs zu interessanten Kandidaten für die Rückprogrammierung zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs).

Nachfolgende Differenzierungsversuche zeigten das Potential der pSSCs zur induzierten Differenzierung zu neuronalen Zelltypen, glatten Muskelzellen und Adipozyten. Dies belegt die Fähigkeit der pSSCs zur keimblattübergreifenden Differenzierung in Zellen mindestens zweier Keimblätter, dem Ektoderm (Neuronen, Astrozyten) und dem Mesoderm (glatte Muskelzellen, Adipozyten).

Zukünftig sollten weitere Differenzierungsversuche bezüglich einer chondrogenen und osteogenen Differenzierung, einer Differenzierung in Zelltypen des Entoderms und letztlich

einer Differenzierung hin zu Keimzellen durchgeführt werden, um das gänzliche Differenzierungspotential der pSSCs vollständig darlegen zu können.

Die Expansion der pSSCs in dem verwendeten Proliferationsmedium verursachte eine Änderung in der Expression von Oct3/4 und Sox2. Möglicherweise wurde dieses hervorgerufen durch das im Medium enthaltene FCS und die neurogenen Bedingungen. Die leicht gestiegene Expression von Proteinen verschiedener ausgereifter Zelltypen der pSSCs späterer Passagen deutet auf eine mögliche spontane Differenzierung während der Expansion. Die Fähigkeit zur Differenzierung in Neuronen und glatte Muskelzellen wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst.

Die Kryokonservierung beeinträchtigte den Phänotyp der pSSCs nur minimal. Änderungen konnten nur hinsichtlich der CD9 Expression festgestellt werden. Die differenzierungsbedingte Regulation der untersuchten Proteine Nestin, β -III-Tubulin, GFAP und α -SMA verlief im Vergleich zu nicht kryokonservierten pSSCs unklarer. Dies kann sowohl die Folge des Einfrier- und Auftauprozesses an sich sein als auch die Auswirkung des verwendeten Dimethylsulfoxids als Kryoprotektanz. Es wird nicht ausgeschlossen, dass ein Zusammenhang zwischen der verminderten CD9 Expression und der unklaren Proteinexpression nach der Differenzierung der kryokonservierten Zellen besteht. Eine mögliche Erholung der Zellen mit fortlaufender Expansion ist wegen steter Expression der stammzellassoziierten Gene und der mit der Differenzierung einhergehenden morphologischen Änderung denkbar.

Somit wird deutlich, dass bis zur Übertragung auf andere Tierarten und der möglichen Lagerung dermalen Stammzellen in Genbanken, mit dem Ziel der späteren Verwendung in Nachzuchtprogrammen, weitere Untersuchungen ratsam sind.

Diese sollten wegen den bekannten Auswirkungen des FCS die Entwicklung serumfreier Kulturmedien beinhalten, die durch Substitution mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes gewährleisten.

Auch bedarf es intensiver Studien der Auswirkungen verschiedener Einfriermedien und Einfrierprotokolle, um die Auswirkungen der Kryokonservierung besser abschätzen zu können und um ihre Folgen möglichst gering zu halten.

Zusammenfassende Gesamtbetrachtung

Die vorliegende Arbeit untersucht zwei grundlegende Fragestellungen im Hinblick auf den Betrieb von Genbanken als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität. Das erste Kapitel behandelt aus rechtlicher Sicht die juristischen Fragen nach dem Zugang zu genetischen Ressourcen, nach dem Ausgleich aus der Nutzung entstehender Vorteile (Access and Benefit Sharing, ABS) und nach den Möglichkeiten des Handels mit Proben gefährdeter Tierarten, dies sowohl im Hinblick auf die rein wissenschaftliche Forschung als auch in Bezug auf kommerziell orientierte Zwecke. Grundlegend für die Bearbeitung dieser Fragen war die detaillierte Betrachtung des Übereinkommens über die biologische Vielfalt (CBD) und des Übereinkommens über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen (CITES).

Da das CBD im Hinblick auf den Zugang zu genetischen Ressourcen in der Bundesrepublik Deutschland bisher nicht umgesetzt ist, bleibt dem Betreiber einer Genbank zur rechtlichen Absicherung und Klarheit nur die Aushandlung von Materialübertragungsverträgen mit den Ursprungsländern der genetischen Ressourcen. Der nachfolgende Handel mit gelagerten Proben gefährdeter Tierarten ist möglich, wenn dies nicht-kommerziell zur wissenschaftlichen Forschung erfolgt und die beteiligten Institutionen bei ihren Regierungen als wissenschaftliche Institutionen registriert sind. Bei kommerziellen Absichten unterliegt der Handel streng den durch das CITES vorgegebenen Regulierungen. Ausnahmen des Handelsverbotes sind möglich, z.B. dann wenn es sich um Proben von Tieren handelt, die in Gefangenschaft gezüchtet worden sind.

Das zweite Kapitel behandelt aus naturwissenschaftlicher Sicht die Möglichkeit der direkten Gewinnung genetischer Materialien von Tieren. Hierbei wurde die Isolierung adulter Stammzellen aus der Haut von Säugetieren als Zielzellen zur Lagerung in Genbanken fokussiert. Am Modellorganismus "Hausschwein" (*Sus scrofa domestica*) wurde eine Methode zur Isolation adulter stammzellähnlicher Zellen aus der Haut etabliert. Durch nachfolgende Laborversuche wurden die isolierten stammzellähnlichen Zellen (pSSCs, porcine skin derived stem cell-like cells) charakterisiert. Wie mesenchymale Stammzellen haben pSSCs eine fibroblasten-ähnliche Morphologie und exprimieren die Oberflächenproteine CD9, CD29, CD44 und CD105. Neben diesen konnte die Expression der stammzellosoziierten Gene Stat3, Oct3/4, Sox2, Nestin, Bcrp1/ABCG2 und Bmi1 nachgewiesen werden. Weitere Versuche zeigten die induzierte Differenzierung der pSSCs zu Zellen zweier embryonaler Keimblätter, dem Ektoderm (Neuronen, Astrozyten) und dem Mesoderm (glatte Muskelzellen und Adipozyten). Zur vollständigen Charakterisierung und gänzlichen Ermittlung des Differenzierungspotentials bedarf es allerdings weiterer Versuche, die wegen der Kostspieligkeit und einem erhöhten zeitlichen Aufwand hier nicht realisierbar

waren. Die Expansion und die Kryokonservierung der pSSCs zeigten geringfügige Auswirkungen auf den Phänotyp und das Differenzierungspotential. In Bezug auf die Kryokonservierung konnte wegen der geringen Anzahl an Versuchen eine definitive Aussage über ihre Folgen nicht getroffen werden. Folglich bedarf es weiterer Untersuchungen zur Ermittlung der Auswirkungen der Kryokonservierung auf adulte Stammzellen, die aus der Haut gewonnen werden können.

Durch ihre Lagerung in Genbanken eröffnen aus der Haut isolierbare Stammzellen neue Möglichkeiten für den Artenschutz, dies vor allem durch ihre Anwendbarkeit im Rahmen modernster Reproduktionsmethoden und als nahezu unendliche DNA-Quelle für phylogenetische Studien, die zum Populationsmanagement unerlässlich sind.

Trotz der sich aus dieser Arbeit ergebenden neuen Fragen - im Hinblick auf den Zugang, die Gewinnung und auch die Lagerung genetischer Materialien gefährdeter Tierarten -, bleibt festzuhalten, dass Genbanken generell die Möglichkeit bieten, vitales, biologisches Material bereitzuhalten. Dies ist sowohl bedeutend für die Grundlagenforschung als auch für den Einsatz dieser Materialien zur Steigerung der Reproduktion gefährdeter Arten, letztlich mit dem Ziel, genetische Variationen zu erhalten, die anderenfalls verloren gehen würden.

Literatur

- Adler S, Pellizzer C, Paparella M, *et al.* (2006) The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicology in Vitro* **20**, 265-271.
- Alexanian AR (2005) Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions. *Experimental Cell Research* **310**, 383-391.
- Alkema M, Wiegant J, Raap AK, *et al.* (1993) Characterization and chromosomal localization of the human proto-oncogene BMI-1. *Human Molecular Genetics* **2**, 1597-1603.
- Alonso L, Fuchs E (2003) Stem cells of the skin epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11830-11835.
- Alonso L, Fuchs E (2003) Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes & Development* **17**, 1189-1200.
- Alvi A, Clayton H, Joshi C, *et al.* (2003) Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Research* **5**, R1 - R8.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, *et al.* (2000) Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Developmental Biology* **227**, 271-278.
- Amit M, Margulets V, Segev H, *et al.* (2003) Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells. *Biology of Reproduction* **68**, 2150-2156.
- Amoh Y, Li L, Yang M, *et al.* (2004) Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 13291-13295.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL (2001) Can stem cells cross lineage boundaries? *Nature Medicine* **7**, 393-395.
- Andrabi SMH, Maxwell WMC (2007) A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science* **99**, 223-243.
- Aoyama K, Oritani K, Yokota T, *et al.* (1999) Stromal Cell CD9 Regulates Differentiation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Blood* **93**, 2586-2594.
- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, *et al.* (2008) OCT4 Spliced Variants Are Differentially Expressed in Human Pluripotent and Nonpluripotent Cells. *Stem Cells* **26**, 3068-3074.
- Avery S, Inniss K, Moore H (2006) The Regulation of Self-Renewal in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development* **15**, 729-740.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, *et al.* (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development* **17**, 126-140.
- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, *et al.* (1998) Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats - similarities to astrocyte grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3908-3913.
- Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, *et al.* (2003) Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of Cellular Biochemistry* **89**, 1235-1249.
- Banerjee SA, Hadjiargyrou M, Patterson PH (1997) An Antibody to the Tetraspan Membrane Protein CD9 Promotes Neurite Formation in a Partially alpha 3beta 1 Integrin-Dependent Manner. *Journal of Neuroscience* **17**, 2756-2765.
- Barry F, Boynton RE, Liu B, *et al.* (2001) Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Experimental Cell Research* **268**, 189-200.

- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, *et al.* (1999) The Monoclonal Antibody SH-2, Raised against Human Mesenchymal Stem Cells, Recognizes an Epitope on Endoglin (CD105). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **265**, 134-139.
- Bartels P, Kotze A (2006) Wildlife biomaterial banking in Afrika for now and the future. *Journal of Environmental Monitoring* **8**, 779-81.
- Basavaraja N, Hedge SN (2004) Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology* **49**, 149-156.
- Behr B, Wen Y, Quintero R, *et al.* (2006) P-173: Preliminary experience on the CD9 expression on frozen-thawed mouse oocytes. *Fertility and Sterility* **86**, 196-196.
- Beltrami AP, Cesselli D, Beltrami CA (2009) Pluripotency rush! Molecular cues for pluripotency, genetic reprogramming of adult stem cells, and widely multipotent adult cells. *Pharmacology & Therapeutics* **124**, 23-30.
- Benirschke K (1984) The frozen zoo concept. *Zoo Biology* **3**, 325-328.
- Beyerlin U (2000) *Umweltvölkerrecht* C.H. Beck Verlag, München.
- Bez A, Corsini E, Curti D, *et al.* (2003) Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Research* **993**, 18-29.
- Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, *et al.* (2003) Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Experimental Cell Research* **287**, 98-105.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, *et al.* (2001) Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* **19**, 180-192.
- Bickenbach JR (1981) Identification of Label-retaining Cells in Oral Mucosa and Skin. *Journal of Dental Research* **60**, 1611-1620.
- Bignami A, Dahl D (1977) Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **25**, 466-469.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, *et al.* (1997) Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews* **18**, 26-45.
- Birnie P, Boyle A (2002) *International Law and the Environment*, 2 edn. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Bischof JC, Wolkers WF, Tsvetkova NM, *et al.* (2002) Lipid and protein changes due to freezing in dunning AT-1 cells. *Cryobiology* **45**, 22-32.
- Björklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, *et al.* (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2344-2349.
- Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, *et al.* (1999) Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo. *Science* **283**, 534-537.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, *et al.* (2004) Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* **188**, 635-648.
- Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, *et al.* (1997) Leukemia Inhibitory Factor-dependent Transcriptional Activation in Embryonic Stem Cells. *Journal of Cell Biology* **138**, 1207-1217.
- Böhne F (2001) Art. 7 EG-Artenschutzverordnung - Abweichungen von der Dokumentenpflicht. *Natur und Recht Heft* **5**, 257-265.
- Boiani M, Scholer HR (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 872-881.
- Bos Cvd, Mosca J, Winkles J, *et al.* (1997) Human mesenchymal stem cells respond to fibroblast growth factors. *Human cell* **10**, 45-50.

- Bos JD, Zonneveld I, Das PK, *et al.* (1987) The Skin Immune System (SIS): Distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in Normal Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **88**, 569-573.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, *et al.* (2005) Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **122**, 947-956.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, *et al.* (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349-353.
- Brazel C, Limke T, Osborne J, *et al.* (2005) Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* **4**, 197-207.
- Brewer GJ (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *Journal of Neuroscience Research* **42**, 674-683.
- Brewer GJ, Cotman CW (1989) Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Research* **494**, 65-74.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, *et al.* (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research* **35**, 567-576.
- Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, *et al.* (2004) Karyotypic Stability, Genotyping, Differentiation, Feeder-Free Maintenance, and Gene Expression Sampling in Three Human Embryonic Stem Cell Lines Derived Prior to August 9, 2001. *Stem Cells and Development* **13**, 585-597.
- Bruder S, Jaiswal N, Haynesworth S (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry* **64**, 278-294.
- Bruggeman SWM, Valk-Lingbeek ME, van der Stoop PPM, *et al.* (2005) Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes and Development* **19**, 1438-1443.
- Brüstle O, Jones KN, Learish RD, *et al.* (1999) Embryonic Stem Cell-Derived Glial Precursors: A Source of Myelinating Transplants. *Science* **285**, 754-756.
- Carpenter G, Cohen S (1979) Epidermal Growth Factor. *Annual Review of Biochemistry* **48**, 193-216.
- Carpenter M, Rosler E, Fisk G, *et al.* (2004) Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Developmental Dynamics* **229**, 243-258.
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, *et al.* (1980) Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* **56**, 289-301.
- Chailakhyan RK, Fridenshtein AY, Vasil'ev AV (1970) Clone formation in monolayer cultures of bone marrow and spleen. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* **69**, 188-191.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, *et al.* (2007) Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* **25**, 2739-2749.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* (2003) Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* **113**, 643-655.
- Charrin S, Le Naour F, Oualid M, *et al.* (2001) The Major CD9 and CD81 Molecular Partner. Identification and Characterization of the Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14329-14337.

- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, *et al.* (2002) Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* **36**, 22-29.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Chunmeng S, Tianmin C (2004a) Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. *Transplantation Proceedings* **36**, 1578-1581.
- Chunmeng S, Tianmin C (2004b) Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. *Medical Hypotheses* **62**, 683-688.
- Cibelli J (2007) A Decade of Cloning Mystique. *Science* **316**, 990-992.
- Clarke A (2009) The Frozen Ark Project: the role of zoos and aquariums in preserving the genetic material of threatened animals. *International Zoo Yearbook* **43**, 222-230.
- Claudinet S, Nicolas M, Oshima H, *et al.* (2005) Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14677-14682.
- Cohnheim J (1867) Ueber Entzündung und Eiterung. *Virchows Archiv* **40**, 1-79.
- Collo G, Goffi F, Pich EM, *et al.* (2006) Immature neuronal phenotype derived from mouse skin precursor cells differentiated in vitro. *Brain Research* **1109**, 32-36.
- Conget P, Minguell J (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology* **181**, 67-73.
- Conway W (1985) The species survival plan and the conference on reproductive strategies for endangered wildlife. *Zoo Biology* **4**, 219-223.
- Corti S, Locatelli F, Strazzer S, *et al.* (2003) Neuronal Generation from Somatic Stem Cells: Current Knowledge and Perspectives on the Treatment of Acquired and Degenerative Central Nervous System Disorders. *Current Gene Therapy* **3**, 247-272.
- Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, *et al.* (1999) Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, lokation and function. *Experimental Dermatology* **8**, 80-88.
- Cotsarelis G, ST-T, Lavker R. M. (1990) Label-Retaining Cells Reside in the Bulge Area of Pilosebaceous Unit: Implications for Follicular Stem Cells, Hair Cycle, and Skin Carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-1337.
- Cozzi E, White DJG (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Medicine* **1**, 964-966.
- Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, *et al.* (2004) LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **22**, 770-778.
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Developmental Brain Research* **84**, 109-129.
- Danner S, Kajahn J, Geismann C, *et al.* (2007) Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Molecular Human Reproduction* **13**, 11-20.
- David M, Wong L, Flavell R, *et al.* (1996) STAT Activation by Epidermal Growth Factor (EGF) and Amphiregulin. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 9185-9188.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, *et al.* (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism* **44**, 1928-1942.
- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, *et al.* (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters* **89**, 267-270.
- Deans RJ, Moseley AB (2000) Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* **28**, 875-884.
- Dick I, Scott R (1992) Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **44**, 640-645.

- Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, *et al.* (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental Cell Research* **308**, 283-290.
- Dierßen K, Huckauf A (2008) Biodiversität - Karriere eines Begriffs. In: *Biodiversität*, pp. 3-9. Bundeszentrale für politische Bildung, Bonn.
- DiGirolamo C, Stokes D, Colter D, *et al.* (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology* **107**, 275-281.
- Doe CQ, Goodman CS (1985) Early events in insect neurogenesis : II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Developmental Biology* **111**, 206-219.
- Donald GP, Gene K, Rivka LI, *et al.* (1999) Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: Variations in yield, growth, and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* **72**, 570-585.
- Douagi I, Vieira P, Cumano A (2002) Lymphocyte commitment during embryonic development, in the mouse. *Seminars in Immunology* **14**, 361-369.
- Draberova E, Valle LD, Gordon J, *et al.* (2008) Class III [beta]-Tubulin Is Constitutively Coexpressed With Glial Fibrillary Acidic Protein and Nestin in Midgestational Human Fetal Astrocytes: Implications for Phenotypic Identity. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **67**, 341-354.
- Dyce PW, Wen L, Li J (2006) In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology* **8**, 384-390.
- Dyce PW, Zhu H, Craig J, *et al.* (2004) Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochemical Biophysical Research Communication* **316**, 651-658.
- Edmonds S (1997) Die neue EG-Artenschutzverordnung und das geltende nationale Artenschutzrecht. *Natur und Recht Heft 1*, 26-29.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Research* **25**, 1439-1451.
- Epiney A, Scheyli M (2000) *Umweltvölkerrecht* Stämpfli Verlag Bern.
- Episkopou V (2005) SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends in Neurosciences* **28**, 219-221.
- Erbs, Kohlhaas (2008) *Strafrechtliche Nebengesetze* C. H. Beck München.
- Erdo F, Buhle C, Blunk J, *et al.* (2003) Host-Dependent Tumorigenesis of Embryonic Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **23**, 780-785.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Fahy G, Lilley T, Linsdell H, *et al.* (1990) Cryoprotectant Toxicity and Cryoprotectant Toxicity Reduction: In Search of Molecular Mechanisms *Cryobiology* **27**, 247-268.
- Fahy GM (1986) The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* **23**, 1-13.
- Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, *et al.* (1998) Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquatic Living Resources*. **11**, 387 - 394.
- Fernandes KJL, Kobayashi NR, Gallagher CJ, *et al.* (2006) Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Experimental Neurology* **201**, 32-48.
- Fernandes KJL, McKenzie IA, Mill P, *et al.* (2004) A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology* **6**, 1082-1093.
- Fernandes KJL, Toma JG, Miller FD (2008) Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **363**, 185-198.

- Ferrari G, Cusella G, Angelis D, *et al.* (1998) Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science* **279**, 1528-1530.
- Fickel J, Wagener A, Ludwig A (2007) Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research* **53**, 81-89.
- Foose TJ, Wiese RJ (2006) Population management of rhinoceros in captivity. *International Zoo Yearbook* **40**, 174-196.
- Frankham R, Ballou J, Briscoe D (2005) *Introduction to Conservation Genetics*, Fifth printing edn. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid; Cape Town.
- Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* **4**, 267-274.
- Friedenstein A, Kuralesova AI (1971) Osteogenic Precursor Cells of Bone Marrow in Radiation Chimeras. *Transplantation* **12**, 99-108.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation* **3**, 393-403.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Proliferation* **20**, 263-272.
- Fuchs E (2008) Skin stem cells: rising to the surface. *Journal of Cell Biology* **180**, 273-284.
- Fuchs E, Segre JA (2000) Stem Cells: A New Lease on Life. *Cell* **100**, 143-155.
- Fujikawa T, Oh S-H, Pi L, *et al.* (2005) Teratoma Formation Leads to Failure of Treatment for Type I Diabetes Using Embryonic Stem Cell-Derived Insulin-Producing Cells. *American Journal of Pathology* **166**, 1781-1791.
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, Characterization, and use of Stem Cells from the CNS. *Annual Review of Neuroscience* **18**, 159-192.
- Gao F-B, Raff M (1997) Cell Size Control and a Cell-intrinsic Maturation Program in Proliferating Oligodendrocyte Precursor Cells. *Journal of Cell Biology* **138**, 1367-1377.
- Garcia R, Jove R (1998) Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *Journal of Biomedical Science* **5**, 79-85.
- Garcia R, Yu CL, Hudnall A, *et al.* (1997) Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth and Differentiation* **8**, 1267-1276.
- Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M (1987) Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells *in vitro*. *FEBS Letters* **217**, 1-5.
- Ghazizadeh S, Taichman LB (2001) Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. *The EMBO Journal* **20**, 1215-1222.
- Ginis I, Luo Y, Miura T, *et al.* (2004) Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* **269**, 360-380.
- Ginzinger DG (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* **30**, 503-512.
- Glowka L, Burhenne-Guilmin F, Synge H (1994) *A Guide to the Convention on Biological Diversity* IUCN Gland and Cambridge.
- Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H (2008) Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Experimental Cell Research* **314**, 1147-1154.
- Gómez MC, Jenkins JA, Giraldo A, *et al.* (2003) Nuclear Transfer of Synchronized African Wild Cat Somatic Cells into Enucleated Domestic Cat Oocytes. *Biology of Reproduction* **69**, 1032-1041.

- Goodell MA, Brose K, Paradis G, *et al.* (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1797-1806.
- Gorjup E, Danner S, Rotter N, *et al.* (2009) Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations. *European Journal of Cell Biology* **88**, 409-421.
- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, *et al.* (2003) SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* **39**, 749-765.
- Grandis J, Drenning S, Chakraborty A, *et al.* (1998) Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth *In vitro*. *Journal of Clinical Investigation* **102**, 1385-1392.
- Greco SJ, Rameshwar P (2007) MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15484-15489.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews* **78**, 783-809.
- Gritti A, Parati EA, Cova L, *et al.* (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *Journal of Neuroscience*. **16**, 1091-1100.
- Gronthos S, Franklin D, Leddy H, *et al.* (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* **189**, 54-63.
- Hammerstedt RH, Graham JK (1992) Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* **29**, 26-38.
- Han B, Bischof JC (2004) Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology* **48**, 8-21.
- Hanks J (2001) Conservation strategies for Africa's large mammals. *Reproduction, Fertility and Development* **13**, 459-468.
- Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, *et al.* (1989) Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *Journal of Experimental Medicine* **170**, 1595-1608.
- Hao Y, Wax D, Zhong Z, *et al.* (2009) Porcine Skin-Derived Stem Cells Can Serve as Donor Cells for Nuclear Transfer. *Cloning and Stem Cells* **11**, 101-110.
- Haynesworth S, Baber M, Caplan A (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* **13**, 69-80.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, *et al.* (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemistry Journal* **334**, 297-314.
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, *et al.* (2004) Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science* **117**, 4411-4422.
- Hidetaka H, Cassandra L, Yih Jyh L, *et al.* (2008) *In vitro* investigation of pig cells for resistance to human antibody-mediated rejection. *Transplant International* **21**, 1163-1174.
- Hoffman LM, Carpenter MK (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **23**, 699-708.
- Holt W, Bennett P, Volobouev V (1996) Genetic resource banks in wildlife conservation. *Journal of Zoology* **238**, 531-544.
- Holt WV (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**, 3-22.
- Holt WV (2008) Cryobiology, wildlife conservation and reality. *Cryoletters* **29**, 43-52.
- Holt WV, Pickard AR (1999) Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of Reproduction* **4**, 143-150.

- Hoogduijn MJ, Gorjup E, Genever PG (2006) Comparative Characterization of Hair Follicle Dermal Stem Cells and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development* **15**, 49-60.
- Houbaviiy HB, Murray MF, Sharp PA (2003) Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs. *Developmental Cell* **5**, 351-358.
- Hubel A. (1997) Parameters of Cell Freezing: Implications for the Cryopreservation of Stem Cells. *Transfusion Medicine Reviews* **11**, 224-233.
- Hulspas R, Quesenberry P (2000) Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* **40**, 245-250.
- Hunter J, Savin J, Dahl M (1995) *Clinical Dermatology* Blackwell Science, Oxford.
- in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, *et al.* (2003) Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* **88**, 845-852.
- Iohara K, Zheng L, Ito M, *et al.* (2006) Side Population Cells Isolated from Porcine Dental Pulp Tissue with Self-Renewal and Multipotency for Dentinogenesis, Chondrogenesis, Adipogenesis, and Neurogenesis. *Stem Cells* **24**, 2493-2503.
- Ip JE, Wu Y, Huang J, *et al.* (2007) Mesenchymal Stem Cells Use Integrin beta1 Not CXC Chemokine Receptor 4 for Myocardial Migration and Engraftment. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 2873-2882.
- Iwama A, Oguro H, Negishi M, *et al.* (2004) Enhanced Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells Mediated by the Polycomb Gene Product Bmi-1. *Immunity* **21**, 843-851.
- Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14482-14486.
- Jacobs JLL, Kieboom K, Marino S, *et al.* (1999a) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**, 164-168.
- Jacobs JLL, Scheijen B, Voncken J-W, *et al.* (1999b) Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes and Development* **13**, 2678-2690.
- Jahoda CAB, Whitehouse CJ, Reynolds AJ, Hole N (2003) Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Experimental Dermatology* **12**, 849-859.
- Janes SM, Lowel S, Hutter C (2002) Epidermal stem cells. *Journal of Pathology* **197**, 479-491.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* (2002a) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, *et al.* (2002b) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Experimental Hematology* **30**, 896-904.
- Jiang YQ, Pickett J, Oblinger MM (1994) Comparison of changes in [beta]-tubulin and NF gene expression in rat DRG neurons under regeneration-permissive and regeneration-prohibitive conditions. *Brain Research* **637**, 233-241.
- Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, *et al.* (2004) Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin derived stem cells. *Lancet* **364**, 172-178.
- Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, *et al.* (1999) Neural Stem Cells in the Adult Human Brain. *Experimental Cell Research* **253**, 733-736.
- John FR, Pamela AM, Vijaya GK (1998) Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF- β and FGF-2. *Glia* **22**, 202-210.

- Johnson R, Iida H, Alpers C, *et al.* (1991) Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *The Journal of Clinical Investigation* **87**.
- Johnston LA, Lacy RC (1995) Genome Resource Banking for Species Conservation: Selection of Sperm Donors. *Cryobiology* **32**, 68-77.
- Joshi CV, Enver T (2002) Plasticity revisited. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 749-755.
- Kajahn J, Gorjup E, Tiede S, *et al.* (2008) Skin-derived human adult stem cells surprisingly share many features with human pancreatic stem cells. *European Journal of Cell Biology* **87**, 39-46.
- Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2004) CD9 Is a Surface Marker on Mouse and Rat Male Germline Stem Cells. *Biology of Reproduction* **70**, 70-75.
- Kanyamibwa S (1998) Impact of war on conservation: Rwandan environment and wildlife in agony. *Biodiversity and Conservation* **7**, 1399-1406.
- Kate KT (2002) Science and the Convention on Biological Diversity. *Science* **295**, 2371-2372.
- Kate KT, Laird SA (2002) *The commercial use of biodiversity - Access to genetic resources and benefit-sharing* Earthscan Ltd, London.
- Katkov II, Kim MS, Bajpai R, *et al.* (2006) Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* **53**, 194-205.
- Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, *et al.* (2004) Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-[beta] (TGF-[beta]) facilitates cell growth. *Experimental Cell Research* **295**, 194-203.
- Keller T, Korn H, Schmid H, *et al.* (2002) *Chances and Limitations of "ex-situ" Conservation of Species and Genetic Diversity on a Global Perspective* Bundesamt für Naturschutz (BfN, Federal Agency for Nature Conservation), Bonn.
- Khan IA, Luduena RF (1996) Phosphorylation of BIII-Tubulin *Biochemistry* **35**, 3704-3711.
- Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, *et al.* (2002a) Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *NeuroReport* **13**, 1185-1188.
- Kim D, Kim C-H, Moon J-I, *et al.* (2009) Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472-476.
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, *et al.* (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646-650.
- Kim M, Turnquist H, Jackson J, *et al.* (2002b) The Multidrug Resistance Transporter ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein 1) Effluxes Hoechst 33342 and Is Overexpressed in Hematopoietic Stem Cells. *Clinical Cancer Research* **8**, 22-28.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, *et al.* (2007a) Endangered Wolves Cloned from Adult Somatic Cells. *Cloning and Stem Cells* **9**, 130-137.
- Kim Y, Yu J, Joo H, *et al.* (2007b) Role of CD9 in proliferation and proangiogenic action of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **455**, 283-296.
- Kitchens DL, Snyder EY, Gottlieb DI (1994) FGF and EGF are mitogens for immortalized neural progenitors. *Journal of Neurobiology* **25**, 797-807.
- Klassen H, Schwartz MR, Bailey AH, *et al.* (2001) Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neuroscience Letters* **312**, 180-182.
- Klug M, Soonpaa M, Koh G, Field L (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *The Journal of Clinical Investigation* **98**, 216-224

- Kogler G, Sensken S, Airey JA, *et al.* (2004) A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 123-135.
- Komitova M, Eriksson PS (2004) Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neuroscience Letters* **369**, 24-27.
- Kotoula V, Papamichos SI, Lambropoulos AF (2008) Revisiting OCT4 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Stem Cells* **26**, 290-291.
- Kruse C, Birth M, Rohwedel J, *et al.* (2004) Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Applied Physics A* **79**, 1617-1624.
- Kruse C, Bodo E, Petschnik A, *et al.* (2006) Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? *Experimental Dermatology* **15**, 794-800.
- Kuroda T, Tada M, Kubota H, *et al.* (2005) Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 2475-2485.
- Kuwabara T, Hsieh J, Nakashima K, *et al.* (2004) A Small Modulatory dsRNA Specifies the Fate of Adult Neural Stem Cells. *Cell* **116**, 779-793.
- Kuznetsov S, Friedenstein A, GehronRobey P (1997a) Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *British Journal of Haematology* **97**, 561-570.
- Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, *et al.* (1997b) Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research* **12**, 1335-1347.
- Lagaudrière-Gesbert C, Naour FL, Lebel-Binay S, *et al.* (1997) Functional Analysis of Four Tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, Suggests a Common Role in Costimulation, Cell Adhesion, and Migration: Only CD9 Upregulates HB-EGF Activity. *Cellular Immunology* **182**, 105-112.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH, *et al.* (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature Neuroscience* **6**, 21-27.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, *et al.* (2000) Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) Using Interspecies Nuclear Transfer. *Cloning* **2**, 79-90.
- Lassalle B, Bastos H, Louis JP, *et al.* (2004) 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* **131**, 479-487.
- Lee A, Kessler JD, Read T-A, *et al.* (2005) Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nature Neuroscience* **8**, 723-729.
- Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal Intermediate Filaments. *Annual Review of Neuroscience* **19**, 187-217.
- Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, *et al.* (2004a) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669-1675.
- Lee RH, Kim B, Choi I, *et al.* (2004b) Characterisation and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry* **14**, 311-324.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595.
- Lenoir M-C, Bernard BA, Pautrat G, *et al.* (1988) Outer root sheath cells of human hair follicle are able to regenerate a fully differentiated epidermis in vitro. *Developmental Biology* **130**, 610-620.

- Leon-Quinto T, Simon MA, Cadenas R, *et al.* (2009) Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal Reproduction Science* **112**, 347-361.
- Lermen D, Blömeke B, Browne R, *et al.* (2009) Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology* **18**, 1030-1033.
- Li A, SPJ, Kaur P. (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cell based on cell surface phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3902-3907.
- Liedtke S, Stephan M, Kögler G (2008) Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biological Chemistry* **389**, 845-850.
- Lin T, Chao C, Saito Si, *et al.* (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature Cell Biology* **7**, 165-171.
- Lindburg DG, Durrant BS, Millard SE, *et al.* (1993) Fertility assessment of cheetah males with poor quality semen. *Zoo Biology* **12**, 97-103.
- Lindburg DG, Fitch-Snyder H (1994) Use of behavior to evaluate reproductive problems in captive mammals. *Zoo Biology* **13**, 433-445.
- Lindvall O, Kokaia Z (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* **441**, 1094-1096.
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work. *Nature Medicine* **10**, 42-50.
- Lio P, Ptak G, Barboni B, *et al.* (2001) Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology* **19**, 962-964.
- Liu J, DeYoung SM, Zhang M, *et al.* (2005) Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metabolism* **2**, 165-177.
- Lochen T (2007) *Die völkerrechtlichen Regelungen über den Zugang zu genetischen Ressourcen* Mohr Siebeck, Tübingen.
- Locklin RM, Oreffo ROC, Triffitt JT (1999) Effects of TGF[β] and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biology International* **23**, 185-194.
- Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, *et al.* (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* **38**, 431-440.
- Loo DT, Althoen MC, Cotman CW (1994) Down regulation of nestin by TGF-[β] or serum in SFME cells accompanies differentiation into astrocytes. *NeuroReport* **5**, 1585-1588.
- Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, *et al.* (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics* **37**, 1099-1103.
- Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH (1988) Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Research* **254**, 317-330.
- Mansukhani A, Ambrosetti D, Holmes G, *et al.* (2005) Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *Journal of Cell Biology* **168**, 1065-1076.
- Mardis ER (2008) Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **9**, 387-402.
- Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ (2002) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental Hematology* **30**, 879-886.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 7634-7638.

- Martins A, Alves J, Trujillo C, *et al.* (2008) Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres. *Cytometry Part A* **73A**, 361-368.
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, *et al.* (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* **9**, 625-635.
- Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, *et al.* (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *The EMBO Journal* **18**, 4261-4269.
- McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, *et al.* (2006) Skin-Derived Precursors Generate Myelinating Schwann Cells for the Injured and Dysmyelinated Nervous System. *Journal of Neuroscience* **26**, 6651-6660.
- McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, *et al.* (2002) Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1341-1346.
- Medina R, Kataoka K, Takaishi M, *et al.* (2006) Isolation of Epithelial Stem Cells From Dermis by a Three-Dimensional Culture System. *Journal of Cellular Biochemistry* **98**, 174-184.
- Meindl S, Schmidt U, Vaculik C, *et al.* (2006) Characterization, isolation, and differentiation of murine skin cells expressing hematopoietic stem cell markers. *Journal of Leukocyte Biology* **80**, 816-826.
- Meryman H (2007) Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* **47**, 935-945.
- Meryman HT (1971) Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* **8**, 489-500.
- Meryman HT (1974) Freezing Injury and its Prevention in Living Cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **3**, 341-363.
- Millar SE (2005) An Ideal Society? Neighbors of Diverse Origins Interact to Create and Maintain Complex Mini-Organs in the Skin. *PLoS Biology* **3**, e372.
- Milosevic J, Storch A, Schwarz J (2005) Cryopreservation Does Not Affect Proliferation and Multipotency of Murine Neural Precursor Cells. *Stem Cells* **23**, 681-688.
- Mimeault M, Batra S (2008) Recent Progress on Tissue-Resident Adult Stem Cell Biology and Their Therapeutic Implications. *Stem Cell Reviews and Reports* **4**, 27-49.
- Min J-Y, Sullivan MF, Yang Y, *et al.* (2002) Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *The Annals of Thoracic Surgery* **74**, 1568-1575.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, *et al.* (2005) Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes and Development* **19**, 1432-1437.
- Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, *et al.* (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**, 962-967.
- Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ (2004) Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 700-707.
- Moore KA, Lemischka IR (2006) Stem Cells and Their Niches. *Science* **311**, 1880-1885.
- Moreels M, Vandenabeele F, Dumont D, *et al.* (2008) Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and nestin expression in reactive astrocytes in multiple sclerosis lesions: potential regulatory role of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). *Neuropathology and Applied Neurobiology* **34**, 532-546.
- Morris R, Liu Y, Marles L, *et al.* (2004) Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature Biotechnology* **22**, 411-417.
- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL (1995) The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**, 35-71.

- Muldrew K, McGann LE (1994) The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal* **66**, 532-541.
- Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, *et al.* (2006) Klf4 Cooperates with Oct3/4 and Sox2 To Activate the Lefty1 Core Promoter in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 7772-7782.
- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, *et al.* (1998) Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.
- Niwa H (2001) Molecular Mechanism to Maintain Stem cell Renewal of ES Cells. *Cell Structure And Function* **26**, 137-148.
- Niwa H (2007) How is pluripotency determined and maintained? *Development* **134**, 635-646.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I, *et al.* (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes and Development* **12**, 2048-2060.
- Niwa H, Miyazaki J-i, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* **24**, 372-376.
- Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, *et al.* (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nature Medicine* **9**, 439-447.
- Ogawa M, LaRue AC (2007) Origin of fibroblast colony-forming units. *Experimental Hematology* **35**, 1319-1320.
- Oka M, Tagoku K, Russell TL, *et al.* (2002) CD9 Is Associated with Leukemia Inhibitory Factor-mediated Maintenance of Embryonic Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 1274-1281.
- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, *et al.* (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mechanisms of Development* **59**, 89-102.
- Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, *et al.* (2005) Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 5307-5317.
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, *et al.* (1998) Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5672-5677.
- Owen M (1988) Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science. Supplement.* **10**, 63-76.
- Owens GK, Loeb A, Gordon D, *et al.* (1986) Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *Journal of Cellular Biology* **102**, 343-352.
- Paine FL, Miller JD, Crawshaw G, *et al.* (1988) Status of the Puerto Rican crested toad *Peltophryne lemur*. *International Zoo Yearbook* **28**, 53-58.
- Panchision DM, McKay RDG (2002) The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 478-487.
- Park I-K, Morrison SJ, Clarke MF (2004) Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 175-179.
- Park I-K, Qian D, Kiel M, *et al.* (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 302-305.
- Paulette A. Conget JJM (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology* **181**, 67-73.
- Peister A, Mellad JA, Larson BL, *et al.* (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* **103**, 1662-1668.
- Peled A, Zipori D, Abramsky O, *et al.* (1991) Expression of alpha-smooth muscle actin in murine bone marrow stromal cells. *Blood* **78**, 304-309.

- Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, *et al.* (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3156-3161.
- Pera MF, Reubinoff B, Trounson A (2000) Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* **113**, 5-10.
- Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair Current Views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902.
- Piper DR, Mujtaba T, Rao MS, *et al.* (2000) Immunocytochemical and Physiological Characterization of a Population of Cultured Human Neural Precursors. *Journal of Neurophysiology* **84**, 534-548.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **284**, 143-147.
- Pittenger MF, Martin BJ (2004) Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circulation Research* **95**, 9-20.
- Planat-Benard V, Menard C, Andre M, *et al.* (2004) Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells. *Circulation Research* **94**, 223-229.
- Plucknett DL, Horne ME (1992) Conservation of genetic resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **42**, 75-92.
- Potten C, Loeffler M (1987) Epidermal cell proliferation. I. Changes with time in the proportion of isolated, paired and clustered labelled cells in sheets of murine epidermis, *Virchows Archive. B Cell Pathology Inclusive Molecular Pathology* **53**, 279-285.
- Potten CS, Hendry JH (1973) Clonogenic cells and stem cells in epidermis. *International Journal of Radiation Biology* **24**, 537-540.
- Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020.
- Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. (Cover story). *Science* **276**, 71.
- Ptak G, Clinton M, Barboni B, *et al.* (2002) Preservation of the Wild European Mouflon: The First Example of Genetic Management Using a Complete Program of Reproductive Biotechnologies. *Biology of Reproduction* **66**, 796-801.
- Pukazhenthi B, Laroe D, Crosier A, *et al.* (2006) Challenges in cryopreservation of clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa. *Theriogenology* **66**, 1790-1796.
- Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, *et al.* (2002) Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *Journal of Cell Biology* **157**, 851-864.
- Ramírez-Zacarias JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry and Cell Biology* **97**, 493-497.
- Ramsay TG, Yan X, Morrison C (1998) The obesity gene in swine: sequence and expression of porcine leptin. *Journal of Animal Science* **76**, 484-490.
- Raz R, Lee C-K, Cannizzaro LA, *et al.* (1999a) Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2846-2851.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, *et al.* (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, *et al.* (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615-2625.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-1710.

- Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, *et al.* (2001) Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* **412**, 736-739.
- Ringe J, Kaps C, Schmitt B, *et al.* (2002) Porcine mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Research* **307**, 321-327.
- Robertson E (1987) Embryo-derived stem cell lines. In: *Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach* (ed. Robertson E), pp. 71-112, Oxford.
- Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, *et al.* (2005) Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry*, **280**:24731-24737
- Rodriguez A-M, Pisani D, Dechesne CA, *et al.* (2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 1397-1405.
- Rogelj S, Klagsbrun M, Atzmon R, *et al.* (1989) Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *Journal of Cell Biology* **109**, 823-831.
- Roldan ERS, Gomendio M, Garde JJ, *et al.* (2006) Inbreeding and Reproduction in Endangered Ungulates: Preservation of Genetic Variation through the Organization of Genetic Resource Banks. *Reproduction in Domestic Animals* **41**, 82-92.
- Roskams AJI, Cai X, Ronnett GV (1998) Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience* **83**, 191-200.
- Ross R (1987) Platelet-Derived Growth Factor. *Annual Review of Medicine* **38**, 71-79.
- Roy NS, Wang S, Jiang L, *et al.* (2000) In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nature Medicine* **6**, 271 - 277
- Rubinstein E, Naour FL, Billard M, *et al.* (1994) CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *European Journal of Immunology* **24**, 3005-3013.
- Rubinstein E, Naour FL, Lagaudrière-Gesbert C, *et al.* (1996) CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *European Journal of Immunology* **26**, 2657-2665.
- Rydel RE, Greene LA (1987) Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *Journal of Neuroscience* **7**, 3639-3653.
- Ryder OA (1995) Zoological Parks and the Conservation of Biological Diversity: Linking ex situ and in situ Conservation Efforts. *The Journal of Environment Development* **4**, 105-120.
- Ryder OA, McLaren A, Brenner S, *et al.* (2000) DNA Banks for Endangered Animal Species. *Science* **288**, 275-277.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al.* (2000) Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro. *Experimental Neurology* **164**, 247-256.
- Sands P (2003) *Principles of International Environmental Law* 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sangiorgi E, Capecchi MR (2008) Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics* **40**, 915-920.
- Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99**, 507-512.
- Schiewe MC, Hollifield VM, KAsbohm LA, *et al.* (1995) Embryo Importation and Cryobanking Strategies for Laboratory Animals and Wildlife Species. *Theriogenology* **43**, 97-104.
- Schmoeckel M, Bhatti FNK, Zaidi A, *et al.* (1998) Orthotopic Heart Transplantation in A Transgenic Pig-To-Primate Model1. *Transplantation* **65**, 1570-1577.

- Schwartz PH, Nethercott H, Kirov II, *et al.* (2005) Expression of Neurodevelopmental Markers by Cultured Porcine Neural Precursor Cells. *Stem Cells* **23**, 1286-1294.
- Shendure J (2008) The beginning of the end for microarrays? *Nature Methods* **5**, 585-587.
- Shi C-M, Cheng T-M (2004) Differentiation of dermis-derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology* **10**, 2550-2552.
- Shi Y, Despons C, Do JT, *et al.* (2008) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds. *Cell Stem Cell* **3**, 568-574.
- Shigeki I, Shigeki H, Koji H, *et al.* (1997) Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *Journal of Cellular Physiology* **171**, 291-298.
- Shih DT-b, Lee D-C, Chen S-C, *et al.* (2005) Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. *Stem Cells* **23**, 1012-1020.
- Simon G, Maibach H (2000) The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **13**, 229-234.
- Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, *et al.* (1989) Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **37**, 315-321.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, *et al.* (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, *et al.* (2006) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE* **1**, e79.
- Spranger T (2008) *Rechtliche Rahmenbedingungen für Access and Benefit Sharing Systeme* IWE, Bonn.
- Stemple DL, Mahanthappa NK, Anderson DJ (1988) Basic FGF induces neuronal differentiation, cell division, and NGF dependence in chromaffin cells: A sequence of events in sympathetic development. *Neuron* **1**, 517-525.
- Stojkovic M, Lako M, Strachan T, *et al.* (2004) Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* **128**, 259-267.
- Stoll P-T (2004) Genetische Ressourcen, Zugang und Vorteilsteilhabe. In: *Zehn Jahre Übereinkommen über die biologische Vielfalt* (eds. Köck W, Wolff N), p. 191. Nomos Baden-Baden.
- Summer R, Kotton DN, Sun X, *et al.* (2003) Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **285**, L97-104.
- Supplie J (2000) Ex-situ collections acquired prior to the entry into force of the CBD In: *European Workshop on Genetic Resources Issues and Related Aspects - Access and Benefit sharing, Intellectual Property Rights, Ex-Situ Collections* (eds. Wolfrum R, Stoll P-T). Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt), Berlin.
- Svendsen CN, Fawcett JW, Bentlage C, *et al.* (1995) Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Experimental Brain Research* **102**, 407-414.
- Tai M-H, Chang C-C, Olson LK, *et al.* (2005) Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**, 495-502.
- Tai XG, Yashiro Y, Abe R, *et al.* (1996) A role for CD9 molecules in T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 753-758.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663-676.

- Takeda K, Noguchi K, Shi W, *et al.* (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3801-3804.
- Talbot N, Powell A, Garrett W (2002) Spontaneous differentiation of porcine and bovine embryonic stem cells (Epiblast) into astrocytes or neurons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **38**, 191-197.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, *et al.* (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**, 1124-1128.
- Thibier M (1998) The 1997 embryo transfer statistics from around the world. *IETS Embryo Transfer Newsletter* **16**.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, *et al.* (1995) Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7844-7848.
- Till J, McCulloch E (1961) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* **14**, 213-222
- Toma J, Akhavan M, Fernandes K, *et al.* (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology* **3**, 778-784.
- Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, *et al.* (2005) Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. *Stem Cells* **23**, 727-737.
- Tomioaka M, Nishimoto M, Miyagi S, *et al.* (2002) Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nuclear Acids Research* **30**, 3202-3213.
- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, *et al.* (2004) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* **72**, 319-326.
- Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, *et al.* (2004) Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Experimental Cell Research* **295**, 79-90.
- Tropel P, Noël D, Platet N, *et al.* (2004) Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental Cell Research* **295**, 395-406.
- Tropepe V, Sibilina M, Ciruna BG, *et al.* (1999) Distinct Neural Stem Cells Proliferate in Response to EGF and FGF in the Developing Mouse Telencephalon. *Developmental Biology* **208**, 166-188.
- Trujillo C, Schwindt T, Martins A, *et al.* (2009) Novel perspectives of neural stem cell differentiation: From neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry Part A* **75A**, 38-53.
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, *et al.* (2004) Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* **303**, 359-363.
- Uchida S, Yokoo S, Yanagi Y, *et al.* (2005) Sphere Formation and Expression of Neural Proteins by Human Corneal Stromal Cells In Vitro. *Investigative. Ophthalmology and Visual Science* **46**, 1620-1625.
- Ursing B, Arnason U (1998) The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Pig (*Sus scrofa*). *Journal of Molecular Evolution* **47**, 302-306.
- Vallier L, Alexander M, Pedersen RA (2005) Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* **118**, 4495-4509.
- Villa A, Snyder EY, Vescovi A, *et al.* (2000) Establishment and Properties of a Growth Factor-Dependent, Perpetual Neural Stem Cell Line from the Human CNS. *Experimental Neurology* **161**, 67-84.
- Wagers AJ, Weissman IL (2004) Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* **116**, 639-648.

- Wang G, Zhang H, Zhao Y, *et al.* (2005) Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**, 934-942.
- Watson PF, Holt WV (2001) *Cryobanking the Genetic Resources. Wildlife conservation for the future?* Taylor & Francis, London, New York.
- Watt FM, Celso CL, Silva-Vargas V (2006) Epidermal stem cells: an update. *Current Opinion in Genetics & Development* **16**, 518-524.
- WAZA (2005) *Zoos und Aquarien für Naturschutz - Die Welt-Zoo- und Aquarium-Naturschutzstrategie* WAZA, Bern.
- Weerth C (2008) *Das neue europäische Artenschutzrecht, CITES und die Umsetzung durch die Zollverwaltung in Deutschland* Umweltstiftung WWF-Deutschland und TRAFFIC Europe-Germany, Frankfurt am Main, http://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/pdf_neu/CITES_und_Zollverwaltung_in_Deutschland_06.pdf (Zugriff 28.01.2009).
- Wen Y, Quintero R, Chen B, *et al.* (2007) Expression of CD9 in frozen-thawed mouse oocytes: preliminary experience. *Fertility and Sterility* **88**, 526-529.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, *et al.* (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-324.
- Wexler S, Donaldson C, Denning-Kendall P, *et al.* (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology* **121**, 368-374.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, *et al.* (2004) Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 2510-2522.
- Wildt D (2000) Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. *ILAR Journal* **41**, 228-234.
- Wildt D, Rall W, Critser J, *et al.* (1997) Genome Resource Banks: Living Collections for Biodiversity Conservation. *Bioscience* **47**, 689-698.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, *et al.* (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687.
- Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, *et al.* (2005) Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. *Stem Cells* **23**, 392-402.
- Witte P, Wolffgang H-M (1998) *Lehrbuch des europäischen Zollrechts*, 3. Auflage edn., Herne/Berlin.
- Wobus AM, Boheler KR (2005) Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiological Reviews* **85**, 635-678.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jäkel P, *et al.* (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Experimental Cell Research* **152**, 212-219.
- Wolfrum R (2004) Volkerrechtlicher Rahmen für die Erhaltung der Biodiversität. In: *Zehn Jahre Übereinkommen über die biologische Vielfalt* (eds. Köck W, Wolff N), p. 191. Nomos Baden-Baden.
- Woodbury D, Kramer BC, Reynolds K, *et al.* (2006) Long-term cryopreserved amniocytes retain proliferative capacity and differentiate to ectodermal and mesodermal derivatives in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **73**, 1463-1472.
- Woodbury D, Schwarz E, Prockop D, Black I (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research* **61**, 364-370.
- World Resources Institute, The World Conservation Union (IUCN), United Nations Environment Programme (UNEP) in consultation with the Food and Agriculture Organization (FAO) and the United Nations Education, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) (1992) *Global Biodiversity Strategy: Guidelines for action*

- to save, study and use Earth's biotic wealth sustainably and equitably, http://pdf.wri.org/globalbiodiversitystrategy_intro.pdf, Stand: 19.02.2009.
- Wren D, Wolswijk G, Noble M (1992) In vitro analysis of the origin and maintenance of O-2Aadult progenitor cells. *Journal of Cell Biology* **116**, 167-176.
- Wu A, Till J, Siminovitch L, *et al.* (1967) A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *Journal of Cellular Physiology* **69**, 177-184.
- Wu AM, Till JE, Siminovitch L, *et al.* (1968) Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *Journal of Experimental Medicine* **127**, 455-464.
- Xu C, Rosler E, Jiang J, *et al.* (2005) Basic Fibroblast Growth Factor Supports Undifferentiated Human Embryonic Stem Cell Growth Without Conditioned Medium. *Stem Cells* **23**, 315-323.
- Xue T, Qiao L, Qiu J, *et al.* (2008) Proliferation, multipotency and neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from the olfactory neuroepithelium of the adult rat. *Cell Biology International* **32**, 950-958.
- Ying X, Qiang Z, Bing-bing J, *et al.* (2007) Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Zhejiang University - Science B* **8**, 136-146.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, *et al.* (2001) Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical Record* **264**, 51-62.
- Yu H, Fang D, Kumar SM, *et al.* (2006) Isolation of a Novel Population of Multipotent Adult Stem Cells from Human Hair Follicles. *American Journal of Pathology* **168**, 1879-1888.
- Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, *et al.* (1998) Life-Supporting Pig-To-Primate Renal Xenotransplantation Using Genetically Modified Donors. *Transplantation* **65**, 1584-1590.
- Zangrossi S, Marabese M, Broggin M, *et al.* (2007) Oct-4 Expression in Adult Human Differentiated Cells Challenges Its Role as a Pure Stem Cell Marker. *Stem Cells* **25**, 1675-1680.
- Zeng L, Rahrman E, Hu Q, *et al.* (2006) Multipotent Adult Progenitor Cells from Swine Bone Marrow. *Stem Cells* **24**, 2355-2366.
- Zhang S-C, Wernig M, Duncan ID, *et al.* (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **19**, 1129-1133.
- Zhao M, Isom SC, Lin H, *et al.* (2009) Tracing the Stemness of Porcine Skin-Derived Progenitors (pSKP) Back to Specific Marker Gene Expression. *Cloning and Stem Cells* **11**, 111-122.
- Zhao Z, Liao L, Cao Y, *et al.* (2005) Establishment and properties of fetal dermis-derived mesenchymal stem cell lines: plasticity in vitro and hematopoietic protection in vivo. *Bone Marrow Transplant* **36**, 355-365.
- Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, *et al.* (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 12339-12344.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, *et al.* (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine* **7**, 1028-1034.

- Zhu H, Craig JA, Dyce PW, *et al.* (2004) Embryos Derived from Porcine Skin-Derived Stem Cells Exhibit Enhanced Preimplantation Development. *Biology of Reproduction* **71**, 1890-1897.
- Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, *et al.* (2006) The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix. *Stem Cells* **24**, 928-935.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, *et al.* (2002) Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 4279-4295.

Verwendete Gesetzestexte:

Bekanntmachung des BMU (im Einvernehmen mit dem BMF) vom 22. Mai 1997 (BAnz. 1997 Nr. 106), in der jeweils aktuellen Fassung; Eingearbeitet in das Dienststellenverzeichnis, abgedruckt unter VSF O 3930.

Bonn Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of the Benefits Arising out of their Utilization. The Secretariat of the Convention on Biological Diversity. <http://www.cbd.int/doc/publications/cbd-bonn-gdls-en.pdf>, Zugriff 26.02.2009

Conference of the Parties 6, Decision VI/26: Strategic Plan for the Convention on Biological Diversity, <http://www.cbd.int/decision/cop/?id=7200>, Zugriff: 05.01.2009

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES, vom 03.03.1975, BGBl II, S. 773

Convention Relative to the Preservation of Fauna and Flora in their Natural State, 1933, 172 LNTS, 241.

FFH-Richtlinie 92/43/EWG: Richtlinie 92/43/EWG des Rates vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen. ABl. L 206 vom 22.07.1992, S.7

Gesetz über Naturschutz und Landschaftspflege (Bundesnaturschutzgesetz, BNatSchG) BGBl. I S. 1193, zuletzt geändert durch Artikel 3 der Gesetzes vom 22. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2986)

Gesetz zu dem Übereinkommen vom 3. März 1973 über den internationalen Handel mit gefährdeten Tierarten und Pflanzen (Gesetz zum Washingtoner Artenschutzübereinkommen), BGBl. 1975 II S. 773.

Report of the second Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity; UNEP/CBD/COP/2/13 <http://www.cbd.int/doc/meetings/cop/cop-02/official/cop-02-13-en.pdf>, Zugriff 26.02.2009

Resolution of the fifth Conference of the Parties, 1985, Conf. 5.10, <http://www.cites.org/eng/res/05/05-10.shtml>, Zugriff: 10.02.2009

Richtlinie 86/609/EWG des Rates vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, ABl. Nr L 358 vom 18.12.1986, S.1

Verordnung (EG) Nr. 338/97 des Rates vom 9. Dezember 1996 über den Schutz von Exemplaren wildlebender Tier- und Pflanzenarten durch Überwachung des Handels, ABl L 61 vom 03.03.1997, S.1

Verordnung (EG) Nr. 865/2006 der Kommission vom 4. Mai 2006 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 338/97 des Rates über den Schutz von Exemplaren wild lebender Tier- und Pflanzenarten durch Überwachung des Handels, ABl L166 vom 19.06.2001, S.1

Verordnung (EWG) Nr. 3626/82 des Rates vom 3. Dezember 1982 zur Anwendung des Übereinkommens über den internationalen Handel mit gefährdeten Arten freilebender Tiere und Pflanzen in der Gemeinschaft, ABl L 384 vom 31/12/1982 S. 0001 - 0061

Verordnung zum Schutz wildlebender Tier- und Pflanzenarten (Bundesartenschutzverordnung, BArtSchV) BGBl. I S. 258 (896), geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 12. Dezember 2007 (BGBl. I S.2873)

Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft, in der Fassung vom 02.10.1997, zuletzt geändert durch den Vertrag über den Beitritt der Republik Bulgarien und Rumäniens zur Europäischen Union vom 25.4.2005, ABl. EG Nr. L 157/11

Vogelschutz-Richtlinie 79/409/EWG: Richtlinie des Rates vom 2. April 1979 über die Erhaltung der wildlebenden Vogelarten 79/409/EWG, ABl. L 103 vom 25.04.1979, S.1

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel "Isolation, Charakterisierung, Differenzierung und Kryokonservierung adulter Stammzellen aus der Haut am Modell *Sus scrofa domestica* – Naturwissenschaftliche und juristische Implikationen zum Betrieb einer Genbank als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität" selbstständig von mir verfasst wurde und bisher weder im Ganzen noch in Teilen in dieser Fakultät oder in einer anderen akademischen Institution eingereicht worden ist.

Ort, Datum

Dominik Lermen

Lebenslauf

Name: Lermen

Vorname: Dominik

Geburtstag: 26.06.1978

Geburtsort: St. Wendel; Saarland; Deutschland

Nationalität: Deutsch

Abitur: 26.06.1998, Cusanus Gymnasium St. Wendel

Zivildienst: 1998 - 1999, Hospital St. Wendel

Studium: 1999 - 2005: Universität Trier
Angewandte Umweltwissenschaften;
Hauptfächer: Biogeographie, Geologie
Nebenfächer: Geobotanik, Klimatologie
Begleitstudium: Kulturanthropologie

2001: Diplomzwischenprüfung

12.2005: Diplom in "Angewandte Umweltwissenschaften" mit Auszeichnung

Thema der Diplomarbeit: Über den Einsatz von Laufkäferzönosen als Indikator für Lebensraumzustände und Lebensraumveränderungen

Studentischer Mitarbeiter: 2001-2005: Umweltprobenbank des Bundes, Projekt des Bundesumweltamtes, Universität Trier, Fachbereich VI, Fach: Biogeographie

Praktika: 03.-05.2003: Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung. Sektion: Paleoklima von Meeres-sedimenten. Referenzen: Dr. Reiner Gersonde, Dr. Gerhard Kuhn

- 03.-05.2004: Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft, Birmensdorf/Zürich (CH).
Project: Biodiversity on mountaintops, historical vs. current patterns. Referenz: Dr. Thomas Wohlgemuth
- Wissenschaftlicher Mitarbeiter: 06.-10.2006: Universität Trier, Fachbereich VI, Fach: Biogeographie
- Promotionsstudent: ab 10.2006: Universität Trier, Fachbereich VI, Fach: Biogeographie
- Stipendiat im Graduiertenkolleg "Verbesserung von Normsetzung und Normanwendung im integrierten Umweltschutz durch rechts- und naturwissenschaftliche Kooperation" der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
- Thema der Dissertation: Isolation, Charakterisierung, Differenzierung und Kryokonservierung adulter Stammzellen aus der Haut am Modell *Sus scrofa domestica* – Naturwissenschaftliche und juristische Implikationen zum Betrieb einer Genbank als Beitrag zur Sicherung der genetischen Diversität.
- Betreuung: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller, Prof. Dr. Reinhard Hendler
- Forschungsaufenthalte: 21.-24.11.2006: Fraunhofer Einrichtung für marine Biotechnologie, Abteilung: Zelldifferenzierung und Zelltechnologie, Universität Lübeck. Thema: Isolierung adulter pluripotenter Stammzellen aus dem Rattenpankreas. Referenz: Prof. Dr. Charlie Kruse
- 27.11.-22.12.2006: GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Abteilung Humangenetik. München. Referenz: Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis
- 07.02.-09.03.2007: CRES - Conservation and Research for Endangered Species, Zoologische Gesellschaft San Diego, San Diego, Kalifornien, USA. Abteilung Genetik, Frozen Zoo. Referenz: Prof. Dr. Oliver A. Ryder

Organisierte Workshops: International Workshop on BioCryoBanks - Perspectives and Possibilities for Wildlife Conservation, Trier, 18.-20. Juni 2008. Unterstützt durch WAZA, Zoologische Gesellschaft Nordenglands (Chester Zoo), Game Conservancy Deutschland, Nikolaus Koch Stiftung und Freundeskreis der Universität Trier.

Im DFG Graduiertenkolleg zum Thema "Regenerative Energien" und „Der Begriff *Erheblichkeit* im Rahmen von Eingriffen in die Natur“ Trier, 25.-26. September 2008.

Sonstiges: Seit Juli 2008 Mitglied des „Amphibian Ark Biobanking Advisory Committees (ABAC)“ (www.amphibianark.org).

Publikationen

D. Lermen, B. Blömeke, R. Browne, A. Clarke, P.W. Dyce, T. Fixemer, G.R. Fuhr, W.V. Holt, K. Jewgenow, R.E. Lloyd, S. Lötters, M. Paulus, G. Reid, D.H. Rapoport, D. Rawson, J. Ringleb, O.A. Ryder, G. Spörl, T. Schmitt, M. Veith and P. Müller (2009): Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology* 18: 1030-1033

D. Lermen, E. Gorjup, P.W. Dyce, H. von Briesen and P. Müller (2010): Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cell-like cells. *PLoS ONE* 5(1): e8968. doi10.1371/journal.pone.0008968.

Vorträge

D. Lermen:

"Isolation, Characterisation, and Cryoconservation of potential Adult Skin derived Stem Cells - From the Animal to the Ark". International Workshop on BioCryoBanks. Trier, 19. Juni 2008.

D. Lermen:

"Kryokonservierung und Artenschutz - Wildtiererhaltung der Zukunft?" - Deutsche Kälte-Klima-Tagung, Ulm, 19.-21. November 2008.