

7DSt

Georg Weitzer



1

Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. Wie macht man embryonale Stammzellen?
3. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

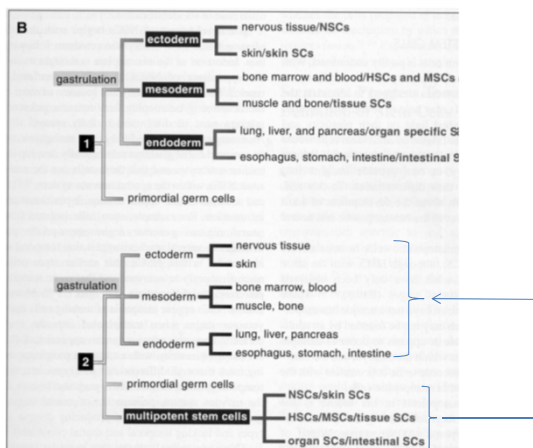
Georg Weitzer



2

4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?

Wenn es adulte Stammzellen gibt: Wie „überleben“ die Stammzellen die Gastrulation unbeschadet ?



Siehe auch <https://stemcells.nih.gov/info/basics/4.htm>

4. Isolation oder Charakterisierung von somatische adulte Stammzellen?

4.1. Iteratives Isolieren und Charakterisieren der angenommenen Stammzellen (saSCs).

4.1.1. Auffinden der saSCs mittels Stammzellmarker-Antikörper.

(z.B.: c-Kit, Sca1, Mdr1, Flk1; Klassische Stammzellenmarker = Oberflächenproteine aus der Hämatologie)

4.1.2. Alternative: Herstellung von transgenen Mäusen, die ein Stammzell-spezifisches Reportergen enthalten.

(z.B.: Isl1 (cardiac), Vav1 (hematopoetic), Nestin (neuronal))

4.1.3. Isolation dieser markierten lebenden (!) Zellen mittels FACS oder MACS.

4.1.4. Analyse der Expressionsmuster, der Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit in vitro.

4.1.5. Identifikation von besseren Markern (oder Markerkombinationen)

(z.B.: Lgr5, Dünndarm; Myf5, Myoblasten und Braune Fettzellen)

4.1.6. Neuerliche Isolierung mittels FACS oder MACS und Analyse, wie oben.

4.2. Isolieren und Kultur der angenommenen Stammzellen mit den Nischenzellen zusammen.

(= Herstellung von Aggregaten aus nicht definierten Zellpopulationen .)

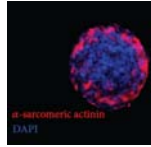
(„outgrowths“; z.B.: Cardiosphären oder Neurosphären)

4.3. Ausständig sind immer noch:

4.3.1. Identifikation der Nischenbedingungen und Kulturbedingungen

4.3.2. Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.

Ad 4.2 Cardiosphären



* 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>

Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. Wie macht man embryonale Stammzellen?
3. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?

(= Zusammenfassung des Kapitels 2 und 3)

Was ist eine Stammzelle?

Eine Stammzelle hat in geeigneter Umgebung die unbegrenzte Möglichkeit sich selbst und somatische Zellen hervorzubringen.

Stammzellen

können sich selbst hervorbringen = Selbsterneuerung* = Zellteilung; Dies kann symmetrisch oder asymmetrisch verlaufen.

bedürfen einer Nische = Überleben nur in Gegenwart von sie umgebenden Zellen und humorale Bedingungen.

können in Nischen auch Ruhen = Sie teilen sich nicht und gehen dabei nicht in die Apoptose.

können sich zu somatischen Zelltypen entwickeln = Sie haben ein spezifisches Entwicklungspotenzial**.

bleiben genotypisch und phänotypisch stabil = Sie sind klonal.

* (self-renewal [SR]); ** Differentiation Potential, dieses ist unterschiedlich!

Georg Weitzer



7

Abstufungen der Potenz von Stammzellen:

Zygote und 2-8 Blastomere, sind autogen in der Mutter → gesamter Organismus + Teile der Plazenta

ICM (~ mESC) → benötigen einen Embryo → gesamter Organismus + Teile der Plazenta;

Epiblast / (primitive Ektoderm (~hESC) → benötigen einen Embryo → alle Zelltypen des Körpers.

Keimbahnstammzellen → nur Oozyten und Spermien.

Somatische adulte Stammzellen → bilden nur Zellen der entsprechenden Organe.

Die **Attribute der Stammzellen** sind:

- | | |
|----------------------|-----------------------------------|
| 1. selbsterneuernd | Unbegrenzte Zellteilung |
| 3. umweltabhängig | Abhängigkeit von einer Nische |
| 2. ruhefähig | Befähigung zu Ruhen |
| 4. klonal | geno- und phänotypisch stabil |
| 5. entwicklungsfähig | Definiertes Entwicklungspotenzial |

Georg Weitzer



8

Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. Wie macht man embryonale Stammzellen?
3. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?

Siehe Kapitel 2.4.5. Embryoid body formation and organoids.

z.B.: Herstellung von Herzzellen aus ESCs, iPSCs oder ntESCs.

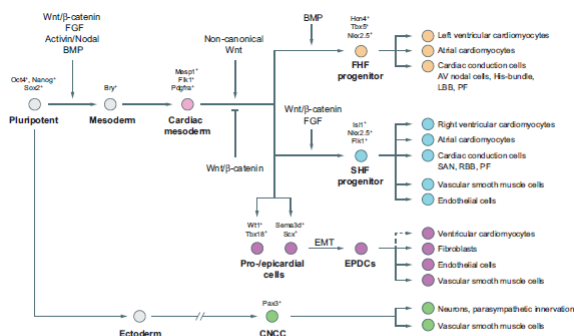


Fig. 2. Specification and progression of the cardiac cell lineage during development. The stepwise commitment of pluripotent cells via various intermediate stages towards mature cardiac cell types within the heart during development. The intermediate stages can be characterized by specific molecular signatures and the progression of differentiation is influenced by various signaling pathways. EPDCs, epicardium-derived cells; EMT, endothelial-to-mesenchymal transition; SAN, sinoatrial node; RBB, right bundle branch; LBB, left bundle branch; PF, Purkinje fibers; AV, atrioventricular.

© 2014. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2014) 141, 4418-4431 doi:10.1242/dev.091538

6. z.B.: Herstellung von Herzzellen aus ESCs, iPSCs oder ntESCs.

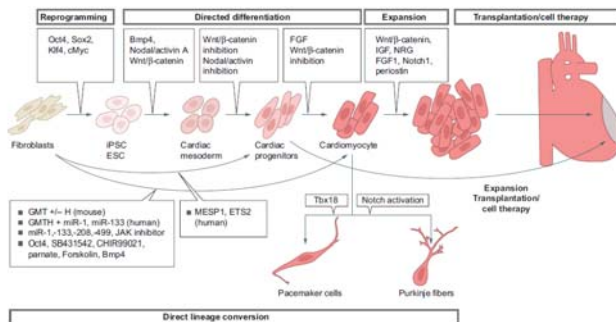


Fig. 3. Strategies to generate cardiomyocytes *in vitro*. Two major strategies exist for the generation of cardiomyocytes *in vitro*: directed differentiation from pluripotent stem cells (PSCs) and direct lineage conversion of somatic cells, usually fibroblasts. Various protocols have been established to guide the stepwise differentiation of PSCs, namely embryonic stem cells (ESCs) or induced pluripotent stem cells (iPSCs), into cardiomyocytes. These protocols closely recapitulate the different stages of cardiac development, and so success depends on the fine tuning of the addition of growth factors and small molecules in a time- and dose-dependent manner. In contrast to directed differentiation, generation of cardiomyocytes via direct lineage conversion does not involve PSCs. Instead, the cells transit directly from one somatic cell type, in this case a fibroblast, to the cardiac lineage. This can be achieved by forced expression of the transcription factors Gata4, Mef2c, Tbx5 (collectively GMT) and Hand2 (H), which have all been shown to be important in the specification and development of the cardiac lineage *in vivo*. Direct lineage conversion to cardiomyocytes can also be achieved by a combination of microRNAs (miRNAs) or a mix of the single transcription factor Oct4 with a specific set of small molecules. In addition, it has also been shown that direct lineage conversion can produce cardiac progenitor cells, which can then be differentiated into cardiomyocytes via a directed differentiation protocol. Once cardiomyocytes have been generated *in vitro*, they can potentially be used for cell therapy approaches to treat cardiac diseases. However, cardiomyocyte expansion is required in order to produce the quantity of cardiomyocytes needed to replace the huge number of muscle cells lost after myocardial infarction.

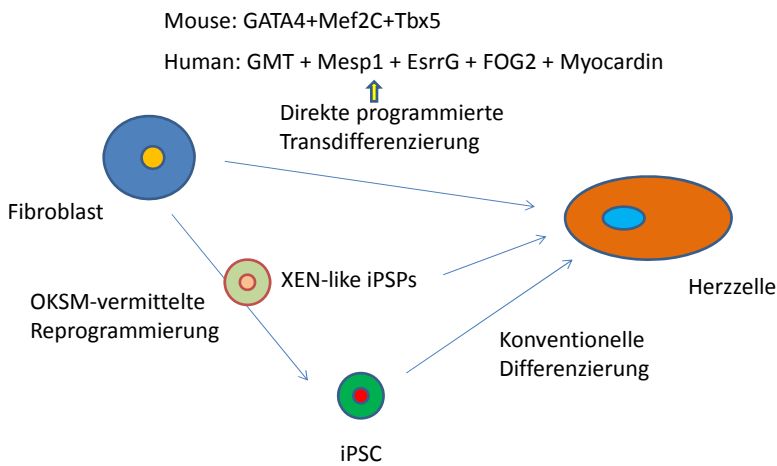
© 2014. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2014) 141, 4418-4431 doi:10.1242/dev.091538

Georg Weitzer



11

6. Herstellung von induzierten Herzzellen:



XEN = extraembryonic endoderm
iPSPs = induced pluripotent progenitor cells

Georg Weitzer

Georg Weitzer ESF-I WS2019



12

Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. Wie macht man embryonale Stammzellen?
3. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.

Aus der Stammzellforschung hervorgehende medizinische Anwendungen

7.1. iPSC und ntESC-Anwendungsmöglichkeiten in der Therapie

- 7.1.1. Herstellung von patientenspezifischen PSCs
→ Erforschung von Ursachen und Therapiemöglichkeiten von Krankheiten polygenetischen Ursprungs.
- 7.1.2. Verwendung dieser Zellen zum Auffinden neuer Krankheits- oder Patienten-spezifischer Medikamente.
- 7.1.3. Grundlage für die Entwicklung von alternative Strategien zur **direkten programmierten Transdifferenzierung** von einem somatischen Zelltyp in einem anderen. z.b. Herzzellen und Leberzellen aus Fibroblasten (siehe Kapitel 6)
- 7.1.4. Herstellung von somatischen Zellen, Geweben und organen für die Therapie.

Siehe eigene Ethik Datei:
Medizinische Anwendungen und Ethik
Nicht Lernstoff, aber bitte lesen und bedenken!

Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. Wie macht man embryonale Stammzellen?
3. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.
 1. Die Instabilität der Genexpression in klonalen Stammzelllinien.
 2. Quorum Sensing in klonalen Stammzellpopulationen.
 3. Nischenbedingungen der somatischen adulten Stammzellen.
 4. Wie wird der Ruhezustand (Quiescence) in Stammzellen aufrecht erhalten?
 5. Genetische und molekulare Grundlagen der Selbstorganisation von differenzierenden Stammzellen.

Georg Weitzer



15

Gerichtete in vitro Differenzierung von Stammzellen

Ohne Beeinflussung entstehen alle Zelltypen.

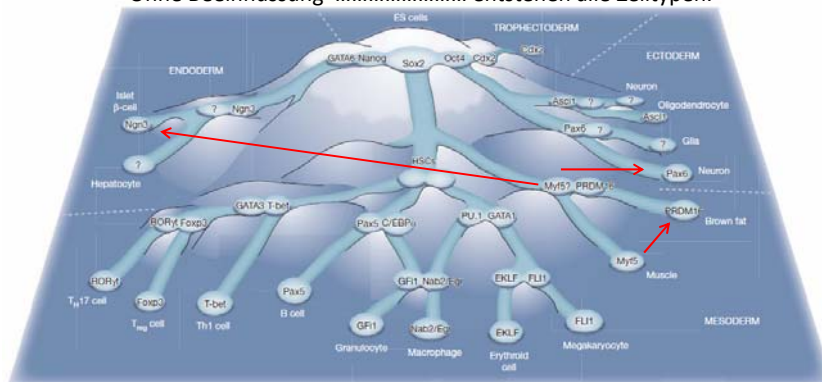


Figure 5 | Transcription factor cross-antagonisms in a cascading landscape of unstable and stable cell states. The territory, represented as a mountain range, depicts all possible solutions of a single regulatory network that specifies cell identity. Robust network states correspond to stably differentiated cell types (deep basins in the low-lying plains) whereas unstable solutions correspond to ridges and slopes in the landscape. The latter are only fleetingly occupied during development and thus unlikely to correspond to observable cell types. ES cells, embryonic stem cells; HSCs, haematopoietic stem cells.

Nach Konrad H. Waddington

Waddington's landscape

A PSC

B PSC

Somatic Cells

<http://jeb.biologists.org/content/218/6/816>

Anything goes Alles geht Alles ist erlaubt Nichts ist verboten

Ist das das Ende der Kausalität?

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

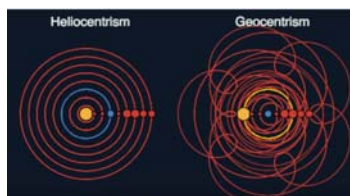
17

Was Sie sich über das Detailwissen hinaus merken sollten:

- Es hat den Anschein, dass Pluripotenz eine dynamische und metastabile Eigenschaft von Zellen im Grundzustand ist.
- Makroskopische Phänomene können konstant sein, das heißt aber nicht notwendiger Weise, dass ihre mikroskopischen Bedingungen immer die selben bleiben müssen (Aufweichung des Kausalitätsprinzips).
- Es gibt eine Grenze wo „Exaktheit“ aufhört! → Biologie, sowie andere Naturwissenschaften wahrscheinlich auch, sind keine exakte Wissenschaften. (→ siehe Kontingenzproblem in den Geisteswissenschaften)
- All das vorgetragene, ist weder wahr noch unbedingt richtig, es ist bloß die derzeit bestmögliche Sichtweise der Dinge.
- Es gibt neben technischen Einschränkungen der Forschung und ihrer Anwendung immer auch ökonomische und ethische Rahmenbedingungen die zu beachten sind.

Die richtige Vorhersage des Phänotypus (die Interpretation des experimentellen Ergebnisses) läßt noch keinen zwingenden Schluss auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu, weil nicht sicher ist, ob alle Prämissen der zugrundeliegenden Arbeitshypothese zutreffend und richtig sind.

Siehe youtube: [„Heliocentrism vs Geocentrism“](#)



Der Phänotyp ist gleich (Anordnung der 8 Planeten nach „einigen“ Jahren). Die Bahnen sind aber total verschieden (so auch molekularen Mechanismen), weil Grundannahme (Geozentrismus) falsch ist.

Apriori wissen wir nicht, wie wir ein System beobachten sollen, worauf es basiert und ob unsere Beobachtung des Ergebnis beeinflusst.

Lehrziel:

Das grundlegende Verständnis der Eigenschaften von Stammzellen, ihre Abgrenzung von somatischen Zellen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Grundlagenforschung, Biotechnologie und Medizin.

Prüfungsfagen:

Was konnte die Stammzellforschung bisher zur Zellbiologie, Entwicklungsbiologie und Biochemie des Lebens beitragen?

Welche technische Möglichkeiten eröffnen sich dadurch, die es erlauben könnten, die Qualität des Lebens der Menschen zu verbessern?

Welche neuen biologischen, aber auch ethischen, ökonomischen, politischen und philosophische Herausforderungen ergeben sich aus dem neuen Wissen über die Biologie der Stammzellen?

Diese drei Grundthemen haben die gesamte Vorlesung durchzogen und werden in 5, auf einen bestimmten Aspekt des vorgetragenen Inhalts konkretisierte Fragen, zu beantworten sein.