

B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

1.1. Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria (Placentales) am Beispiel der Maus

- Die Entstehung von Stammzellen im Laufe der Ontogenese

Prägastrulationsentwicklung der Zygote

Ursprung der embryonalen Stammzellen

A: E0
 B: E0
 C: 32 Zellen
 D: m: E2.5, h: E3.5
 E: m: E3.0, h: E4.5
 F: 64 - 128 Zellen
 G: m: E4.5, h: E6.0
 H: Implantation
 I: E 6.5

3,5 Tage (E3,5)
 ↑
 32 Zellen
 64 - 128 Zellen

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN
 Georg Weitzer
 3

Ursprung der somatischen Stammzellen? → Prägastrulationsentwicklung der Zygote(schematisch)

Fertilized egg E0.0
 2-cell E1.5 (20-38 h)
 3-cell
 4-cell E2.0 (38-50 h)
 8-cell E2.5 (50-62 h)

Zygotic transcription

compacted 8-cell E2.5
 16-cell/morula E3.0 (62/74 h)
 blastocyst/32 to 64-cell E3.5
 hatched blastocyst 256-cell E4.5

Animal
 Vegetal
 2nd polar body
 Zona pellucida
 Embryonic
 Abembryonic
 Polar TE
 ICM
 Mural TE
 Blastocoele
 Epiblast
 PrE

Compaction
 Trophectoderm formation
 Primitive endoderm formation

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN
 Georg Weitzer
 4

Peri-implantationsentwicklung des Blastozysten:

Entstehung des extra-embryonalen primitiven Endoderms und dessen Derivate, des visceralen und parietalen Endoderms.

Georg Weitzer

5

Lokalisation der Zellen bis zum Egg-cylinder (m) / embryonic disc (h) stage:

Downloaded from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/> on November 4, 2016

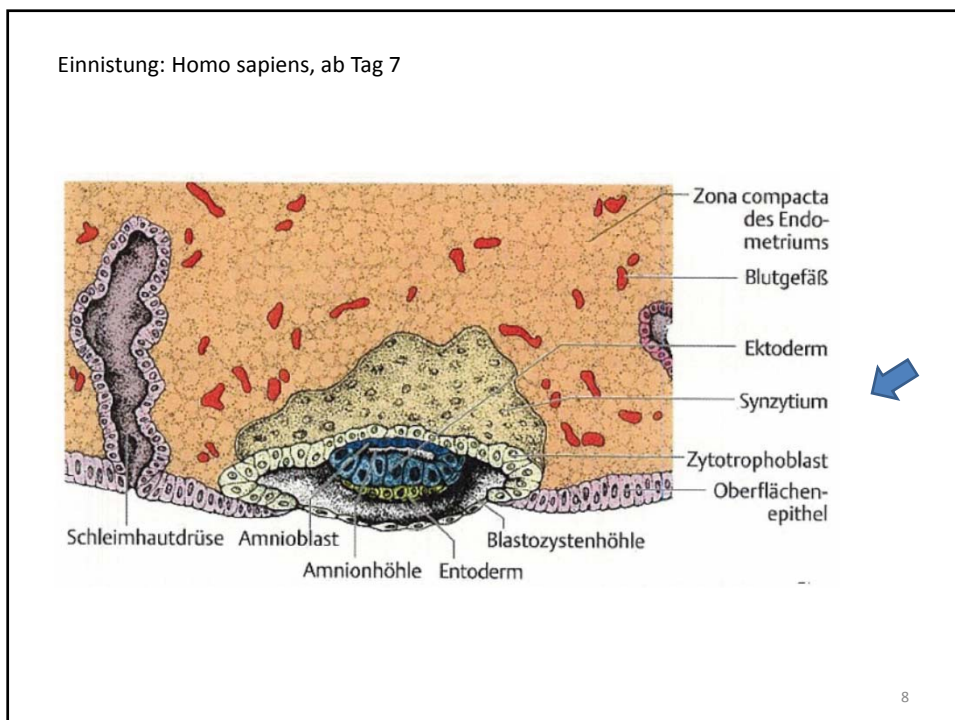
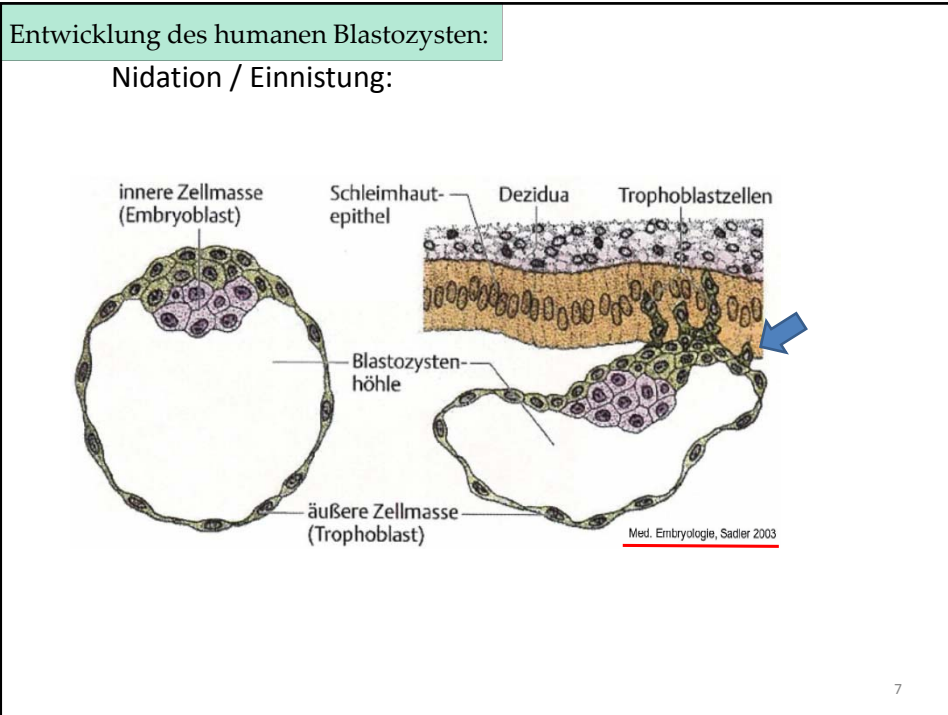
preimplantation						peri-	postimplantation >	
E0.5	E1.5	E2.0	E2.5	E3.0	E3.5	E4.5	E5.0	E5.5
zygote	2-cell	4-cell	8-16-cell	16-32-cell	early blastocyst	late blastocyst	peri-implantation	egg cylinder
		early bias	wave 1	wave 2	mosaic	sorted	rosette	lumen

■ EPI
■ TE/ExE
■ PE/VE
✖ apoptosis
■ basement membrane
 cell division
 cell movement

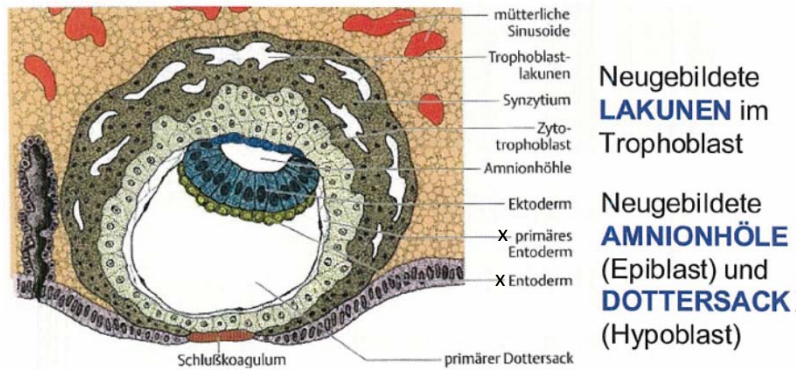
Figure 1. Overview of early mouse development. Embryonic and extraembryonic cells are specified in the preimplantation embryo by two cell fate decisions. In the first cell fate decision, waves of cell divisions create inside and outside cells. Outside cells give rise to extraembryonic trophoblast (TE), while inside cells form the pluripotent inner cell mass (ICM). In the second cell fate decision, cells of the ICM are segregated into the extraembryonic PE and the pluripotent epiblast (EPI) that will later give rise to all tissues of the body. These fate decisions are influenced but not determined by heterogeneity between individual cells within the embryo that is established by the 4-cell stage (shown by different shading of cells). At E4.5, the embryo initiates implantation and over the next 24 h invades the maternal tissues, rapidly proliferates and transforms into an egg cylinder. This new form serves as a foundation for EPI patterning, laying down the body axis and establishment of the germ layers. ExE, extraembryonic ectoderm; PE, primitive endoderm; VE, visceral endoderm.

Georg Weitzer

6



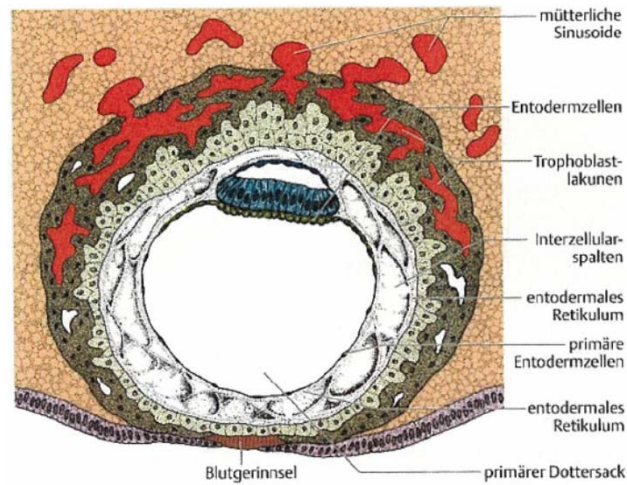
Einnistung: Homo sapiens, ca. Tag 9



x = extraembryonales Endoderm

9

Homo sapiens, ca. Tag 12



Dann folgt die Gastrulation. →

10

Gastrulation → Wo liegt der Ursprung von somatischen Stammzellen?

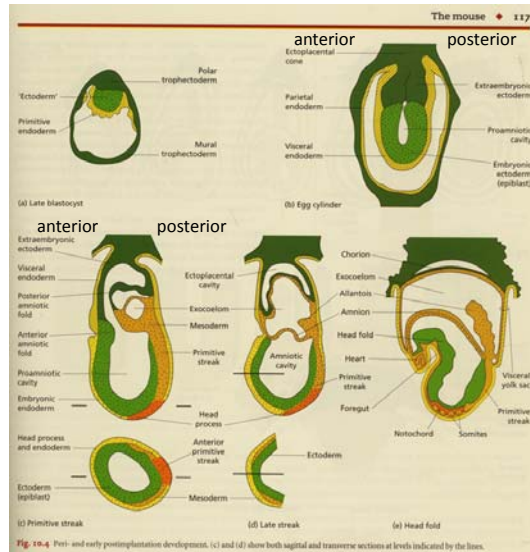


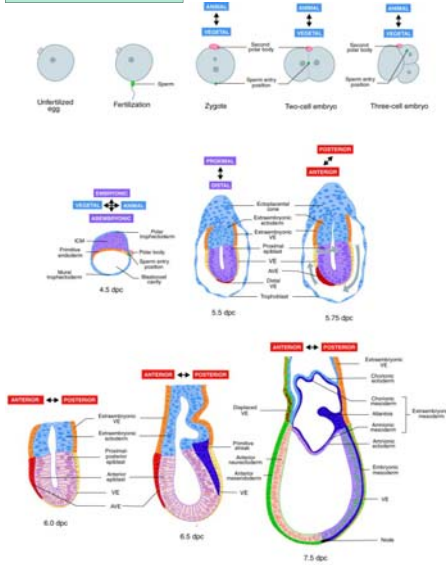
Fig. 19-4 Peri- and early postimplantation development. (c) and (d) show both sagittal and transverse sections at levels indicated by the lines.

Georg Weitzer



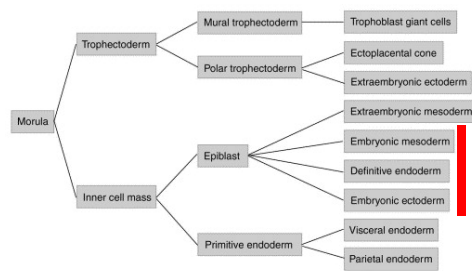
11

Gastrulation)

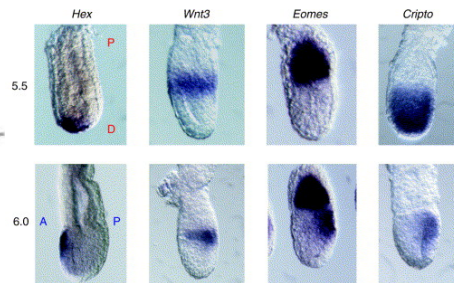


Current Opinion in Genetics & Development

Aus: [Curr Opin Genet Dev](#), 2001 Aug;11(4):384-92.
From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo.
[Lu CC](#), [Brennan J](#), [Robertson EJ](#).



Current Opinion in Genetics & Development



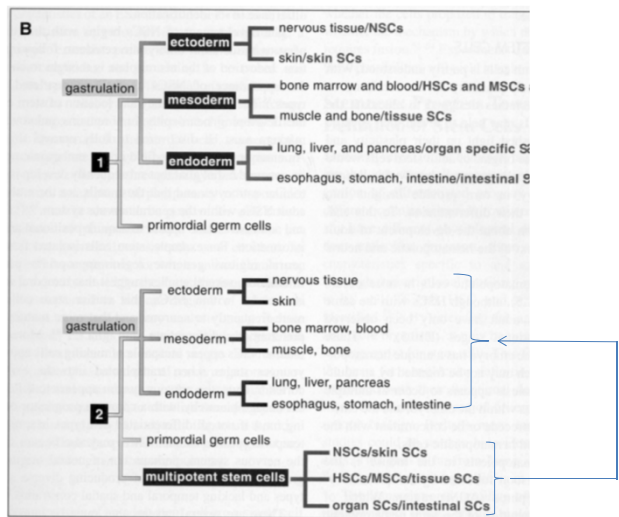
Current Opinion in Genetics & Development

Georg Weitzer



12

Wie „überleben“ die somatischen Stammzellen die Gastrulation unbeschadet ?



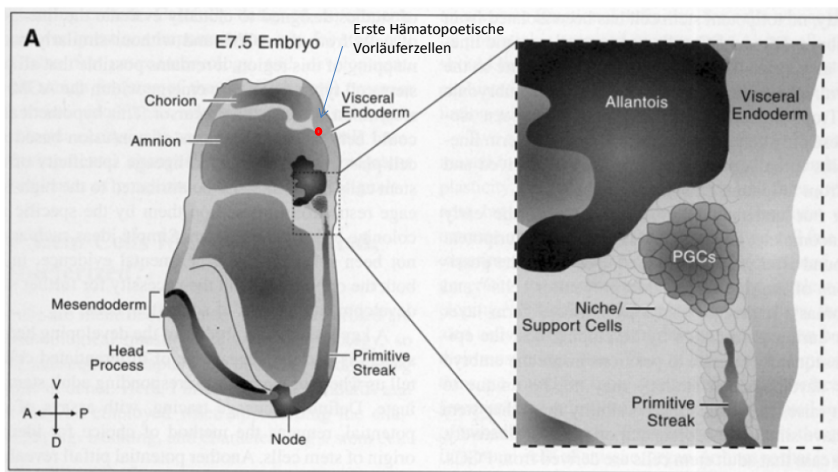
Georg Weitzer



13

Woher kommen die Keimbahnstammzellen?

Die extra-embryonale Lage der Primären Keimzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen

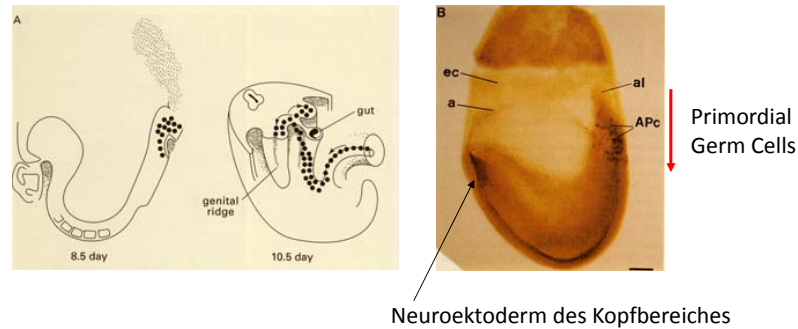


Georg Weitzer



14

Das Einwandern der primären Keimzellen in die Geschlechtsorgane



B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

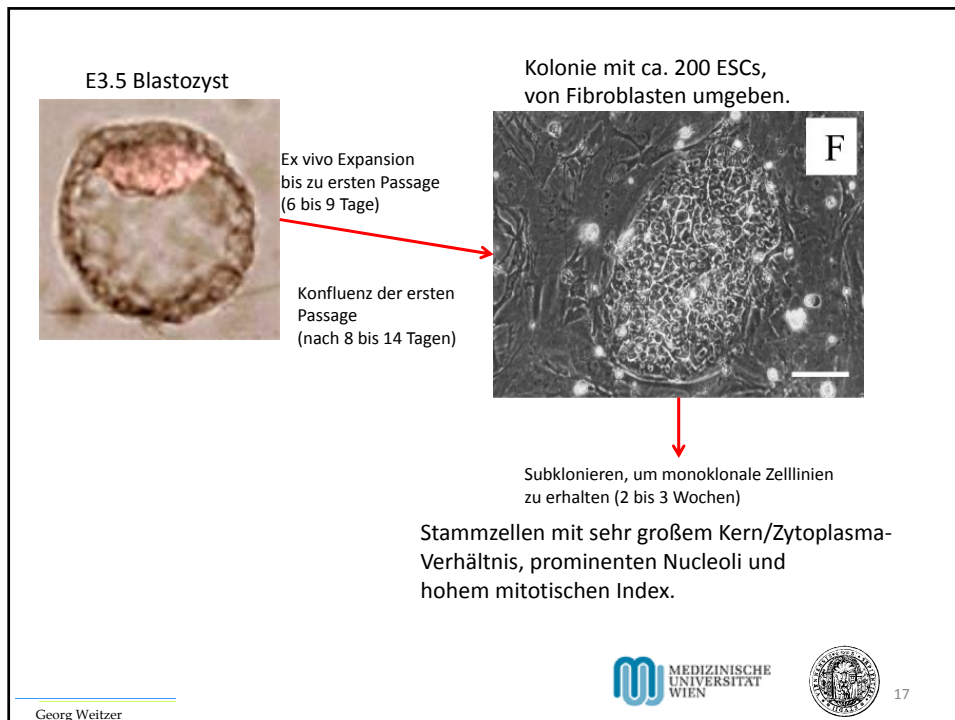
1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?



1.1. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien

1.1.1. Isolation von Blastozysten aus Mäusen

Mouse Female Superovulation Guideline

Superovulation is a technique used to get female mice to release more eggs than normal.

Hormone stock reconstitution:

PMSG, pregnant mare serum Gonadotropin

hCG, humanes Choriongonadotropin, löst Eisprung aus

Animals:

Female age: ~4 weeks of age at time of PMSG administration.

Male age: 8-24 weeks stud male, each male is set up only once per week.

Hormone time schedule:

PMSG on Day 1 at 1:00 p.m., hCG on Day 3 at 12:00 p.m., Set-up female with male on Day 3 after hCG injection. → Day 4 check for vaginal pug.

<https://med.stanford.edu/tkct/service/transgenesis-animal-services/transgenic-service/mouse-female-superovulation-guideline.html>

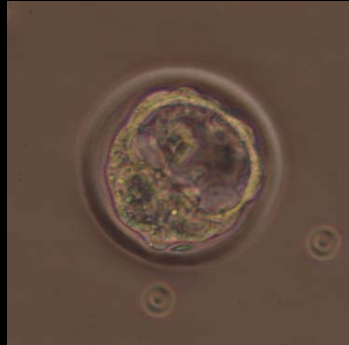
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



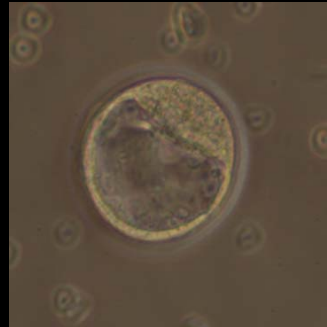
18

1.1. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien
1.1.1. Isolation von Blastozysten aus Mäusen



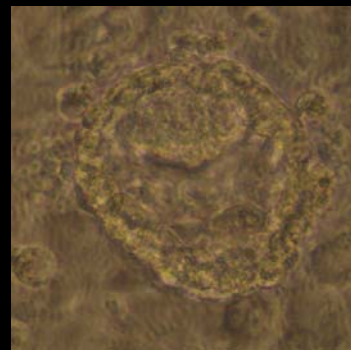
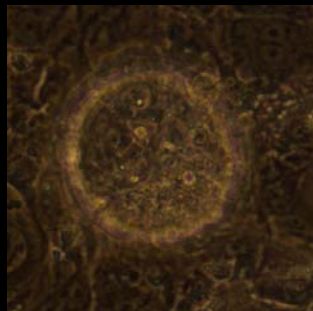
Maus Blastozyst E3.0

Maus Blastozyst E3.5

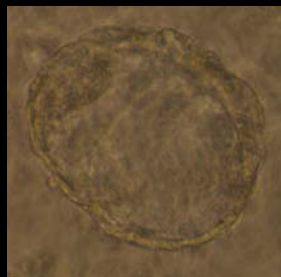


20.10.2011

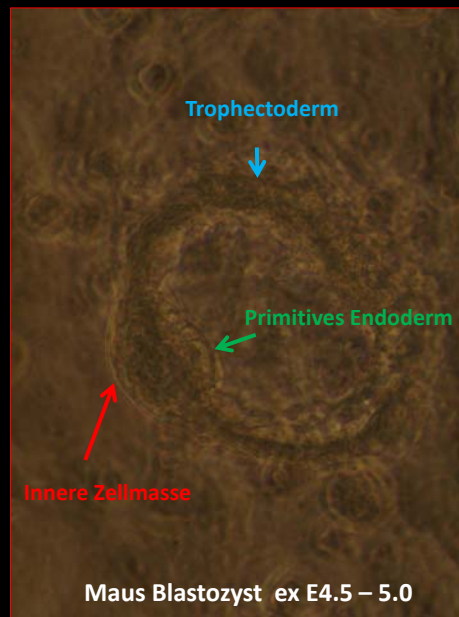
1.1.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“



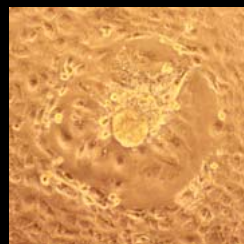
Maus Blastozysten E3.5 – 4.5



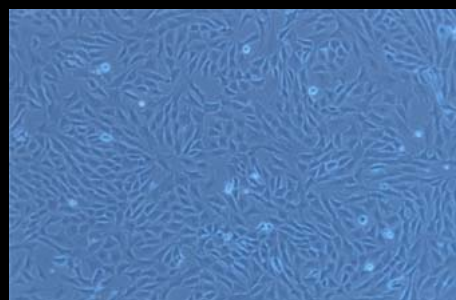
1.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“



Auf Fibroblasten angewachsener Blastozyst



Ex E8-9



Isolierte trophektodermale Zellen



1.1.2. Kultivierung der Blastozysten und daran anschließend der ESC Linien auf „feeder cells“

1. Mitotisch inaktivierte SNL76/7 Fibroblasten (mit 0.05mg/ml Mitomycin C 2 Std behandelt)

S = STO fibroblasten S = SIM (= Sandos Inbred Mice) Mäusestamm; TO = Thioguanine/Ouabain-resistent

N = Neomycin Resistent

L = sezernieren Leukämie Inhibition Faktor (LIF) (erste FCs waren Teratocarcinomzellen)

2. DMEM Medium mit viel (4,5g/l) Glucose, 0,11g/l Pyruvat, GPS und 0,1 mM β -Mecaptoethanol

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

Ca-, Mg-, K-, Na-Salze, alle Aminosäuren (darunter 4mM Gln) und Vitamine

3. GPS = 2mM (292mg/l) Glutamin + 30mg/l Penicillin + 50mg/l Streptomycin

4. 15% fötales Rinderserum (FBS)

enthält Insulin, Transferrin, Albumin,, Hormone (Testosteron, ...) Enzyme .., Bone morphogenetic protein (s)
kaum reproduzierbar und ethisch bedenkliche Gewinnung

Ethisch problematisch

Alternative zu FBS N2B27 + 2i + LIF Medium (Entwicklung dauerte ca. 20 Jahre)

50% DMEM

N2 (Insulin, Transferrin, Progesteron, Putrescin, Se (Selenit))

B27 Proteinmischungen (geheim: Katalase, SOD, Hormone, ..., Quelle unbekannt)

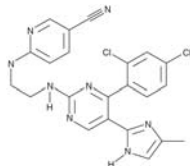
3 μ M CHIR99021 + 1 μ M PD03259010 (beim Menschen: + 2 μ M XAV939)

10⁶ U/ml LIF

Zweck: Erhaltung des Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzials der ESCs.

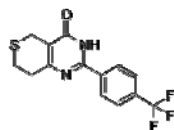
Komponenten des 3i Mediums:

CHIR99021 (CAS 252917-06-9)



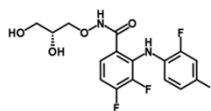
A Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β) Inhibitor mimicking Wnt signaling by activating the translocation of β-catenin into the nucleus of cells.

XAV-939



XAV-939 ist ein potenter tankyrase, der auf die Wnt/β-catenin signaling abzielt. XAV-939 stabilisiert Axin durch Hemmung von tankyrase 1 und tankyrase 2 (IC₅₀ von 5 bzw. 2 nM) und stimuliert dadurch den Abbau von β-Catenin.

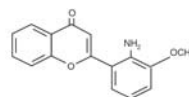
PD03259010



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

oder

PD98059



Wnt signaling ON

+

ERK1/2 signaling OFF

Georg Weitzer

25

1.1.2. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)

mESCs: Kultur wie Blastozystenkultur: LIF (STAT3) Bmp2/4 und Wnt (β-Catenin) essentiell.

Auf LIF secreting fibroblasts

hESC: Kultur wie mESC aber nicht LIF (STAT3) und Bmp2/4 entscheidend, sondern

FGF2, Activin/ Nodal, Noggin (a Bmp and TGFβ antagonist), TGFβ- und Wnt-signaling.

N2B27 + 2i

STAT = Signal transducer and activator of transcription

Georg Weitzer

1.1.3. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF für Wunschbabys, hESCs und ntESCs

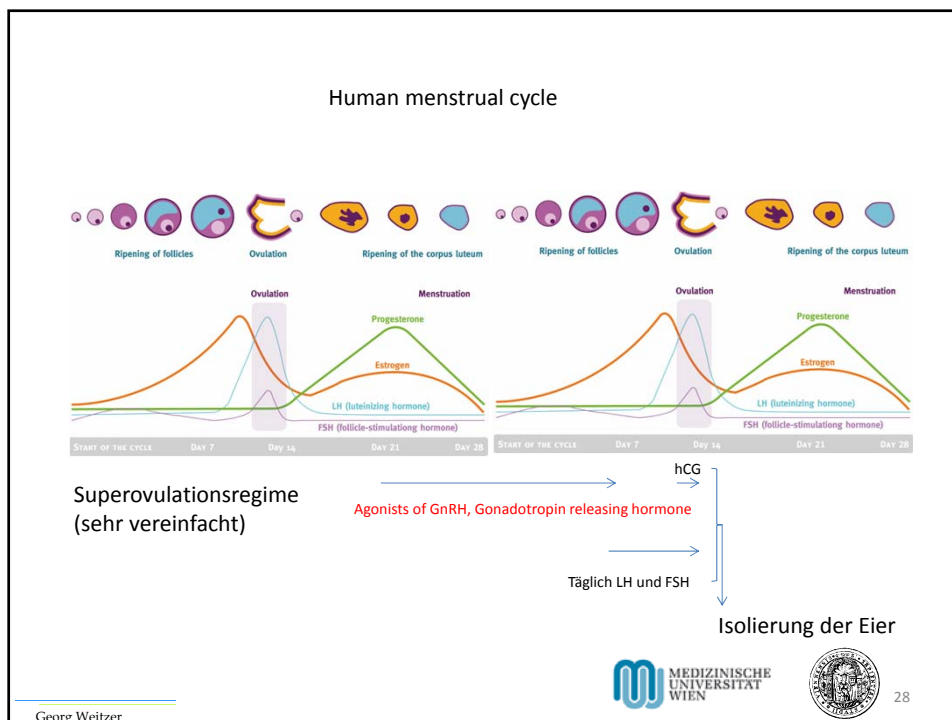
Wie bekommt man Oozyten und Blastozysten von *H. sapiens*?

Voraussetzungen:

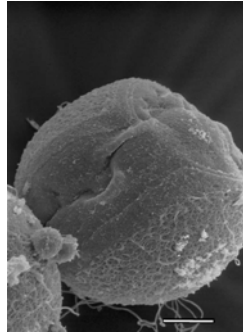
Detaillierte Kenntnis des Ablaufs der Meiose bei Frauen und Männern, sowie der Reifung der Oozyten und des Menstruationszyklus.

Procedere:

- Superovulation (unter Verwendung von bis zu 7 Hormonen und Medikamenten)
- Isolation mittels Ultraschall-überwachte transvaginale Katheterisierung
- *Ex vivo* Befruchtung
- Kultur der Zygote bis zum Blastozystenstadium *ex vivo*
- Transdermale Implantation des(r) Blastozysten oder *in vitro* Kultur der ICM bis zur Etablierung von ESC-Linien.



2.2.3. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF



doi: [10.1007/s10815-007-9131-z](https://doi.org/10.1007/s10815-007-9131-z)



PMID: 22695746

Georg Weitzer

B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

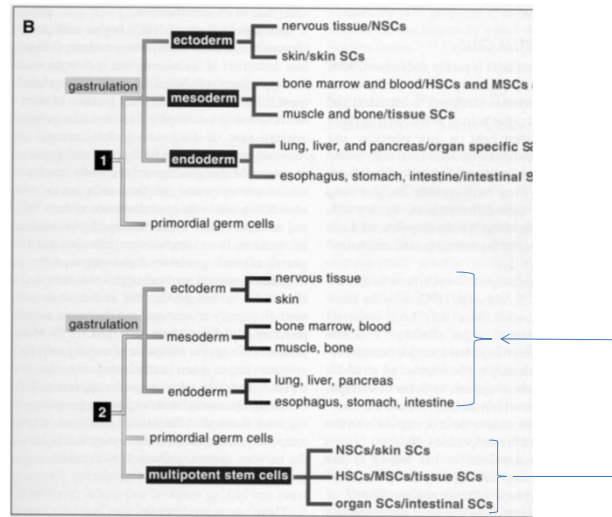
2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

Georg Weitzer

Wo und wie „überleben“ die Stammzellen die Gastrulation unbeschadet ?



1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 1.2.1. Iteratives Isolieren und Charakterisieren mit Oberflächenmarkern
- 1.2.2. Isolieren und Kultur gemeinsam mit den Nischenzellen zusammen
- 1.2.3. Selektion von proliferierenden Zellen unter Annahme einer Nische

1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 1.2.1. Iteratives Isolieren und Charakterisieren
- Stammzellenmarker (Oberflächenproteine aus der Hämatologie)
 - c-Kit, Sca1, Mdr1, Flk1, ... Wo kommen diese Marker (M) in adulten Geweben vor?
 - Isolation dieser M⁺-Zellen mittels FACS oder MACS
 - Analyse der Expressionsmuster und der Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit in vitro.
- Alternative: Herstellung von transgenen Mäusen, die ein Stammzell-spezifisches Reportergen enthalten.
 - Isl1 (cardiac), Vav1 (hematopoetic), Nestin (neuronal)

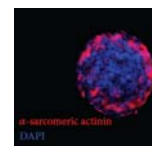
Probleme:

- Identifikation von besseren Markern (Markerkombinationen) zB Lgr5 Dünndarm, Myf5 Myoblasten und Braune Fettzellen
- Identifikation der Nischenbedingungen und Kulturbedingungen
- Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.

Georg Weitzer

1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 1.2.2. Isolieren und Kultur gemeinsam mit den Nischenzellen zusammen
- Herstellung von Aggregaten aus nicht definierten Zellpopulationen („outgrowths“)
 - Z.B.: Cardiospheres*, Neurosphären
- Identifikation der Nischenbedingungen und Kulturbedingungen
- Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.

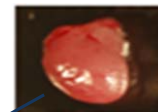


* Cardiospheres (CSs) are self-assembling multicellular clusters from the cellular outgrowth from cardiac explants cultured in nonadhesive substrates. They contain a core of primitive, proliferating cells, and an outer layer of mesenchymal/stromal cells and differentiating cells that express cardiomyocyte proteins and connexin 43. Because CSs contain both primitive cells and committed progenitors for the three major cell types present in the heart, that is, cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells, and because they are derived from percutaneous endomyocardial biopsies, they represent an attractive cell source for cardiac regeneration. In preclinical studies, CS-derived cells (CDCs) delivered to infarcted hearts resulted in improved cardiac function. CDCs have been tested safely in an initial phase-1 clinical trial in patients after myocardial infarction. Whether or not CDCs are superior to purified populations, for example, c-kit+ cardiac stem cells, or to gene therapy approaches for cardiac regeneration remains to be evaluated.

Aus Human Cardiospheres as a Source of Multipotent Stem and Progenitor Cells
Lucio Barile, Mihaela Gherghiceanu, Laurențiu M. Popescu, Tiziano Moccetti, and Giuseppe Vassalli
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/916837>

Georg Weitzer

1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

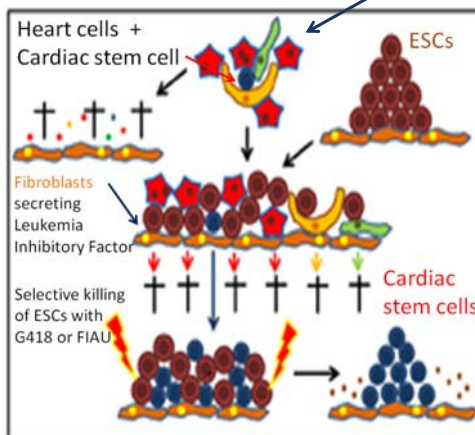


1.2.3. Selektion von proliferierenden Zellen unter Annahme einer Nische

Co-kultur von Geweben mit ESCs und „Nischen Zellen“.

Problem:

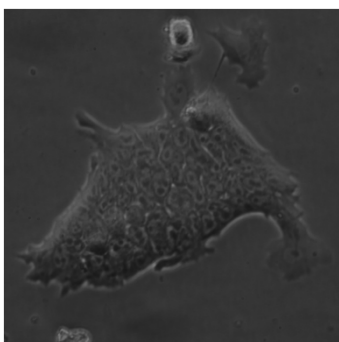
Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Re-programmierung oder Indizierung somatische Stammzellen aus somatischen Herzellen hergestellt wurden.



Hoebaus et al., 2013



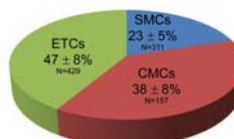
Somatische Stammzellen des Herzens behalten ihr Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial ex vivo, wenn sie in Gegenwart von LIF und mitotisch inaktivierten Fibroblasten (fcs), als Ersatz für die Nische, kultiviert werden.



Eine Kolonie der Cardiovascular Progenitor Cells

Aggregation von Herzstammzellen zu Cardiac bodies

In Abwesenheit von LIF und fcs führt zur Differenzieren zu
 Herzmuskelzellen
 Vaskulären Endothelzellen
 Glatten Muskelzellen
 ? Herzspezifischen Fibroblasten



... aber nie zu Zellen endo- und ectodermalen Ursprungs.

