

„Aufklärung heißt, gegen sich selbst andenken,
gegen alles was zu einfach ist, gegen das
warme Bauchgefühl, das man bekommt, wenn
man will, dass etwas wahr ist. Es heißt
Gedanken konsequent zu Ende zu denken,
auch wenn sie einem nicht geheuer sind.“

Philipp Blom in Burg, Das Burgtheater Magazin, Okt/Nov 15

Als wichtige Teile der Aufklärung gilt dies auch für Forschung und Lehre.

Vorlesung Embryonen und Stammzellforschung I im WS 2015

1.

Die Eigenschaften von Stammzellen und
ihre Abgrenzung von somatischen Zellen

1.1. Selbsterneuerungsfähigkeit (self renewal (SR) capacity) und Klonalität, Klonierbarkeit (clonality)

SR= nicht endend wollende Teilung* zu Tochterzellen (TZ) mit identischen Eigenschaften (Potenzial) wie Mutterzelle (MZ).

*Derzeit existieren Stammzellen mit Passagen > 150.

Somatische Zellen werden spätestens bei Passage 80 Seneszent (Hayflick limit)

Klonalität = Fähigkeit als einzelne Zelle zu überleben, sich zu vermehren, und den Mutterphänotyp zu erhalten.

(In vivo sind bei den Stammzellen wohl immer Helfer- oder Nischenzellen notwendig dabei.

→ Siehe Stammzellnischen)

1.2. Ruhezustand (dormancy, hibernation, quiescence) Stammzellen überleben auch ohne Teilung

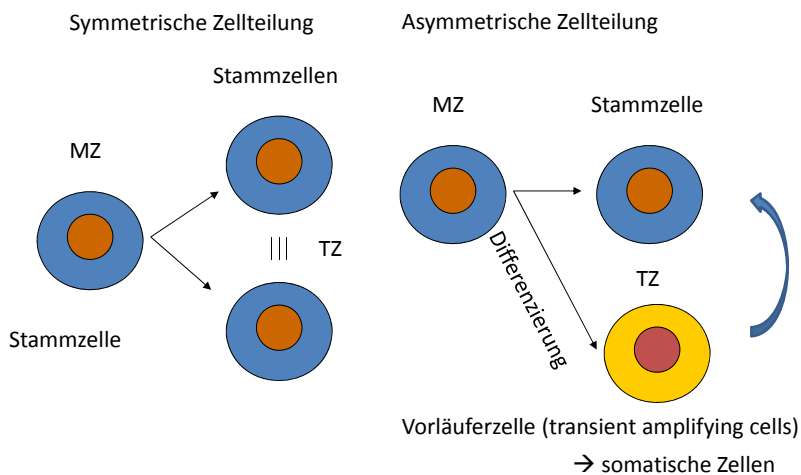
1.3. Differenzierungspotenzial (potency of differentiation) = Anzahl der Möglichkeiten in somatische Zellen zu differenzieren.

Dazu kommt die Differenzierungskontrolle mit sehr große Unterschiede bei den verschiedenen Stammzellarten.

- 1.1.1. Symmetrische versus asymmetrische Zellteilung
- 1.1.2. Klonalität von Stammzellen
- 1.1.3. Nischen bedingte Asymmetrie
- 1.1.4. Asymmetrische DNA Verteilung

1.1. Selbsterneuerungsfähigkeit von Stammzellen

1.1.1. Symmetrische versus asymmetrische Zellteilung



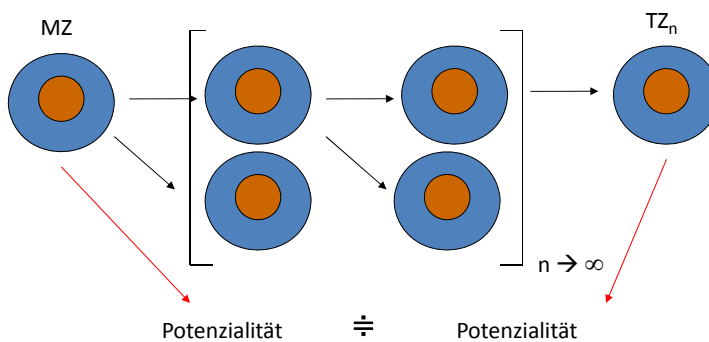
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN



5

1.1.2. Klonalität von Stammzellen



Wenn eine Zelllinie klonal ist, muss die **Potenzialität** von MZ und TZ_n identisch sein.

Nachweis der gleichen Potenzialität:

- Herstellung von Chimären
- Tetraploidaggregation
- In vitro Differenzierung, Teratome

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN



6

Stochastische Genexpression führt zum Kontingenzproblem



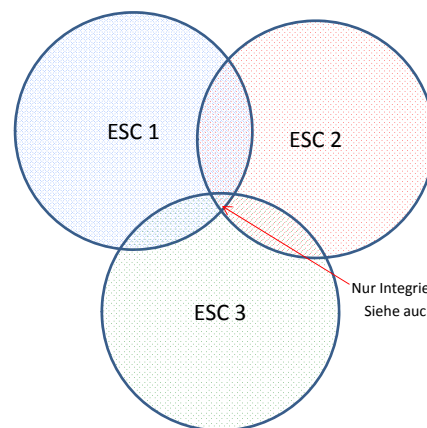
Worin liegt der Abgrenzung zwischen asymmetrischer Zellteilung
und stochastischer Genexpression?



Was ist eine Stammzelllinie?

Aus einer Zelle gewonnene stabile klonale Zellpopulation mit identischen Eigenschaften.

Expressionsräume von ähnlichen Stammzelllinien unterscheiden sich sehr stark

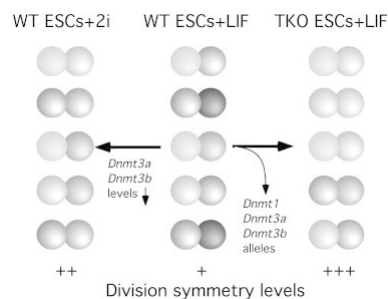


Stochastische Genexpression
kann auch als Phänomen der
Natur-immanenten Kontingenz
betrachtet werden!
→ Siehe auch „Ethik“

Nur Integrien 6 alpha war gemeinsam exprimiert → ???
Siehe auch Fortunel et al., 2003 Science, 302, 393b.

Gibt es überhaupt Genom-weite Gemeinsamkeiten
zwischen verschiedenen Arten von Stammzellen?

Symmetrischen Stammzellteilung und stochastische Genexpression:



Aus:
[Stem Cell Reports. 2013 Oct 15; 1\(4\): 360-369.](#)
 Published online 2013 Sep 26. doi: [10.1016/j.stemcr.2013.08.005](#)

Unterschiedliche Graustufen geben unterschiedliche Genexpression von 48 getesteten mRNAs wieder.

Dnmt = Denovo DANN Methyl transferase

LIF = Leukemia Inhibitory Factor (ein Cytokin der Interleukin 6 (IL6) Familie.

2i = 2 Inhibitoren die FGF, LIF und Wnt signaling beeinflussen. (siehe auch nächste Seite und Kapitel 1.1.4.)

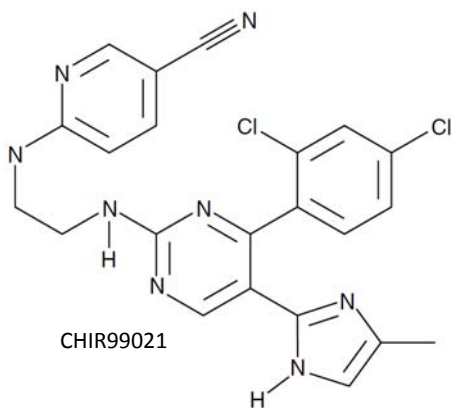
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



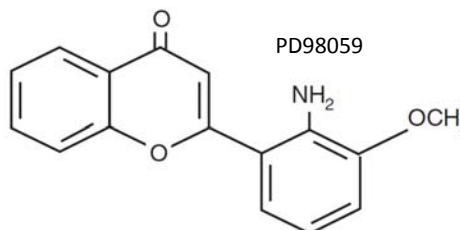
9

Komponenten des 2i Mediums:



A Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) Inhibitor mimicking Wnt signaling by activating the translocation of β -catenin into the nucleus of cells.

CHIR99021 (CAS 252917-06-9)



A Mitogen-activated-Protein Kinase Kinase (MEK) inhibitor which prevents phosphorylation and nuclear localisation of Extracellular-Signal-Related-Kinases (ERK1/2), thus inhibiting differentiation promoting signals such as FGF4.

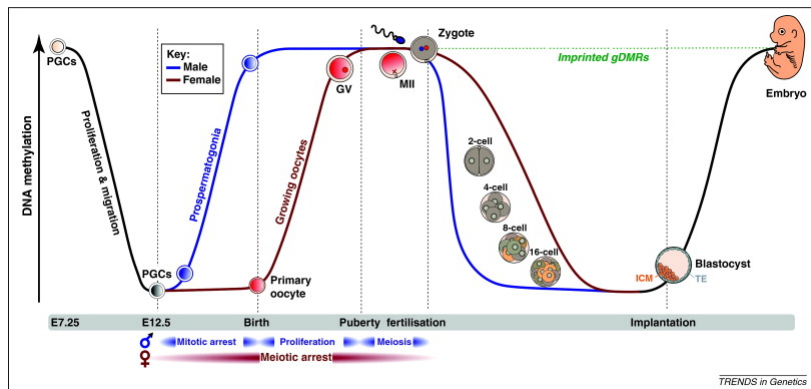
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



10

Ad: De novo DNA Methylation während der frühen Embryogenese



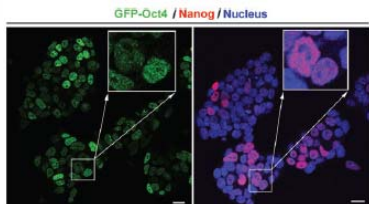
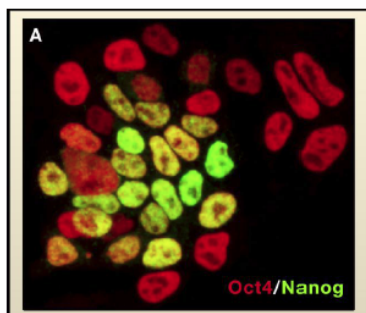
Aus: [De novo DNA methylation: a germ cell perspective.](#)
 Smallwood SA, Kelsey G.
 Trends Genet. 2012 Jan;28(1):33-42. doi: 10.1016/j.tig.2011.09.004.

Georg Weitzer



11

Ist der Expressionsraum in Stammzellen eine Tabula rasa oder ein überreich gedeckter Tisch?



A Metastable Coalition

The transcription factor Nanog secures self-renewal of ES cells, and cell-to-cell variation creates the possibility for differentiation. (A) Embryonic stem (ES) cells are heterogeneous. Immunostaining shows highly variable levels of Nanog protein in Oct4-positive undifferentiated ES cells. (B) In our model, lineage-associated transcriptional circuits (A, B, and C) are maintained below threshold levels due to mutual antagonism and suppression by the three transcription factors Oct4, Sox2, and Nanog. A destabilized transitional state arises when downregulation of Nanog coincides with increased activation of Erk. Phosphorylated Erk (pErk) may activate inductive signaling pathways or directly promote lineage-affiliated transcriptional networks. The fluctuations in network activities generated by pErk confer an opportunity to establish a new stable cell state. However, if Nanog levels rise before commitment is effected, the actions of pErk are neutralized, the metastable ground state is restored, and the gate is closed. Photo courtesy of J. Silva and A. Smith.

Published in: *Cell*, 2008 February 22; 132(4): 532-536.

Capturing Pluripotency

Jose Silva¹ and Austin Smith^{1*}

¹Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research and Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QR, UK.

Abstract

In this Essay, we argue that pluripotent epiblast founder cells in the embryo and embryonic stem (ES) cells in culture represent the ground state for a mammalian cell, signified by freedom from developmental specifications or epigenetic restrictions and capacity for autonomous self-replication. We speculate that cell-to-cell variation may be integral to the ES cell condition, safeguarding self-renewal while continually preventing opportunities for lineage specification.

Differentiation-Independent Fluctuation of Pluripotency-Related Transcription Factors and Other Epigenetic Markers in Embryonic Stem Cell Colonies

Gabriela S'usta'ckova¹, Son'a Legartova¹, Stanislav Kozubek, Lenka Stixova¹, Jir'i Pachern'k, and Eva Ba'rtova¹

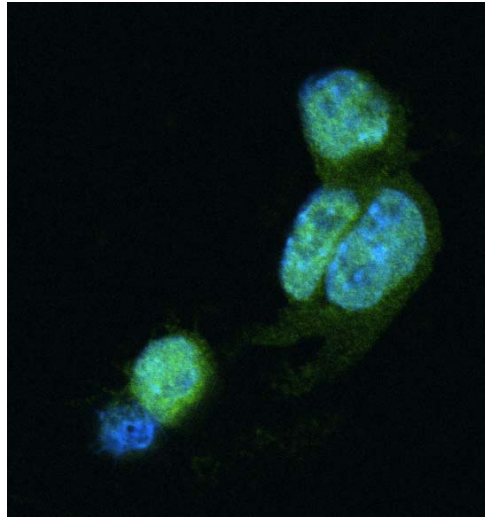
STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volume 00, Number 00, 2011 DOI: 10.1089/scd.2011.0085

Georg Weitzer



12

Asymmetrische Zellteilung oder stochastische Genexpression in einer Herzstammzellenlinie



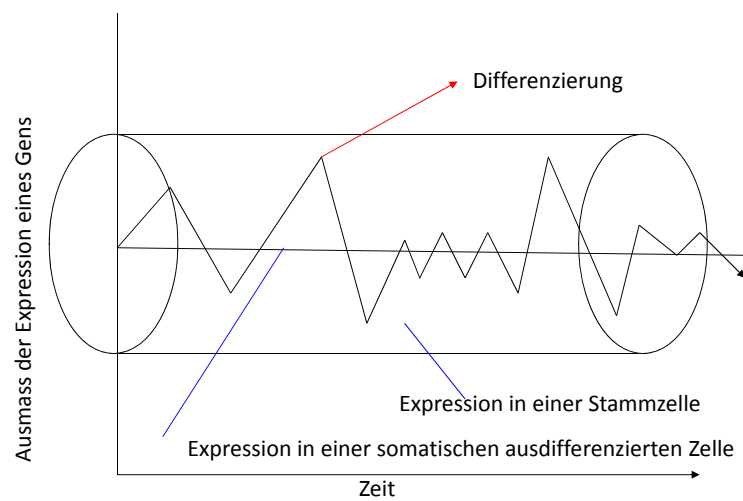
Blaue DAPI gefärbte Kerne
Grün: Oct4 Protein

Georg Weitzer



13

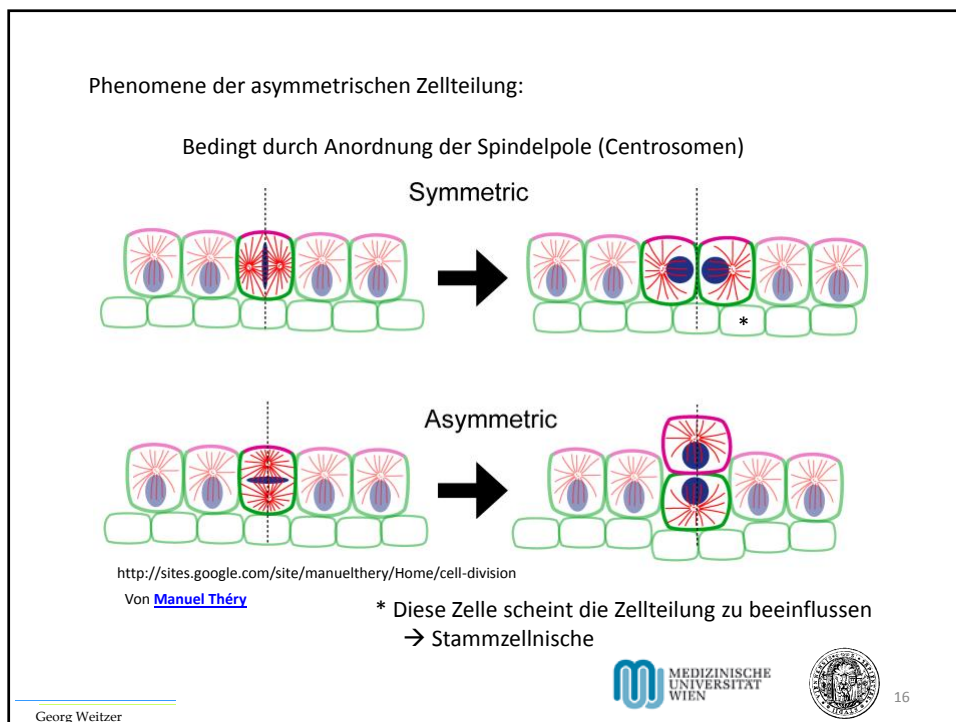
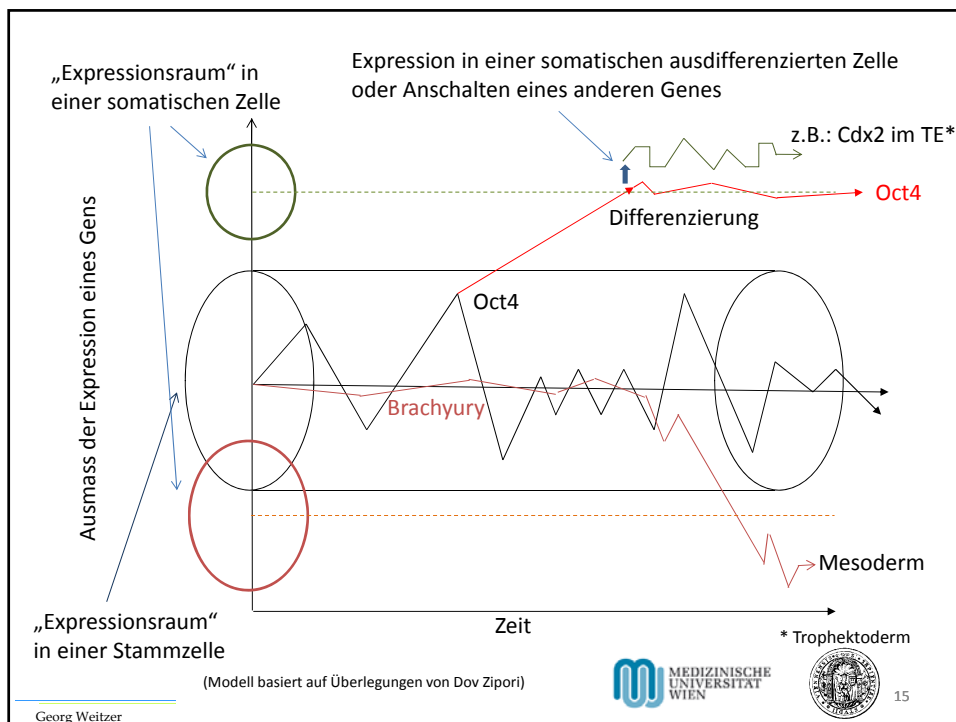
Hypothese: Der Expressionsraum von Stammzellen ist unvergleichlich größer als der von somatischen Zellen.

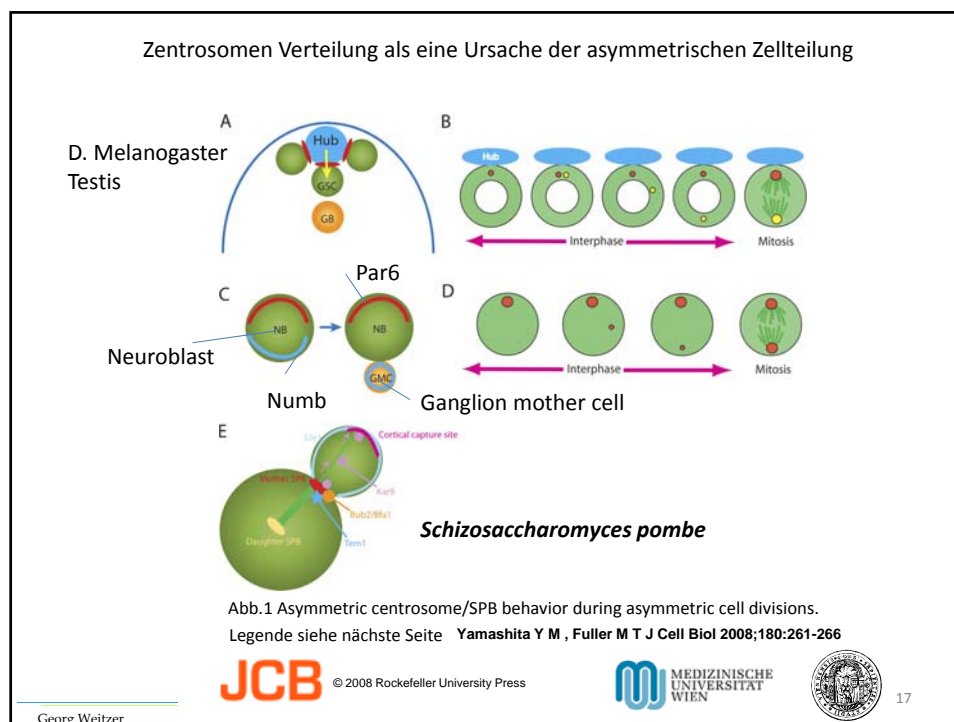


Georg Weitzer



14

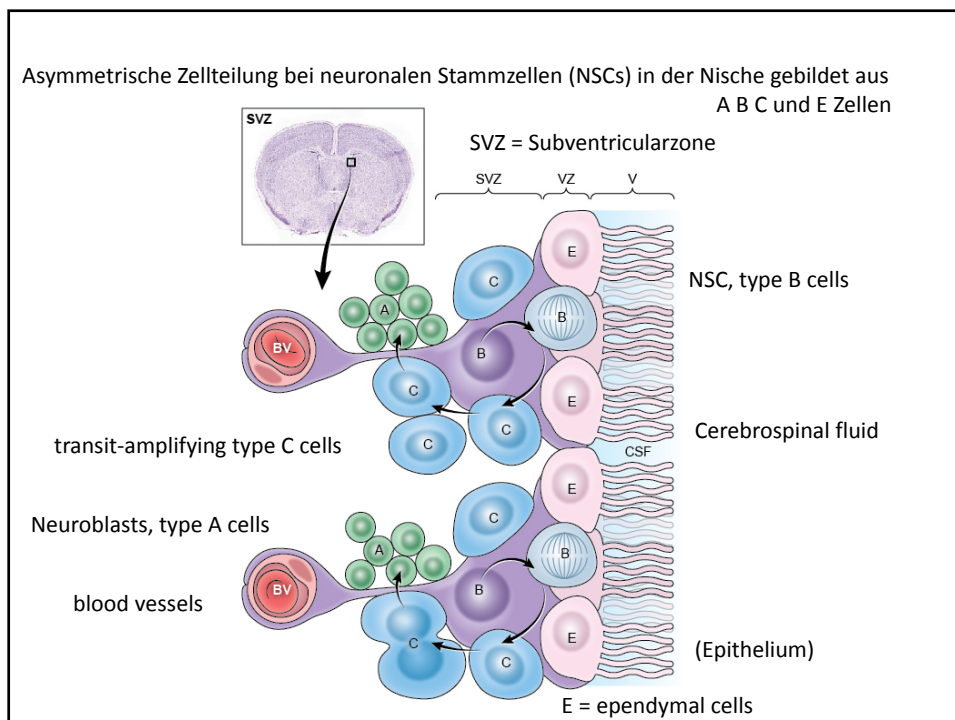
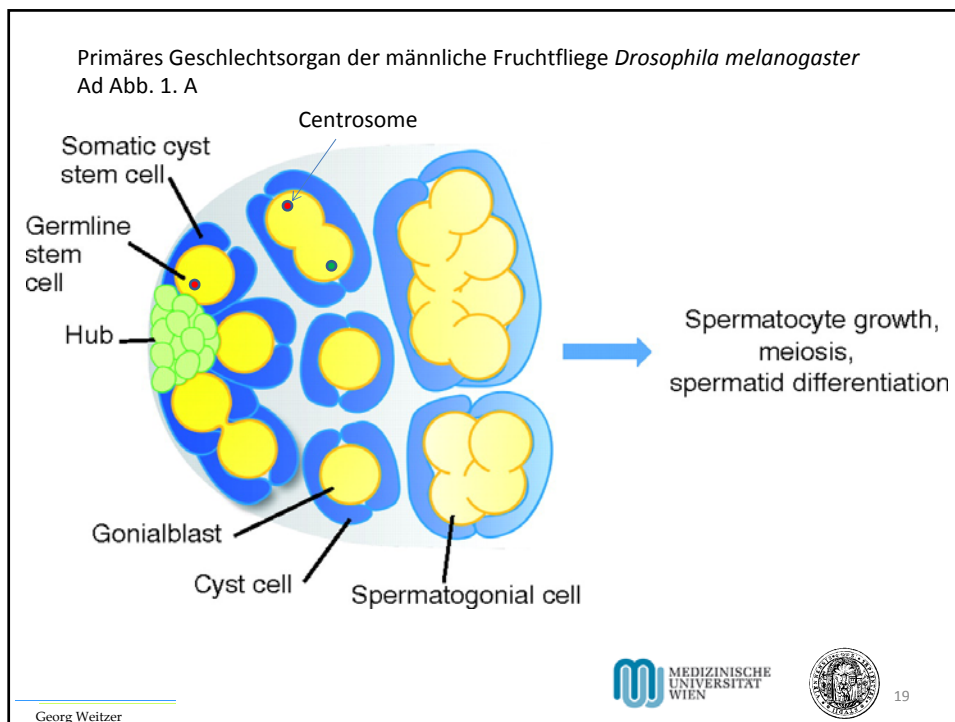




Legende zu vorhergehender Abbildung

Abb.1. Asymmetric centrosome/SPB behavior during asymmetric cell divisions. (A) Structure of the stem cell niche in the *Drosophila* male germline. Somatic hub cells are the major components of the niche for male GSCs. The GSC attaches to the hub via adherens junction (red lines) so that it can receive the signaling ligand, Upd, from the hub (yellow arrow) to activate the JAK–STAT (Janus kinase–signal transducer and activator of transcription) pathway. The stem cell daughter that is displaced away from the hub (gonialblast; GB) starts differentiation. (B) Consistent centrosome positioning orients the mitotic spindle in male GSCs. The mother centrosome (red dots) is always located close to the hub, whereas the daughter (yellow dots) migrates toward the opposite side of the cell to set up orientation of the mitotic spindle. (C) Asymmetric division of the *Drosophila* neuroblast (NB). The neuroblast divides asymmetrically by segregating fate determinants. Apical protein complexes (red lines) include Par6, Baz, and atypical PKC, and basal fate determinants (blue lines) include Numb, Miranda, and Prospero (for a more comprehensive set of asymmetrically localized proteins, see the review Yu et al., 2006). (D) Consistent centrosome behavior orients the mitotic spindle in the neuroblast. The apical centrosome (large red dots) retains MTOC activity throughout the cell cycle, whereas the other centrosome (small red dots) becomes active only at the G2-M transition. The inactive centrosome migrates toward the basal side during interphase. Pins might be functioning to provide a cortical cue to anchor active MTOC. (E) Spindle orientation in budding yeast. The mother SPB is normally delivered to the bud cell, where it is captured by the bud tip cortex. This process is mediated by astral microtubules emanating from the mother SPB and Kar9 protein. Cell cycle regulators such as Tem1 and Bub2/Bfa1 are specifically localized to the bud-directed SPB (normally the mother SPB) to coordinate spindle position and cell cycle progression.

Siehe auch <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2712604/>



Zusammenfassung:

Stammzellen können sich durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung vermehren.

Dabei wird die Klonalität, das ist die Erhaltung der Potenzialität der Zellen gewährleistet.

Die Spindelpolorientierung, die ungleiche Verteilung von Membranproteinen, und die selektive Verteilung von alten und neuen DNA Strängen tragen zur asymmetrischen Zellteilung bei.

In vivo finden diese Prozesse in Nischen in den Geweben statt. Als Beispiele wurde die Teilung der Keimbahnstammzellen in den Hoden von *Drosophila melanogaster* und die Teilung und Differenzierung von Neuronalen Stammzellen in der Subventrikulärzone des Großhirns von *Mus musculus* besprochen.