

**1. Teil: (Zusammenfassung der 3. DSt.)****Herzstammzellen und die Therapie von Herzerkrankungen**

1. Grundlagen der Stammzellbiologie
  - 1.1. Was ist eine Stammzelle?
  - 1.2. Was ist eine adulte Stammzelle?
- 2. Was ist eine Herzstammzelle?**
- 3. Wo befinden sich Herzstammzellen im Herzen?**
4. Wie entsteht das Herz in Säugetieren?
- 5. Wie entstanden das Herz und dessen Stammzellen im Laufe der Phylogenese?**
- 6. Kann man Stammzellen für die Therapie von Herzerkrankungen einsetzen?**

**2. Was ist eine Herzstammzelle?**

- 2.1. CSC sind selbsterneuernd.
- 2.2. CSCs sind klonal.
- 2.3. CSC haben ein definiertes und eingeschränktes Entwicklungspotenzial.
- 2.4. CSCs benötigen Nischen
- 2.5. CSCs können ruhen.
- 2.6. Molekulare Signatur der Herzstammzellen
- 2.7. Isolierung und Charakterisierung von CSCs mittels Zelloberflächenmarker
- 2.8. Wie kann man CSCs ohne FACS isolieren?
  - 2.8.1. Cardiosphären
  - 2.8.2. Nachempfindung der Nischenbedingungen und 3T3 Protokoll

## 6. Kann man Stammzellen für die Therapie von Herzerkrankungen einsetzen?

- 6.1. Potenzielle Stammzellquellen
- 6.2. Applikation der Stammzellen
- 6.3. Therapieversuche nach Herzinfarkt
- 6.4. Alternative Ansätze Stammzelltherapie des Herzens (Nachtrag)

## 4. Doppelstunde ESF II 2020

### 6.4. Alternative Ansätze Stammzelltherapie des Herzens (Nachtrag zur 3. DSt.)

- Aktivierung endogener Stammzellen mit ...
  - Growth factors      e.g. stromal cell-derived factor 1 (SDF-1a)/CXCR4 or HGF/C-Met
  - Peptides und „very small gene“ products
  - Micro RNAs          e.g. miR206/499 via exosomes\*, eRNAs
  - Drugs                  e.g. Cardiogenol, Resveratol, ...

... um regenerationsfördernde Prozesse positive zu beeinflussen.

- Testen der Hypothese, dass CSCs eine cardiac Drüse sind, die die Zellteilung der Kardiomyozyten fördert und aufrechterhält, aber im Normalfall nicht ausreicht, um Fehler und Verletzungen zu beheben. → Analyse deren Sekretom inklusive deren Exosomen\*.

\* siehe: Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. (2018) [Nature Biomedical Engineering](#) volume 2, pages293–303.

## Teil 2 Organoide

### 4. Doppelstunde ESF II 2020

1. Was sind Organoide?
  - 1.1. Was ist ein Embryoid Body?
  - 1.2. Woraus stellt man Organoide her?
  - 1.3. Welche Organoide gibt es bereits?
  - 1.4. Von Organoiden zu Entstehung ganzer Lebewesen
  
2. Wie entstehen Organoide?
  
3. Was wird man einmal mit Organoiden machen können?
  
4. Derzeitige Einschränkungen in der Organoidforschung

Quellenverweis: Texte und Ideen teilweise von <https://www.eurostemcell.org/de/organoide-was-sind-organoide-und-wie-helfen-sie-der-regenerativen-medizin> übernommen und modifiziert.

### 1. Was sind Organoide?

Ausgehend von der Entdeckung von Anna Wobus, dass embryonalen Stammzellen der Maus (mESCs) durch Aggregation zu einen embryoid body (EB) zur Entwicklung von Zellen aller drei Keimbahnen angeregt werden können, hat sich im Laufe von 30 Jahren im Rahmen der Forschung an Stammzellen in vitro und der Entwicklungsbiologie in vivo, herausgestellt, dass ausgehend von diesen EBs auch strukturierte Gewebe-ähnliche Zellaggregate, so genannte Organoide, hergestellt werden können. (see Kretzschmar and Clevers, 2016 in my homepage)

#### 1.1. Was ist ein Embryoid Body?

Embryonale Stammzellen werden bis zur ca. 60% Konfluenz auf feeder cells oder in N2 B27 +2i + LIF Medium gezogen, dann gegebenen Falls die feeder cells entfernt, und entweder in Suspensionskultur unter Rühren zu irregulären EBs aggregiert oder, eine definierte Anzahl von ESCs (z.B. 800 ESCs / 0,02ml) werden in hängenden Tropfen 3 bis 5 Tage aggregiert. Dann werden diese EBs in Suspensionskultur überführt oder durch Adsorption an eine biologische Matrix zur weiteren Entwicklung angeregt.

### Herstellung von Embryoid Bodies

Tag 1-3

20 min. Trypsin

Tag 4,5

24 Stunden

Tag 5.5

4,5 Tage

Tag 6.5

#### Embryoid Bodies

A d2

B d5

C d7

D d7

Anna Wobus,  
Gatersleben, D  
Erfinderin der von ESC  
abstammenden  
Embryoid Bodies  
(1985)

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

ESC Aggregat Tag 1

Kompaktierung Tag 1-2

Embryoid Body Tag 3

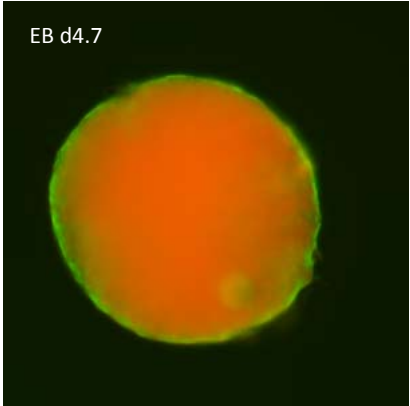
Embryoid Body Tag 4

Embryoid Body Tag 4,5

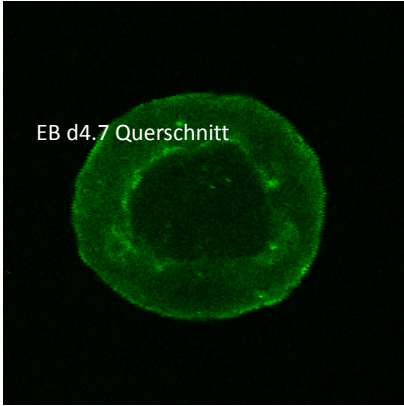
Georg Weitzer

Quelle:CDvor2000

EB d4.7




EB d4.7 Querschnitt




Der Hypoblast und Epiblast bildet sich, aber kein Trophektoderm.  
Embryoid Bodies verhalten sich wie die Innere Zellmasse.

Kompaktierung der ESCs kann nicht wirklich mit der Kompaktierung der Blastomere verglichen werden.

Georg Weitzer



MEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN



9

### 1.2. Woraus stellt man Organoide her?


Organoide können heute durch Aggregation und gezielter Beeinflussung der Entwicklungsprozesse

1. aus humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) die durch in vitro Fertilisation (ivF) oder durch Klonen(SCNT für somatic cell nucleus transfer) hergestellt werden.
2. aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs), die durch genetische Manipulation von somatischen Zellen hergestellt werden.
3. aus primären Zellen, die durch Biopsie gewonnen wurden, in vitro hergestellt werden.


Ad 1+2. Diese entstehen aus EBs unter speziellen Kulturbedingungen und Organoide ist daher streng genommen nur ein neuer Name für die seit 1986 bekannten und publizierten EBs (Anna Wobus, Gatersleben).

Ad 1-3. Es werden auch nicht-zelluläre Materialien, wie die ECM eingesetzt.

Georg Weitzer



universität  
WIEN



MEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN

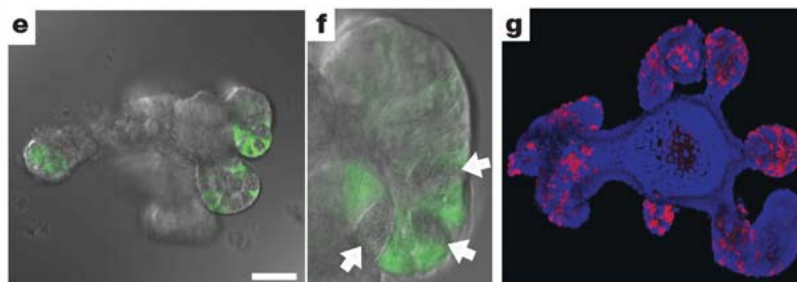
10

### 1.3. Welche Organoide gibt es bereits?

- Darm (Outani, ... and Hans Clevers 2009)
- Auge (Eiraku and Sasai, 2011)
- Hirn (Lancester, ...Penninger, Jürgen Knoblich, 2013, IMBA) "Minibrains"
- ... , in der Leber und der Niere, ....
- Precardiac organoids und Herz Organoide (Andersen et al., 2018; Hofbauer et al., 2020 prepubl. bioRxiv Sasha Mendjan, IMBA Wien forscht darüber).
- Endometrium Organoide aus hESCs (→ auf dem Weg zur künstlichen Plazenta, Teil 3).
- „Die Entwicklung von Verfahren zur Herstellung von Organoiden befindet sich noch immer im Anfangsstadium, und viele Gewebe müssen erst noch erfolgreich als Organoide erzeugt werden“. z.B.: Insulin secreting pancreas islands containing  $\beta$ -cells ?

### Single Lgr5<sup>+</sup> cells generate crypt–villus structures.

The **intestinal epithelium** is the most rapidly self-renewing tissue in adult mammals. We have recently demonstrated the presence of about six cycling Lgr5<sup>+</sup> stem cells at the bottoms of small-intestinal crypts<sup>4</sup>. Here we describe the establishment of long-term culture conditions under which single crypts undergo multiple crypt fission events, while simultaneously generating villus-like epithelial domains in which all differentiated cell types are present. Single sorted Lgr5<sup>+</sup> stem cells can also initiate these crypt–villus organoids. Tracing experiments indicate that the Lgr5<sup>+</sup> stem-cell hierarchy is maintained in organoids. We conclude that intestinal crypt–villus units are self-organizing structures, which can be built from a single stem cell in the absence of a non-epithelial cellular niche.

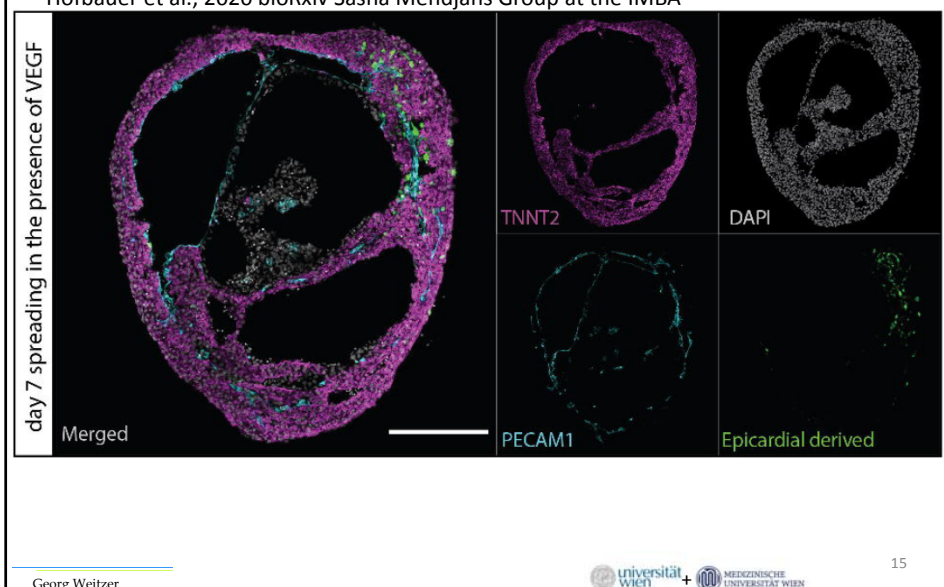


**e, f**, Fourteen days after sorting, single GFP<sup>hi</sup> cells form crypt organoids, with Lgr5–GFP<sup>+</sup> cells and Paneth cells (white arrows) located at crypt bottoms. Scale bar, 50  $\mu$ m. **f**, Higher magnification of **e**. **g**, Organoids cultured with the thymidine analogue EdU (red) for 1 h. Note that only crypt domains incorporate EdU. Counterstain, 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue).

T Sato *et al. Nature* **000**, 1–4 (2009) doi:10.1038/nature07935



Cardioids ([cardiac organoids](#)) composed of endocardium, myocardium, and epicardium  
Hofbauer et al., 2020 bioRxiv Sasha Mendjans Group at the IMBA



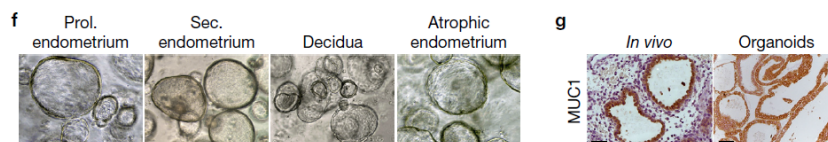
Herstellung von **Plazenten** aus Stammzellen

## TECHNICAL REPORT

nature  
cell biology

### Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium

Margherita Y. Turco<sup>1,2,13</sup>, Lucy Gardner<sup>1,3</sup>, Jasmine Hughes<sup>1</sup>, Tereza Cindrova-Davies<sup>2,4</sup>, Maria J. Gomez<sup>1</sup>, Lydia Farrell<sup>1,2</sup>, Michael Hollinshead<sup>1</sup>, Steven G. E. Marsh<sup>5</sup>, Jan J. Brosens<sup>6</sup>, Hilary O. Critchley<sup>7</sup>, Benjamin D. Simons<sup>8,9</sup>, Myriam Hemberger<sup>10,11</sup>, Bon-Kyoung Koo<sup>11</sup>, Ashley Moffitt<sup>12,13</sup> and Graham J. Burton<sup>2,4,12,13</sup>



Nur eine biochemisch genetische Analyse, keine Implantationsversuche.

Georg Weitzer


universität wien + MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

16



## Stem Cell Reports

**Resource**

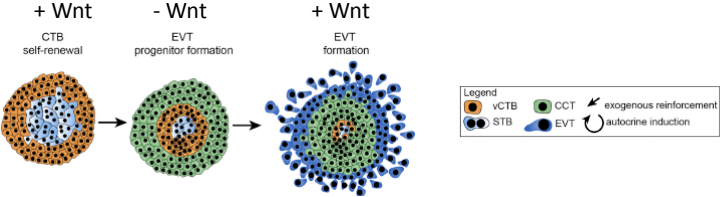


OPEN ACCESS

### Self-Renewing Trophoblast Organoids Recapitulate the Developmental Program of the Early Human Placenta

Sandra Haider,<sup>1</sup> Gudrun Meinhardt,<sup>1</sup> Leila Saleh,<sup>1</sup> Viktoria Kunihs,<sup>1</sup> Magdalena Gamperl,<sup>2</sup> Ulrich Kaindl,<sup>2</sup> Adolf Ellinger,<sup>2</sup> Thomas R. Burkard,<sup>3</sup> Christian Fiala,<sup>4</sup> Jürgen Pollheimer,<sup>1</sup> Sasha Mendjan,<sup>3</sup> Paulina A. Latos,<sup>2,\*</sup> and Martin Knöfler<sup>1,\*</sup>


<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical University of Vienna, Reproductive Biology Unit, Währinger Gürtel 18-20, 5Q, 1090 Vienna, Austria  
<sup>2</sup>Center for Anatomy and Cell Biology, Medical University of Vienna, Schwarzschanerstrasse 17, 1090 Vienna, Austria  
<sup>3</sup>Institute of Molecular Biotechnology, Austrian Academy of Sciences, 1030 Vienna, Austria  
<sup>4</sup>Gynmed Clinic, 1150 Vienna, Austria  
 \*Correspondence: paulina.latos@meduniwien.ac.at (P.A.L.), martin.knoefler@meduniwien.ac.at (M.K.)  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.004>



(C) Model system showing the role of Wnt in trophoblast organoid self-renewal and differentiation.  $\beta$ -cat,  $\beta$ -catenin; CTB, cytotrophoblast; EVT, extravillous trophoblast; STB, syncytiotrophoblasts; TCF, T cell factor.

Eingehende molekulare Charakterisierung der Entstehungsprozesse ist eine unabdingbare Voraussetzung für eine später Anwendung.

Georg Weitzer



17

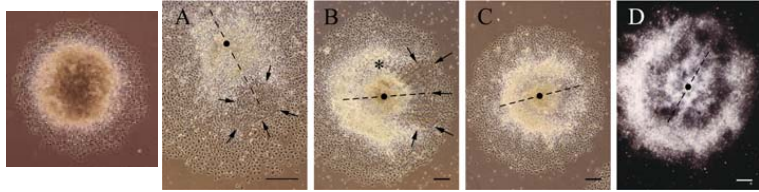
### 1.4. Von Organoiden zu Entstehung ganzer Lebewesen

(Blastulide und Gastruloide (Als Überleitung zu Teil 3 Herstellung von Lebewesen))

Further development of “implanted” embryoid bodies on a collagen surface:


Point symmetry  $\longrightarrow$  Line symmetry

Day 6      Day 6.5      Day 7.0      Day 8.0      Day 9.0



Fuchs et al., 2009

Georg Weitzer



18

Mesodermbildung in Embryoid Bodies Braking line symmetry

left right  
upper lower



Area where mesodermal cells emerge

Area where first contracting cardiomyocytes emerge

Fuchs et al., 2009

In 65 +/- 7 % der Embryoid Bodies beginnen die ersten Kardiomyozyten „links unten“ zu schlagen! (N= 349).

→ Embryoid Bodies sind asymmetrisch!

Georg Weitzer   19

Herstellung von Blastozysten aus Stammzellen

**LETTER**

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>

**Blastocyst-like structures generated solely from stem cells**

Nicolas C. Rivron<sup>1,2\*</sup>, Javier Frias-Aldeguer<sup>1,2</sup>, Erik J. Vrijl<sup>1</sup>, Jean-Charles Boisset<sup>2</sup>, Jeroen Korving<sup>2</sup>, Judith Vivie<sup>2,3</sup>, Roman K. Truckenmüller<sup>1</sup>, Alexander van Oudenaarden<sup>2</sup>, Clemens A. van Blitterswijk<sup>1,3</sup> & Niels Geijsen<sup>2,4,5</sup>

**a**

Blastocyst

In vitro derivation

+ LIF

+ FGF4

ES cells

TS cells

In vitro aggregation

Sequential seeding on a microwell array

TS cells

ES cells



Blastoids

Blastocysts

Blastoids

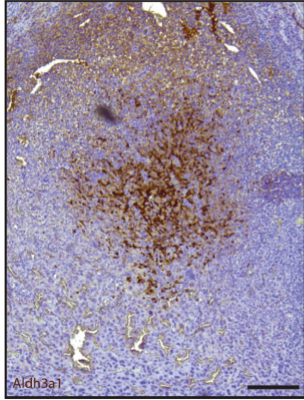
Blastoids Vehicle

Deciduae

Georg Weitzer   20

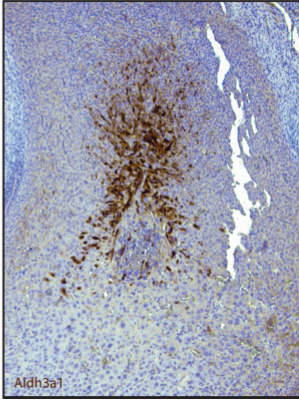
Histology of deciduae produced by blastocysts, blastoids :

Blastocyst-induced



Aldh3a1

Blastoid-induced




Aldh3a1

E7.5

Einnistung findet bereits statt.

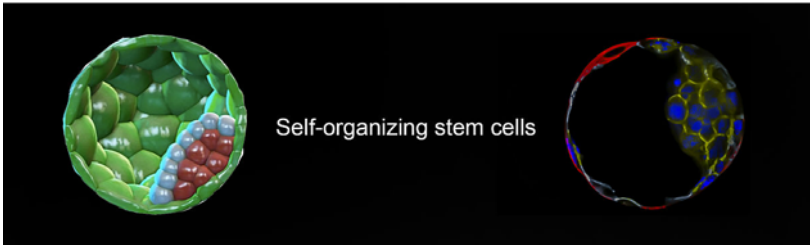
Georg Weitzer



universität wien + MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN = mfpl

21

Nächste Schritte: Von Blastoids –Gastruloids - ... ?



Self-organizing stem cells

Nicolas Rivron, IMBA see <https://www.imba.oeaw.ac.at/research/nicolas-rivron/>

Georg Weitzer



universität wien + MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN = mfpl

22

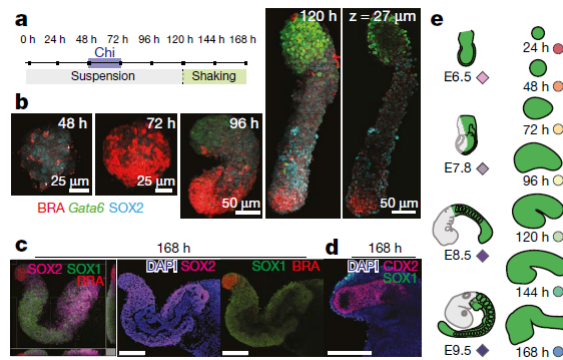
4.3. Autonome Morphogenese

LETTER

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0578-0>

Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids

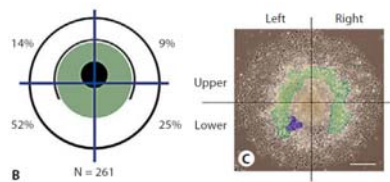
Leonardo Beccari<sup>1,4</sup>, Naomi Moris<sup>2,6</sup>, Mehmet Girgin<sup>3,6</sup>, David A. Turner<sup>2</sup>, Peter Baillie-Johnson<sup>2,3</sup>, Anne-Catherine Cossey<sup>4</sup>, Matthias P. Lutolf<sup>3</sup>, Denis Duboule<sup>1,4,7\*</sup> & Alfonso Martinez Arias<sup>2,7\*</sup>



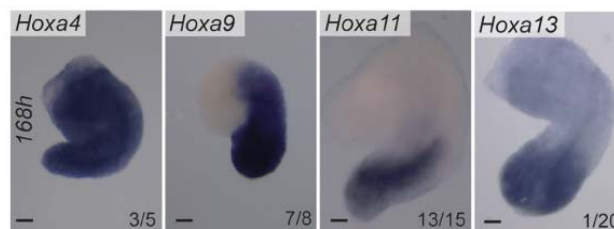
Georg Weitzer



23



Achsenbildung und Symmetriebruch bei der Herzzellenentstehung in Embryoid Bodies  
Fuchs et al., 2012



Axiale Gastruloide mit segmentierter Hox Gen Cluster Expression  
Beccari et al., 2018

Georg Weitzer

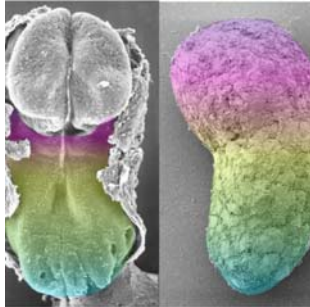


24

#### 1.4. Von Organoiden zu Entstehung ganzer Lebewesen

### A new embryo-like model could help scientists study the 'black box' of early human development

By [Natalya Ortolano @NatOrtolano](#) June 11, 2020



A comparison between a 20-day-old human embryo, on the left, and an embryo-like model, on the right. *Courtesy Naomi Moris*

Researchers have developed the first-ever embryo-like model from human embryonic stem cells, a workaround that will let them examine birth defects and diseases they couldn't otherwise, given ethical and technical issues with studying a human embryo in the lab.

The model resembles a human embryo around 18 to 21 days old — complete with the layers of the cells that will eventually form the nervous system, muscles, the gut, and other cells and structures in the human body. It offers far more insights into the organization and decision-making processes of early-stage embryos than other models, but experts caution it still differs from human embryos in key ways.

See Taniguchi et al., 2018.

## 2. Wie entstehen Organoide?

Durch Identifizierung der notwendigen Wachstumsbedingungen, die es erlauben, dass aus chaotischen embryoid bodies strukturierte Organoide entstehen.

1. Zelluläre Nachbarn, wie obligate Zell-Zellkontakte
2. A-zelluläre Komponenten, wie ECM
3. Humorale Faktoren, wie Hormone und Wachstumsfaktoren

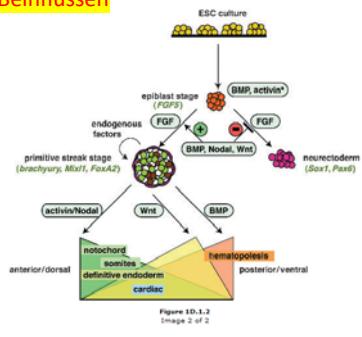




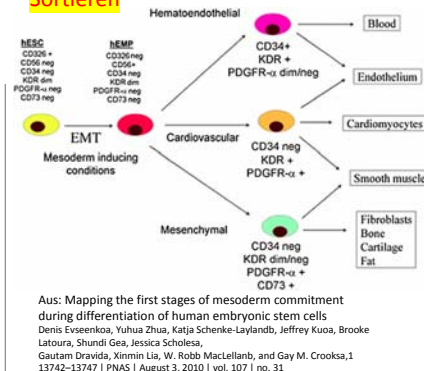
### 3. Gerichtete in vitro Differenzierung von Stammzellen

#### BEISPIELE FÜR GERICHTETE DIFFERNZIERUNG

##### Beinflussen

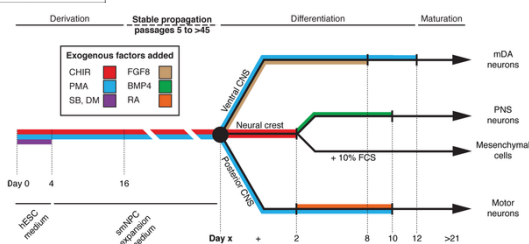


##### Sortieren



Aus: Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells  
 Denis Evseenko, Yuhua Zhua, Katja Schenke-Laylandb, Jeffrey Kuoa, Brooke Latoura, Shundi Ges, Jessica Scholtesa, Gautam Drazida, Xinmin Lisa, W. Robb MacLellanb, and Gay M. Crooksa.1  
 13742–13747 | PNAS | August 3, 2010 | vol. 107 | no. 31

Aus: Reinhardt P, Glatz M, Hemmer K, Tsytsyura Y, et al. (2013) Derivation and Expansion Using Only Small Molecules of Human Neural Progenitors for Neurodegenerative Disease Modeling. PLoS ONE 8(3): e59252. doi:10.1371/journal.pone.0059252  
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0059252>



### 3. Was wird man einmal mit Organoiden machen können?

- Organoide werden derzeit darauf getestet, ob sie gesunde neue Zellen und Gewebe für die moderne regenerative Medizin liefern können.
- Mit Hilfe von Organoiden, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) eines Patienten erzeugt werden, ließen sich personalisierte Medikamente entwickeln. Außerdem könnten medizinische Behandlungen vorab an Organoiden anstatt direkt am Menschen getestet werden.
- Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit oder ethischer Bedenken ist es oftmals schwierig, menschliches Gewebe zu erhalten, um die Entwicklung bzw. Erkrankungen von Organen zu erforschen. Organoide bieten Wissenschaftlern neue Alternativen und Möglichkeiten für die moderne Forschung.
- Mit Hilfe von Organoiden lassen sich die komplexen Anordnungen und Interaktionen von Zellen im dreidimensionalen Raum untersuchen, was bei den meisten anderen Versuchsmodellen nicht möglich ist.
- Organoide dienen bereits dazu, Krankheiten zu untersuchen, neue Medikamente zu entwickeln und etwas darüber zu erfahren, wie sich Zellen zu Organen zusammenschließen.
- Blastuloide und Gastruloide erlauben es, die frühe Entwicklung menschlicher Föten ex vivo zu untersuchen.

#### 4. Derzeitige Einschränkungen in der Organoidforschung

- Die meisten Organoiden enthalten lediglich einen Teil der Zellen eines tatsächlichen Organs. Um hundertprozentig funktionelle und stabile Gewebe zu erzeugen, müssen Möglichkeiten entwickelt werden, um andere Zellsysteme, wie beispielsweise das Gefäßsystem, in Organoiden zu integrieren.
- Der Prozess, Krankheiten in Organoiden zu reproduzieren, verläuft nicht immer geradlinig. Dennoch lassen sich dadurch wahrscheinlich bedeutsame, bislang wenig bekannte Krankheitsaspekte aufdecken.
- Zwar bieten Organoiden den Forschern zahlreiche Vorteile und Möglichkeiten, doch sie weisen auch Einschränkungen auf und werden andere experimentelle Systeme nicht zur Gänze ersetzen können.
- Gastruloide und Implantate werfen viel ethisch relevante Fragen auf.

Nicht liegt es an dir das Werk zu vollenden, ...

Georg Weitzer