

1. Entstehung der Stammzellforschung  
- Historischer Überblick
2. Herstellung von embryonalen 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?**  
Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
7. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

4. Wie isoliert **und macht** man somatische adulte Stammzellen?

4.1. Woher kommen die somatischen Stammzellen?

Siehe frühe Embryogenese:

Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria am Beispiel der Maus

### Prägastrulationsentwicklung des Blastozysten

**A** **B** **C** **D** **E** **F** **G** **H**

E0      32 Zellen      64-128 Zellen

m: E2.5      m: E3.0  
h: E3.5      h: E4.5

← Implantation ←

E 6.5      E 4.5      m: E4.5  
h: E6.0

Georg Weitzer      MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN      3

### Prägastrulationsentwicklung des Blastozysten (schematisch) (Wiederholung)

Animal → Vegetal

2nd polar body

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**

Embryonic

Polar TE

ICM

Mural TE

Blastocoele

Abembryonic

Epiblast

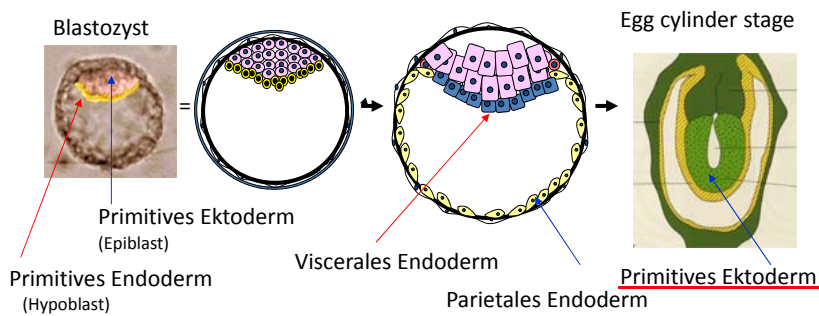
PrE

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

**Compaction**      **Trophectoderm formation**      **Primitive endoderm formation**

Georg Weitzer      MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN      4

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

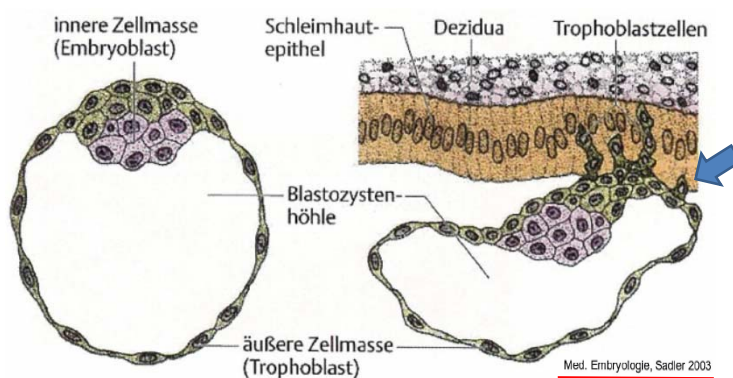


Georg Weitzer



5

Nidation / Einnistung:

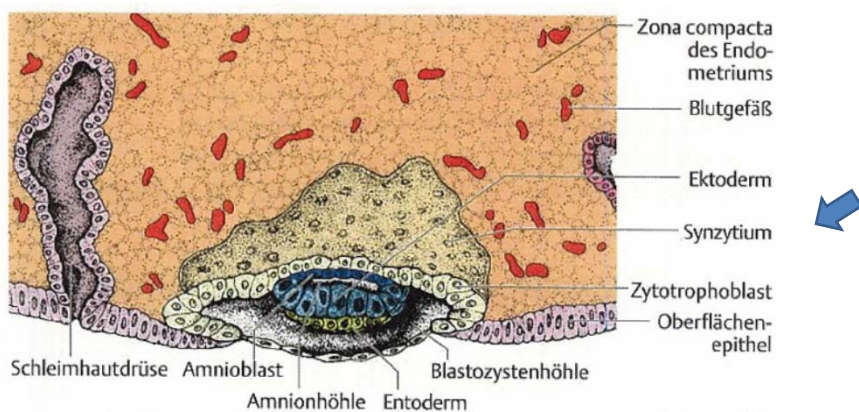


Georg Weitzer



6

Einnistung: Homo sapiens, ab Tag 7

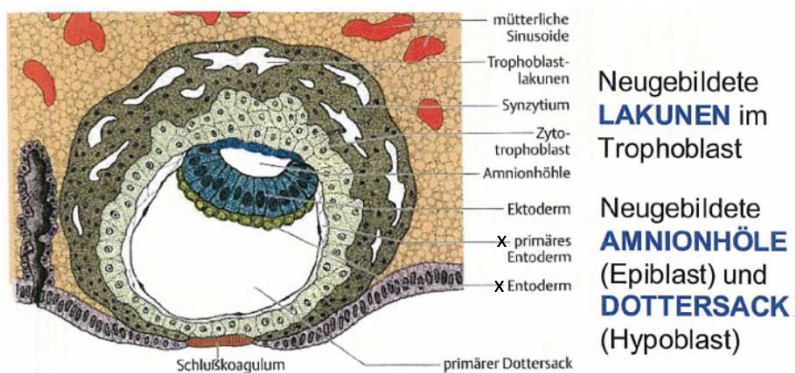


Georg Weitzer



7

Einnistung: Homo sapiens, ca. Tag 9



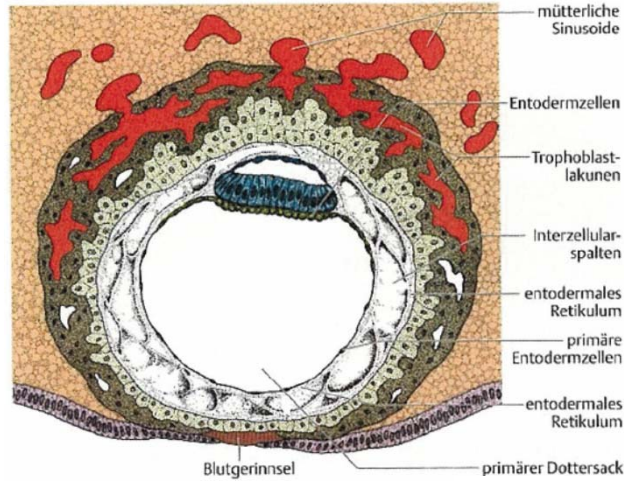
x = extraembryonales Endoderm

Georg Weitzer



8

Homo sapiens, ca. Tag 12



Dann folgt die Gastrulation.

Georg Weitzer



9

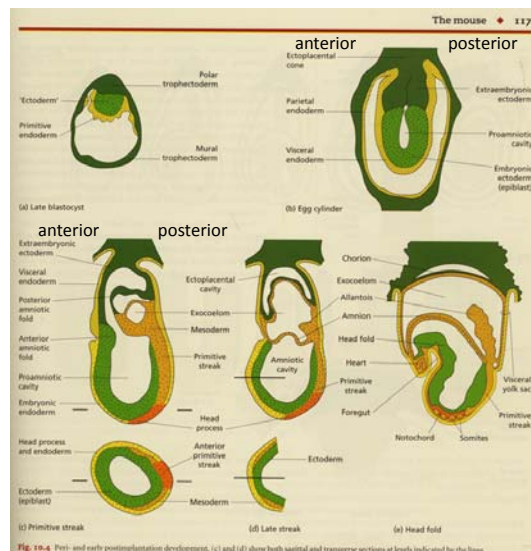


Fig. 10.4 Peri- and early postimplantative development. (c) and (d) show both sagittal and transverse sections at levels indicated by the lines.

Georg Weitzer



10



The diagram illustrates the early stages of mouse embryonic development. It starts with an unfertilized egg and sperm, leading to fertilization, zygote, two-cell embryo, and three-cell embryo. Subsequent cleavage leads to the morula stage, which differentiates into the trophectoderm (mural and polar) and the inner cell mass (epiblast and primitive endoderm). A lineage tree on the right details these derivatives: Mural trophectoderm leads to Trophoblast giant cells and Ectoplacental cone; Polar trophectoderm leads to Extraembryonic ectoderm and Extraembryonic mesoderm; Epiblast leads to Embryonic mesoderm, Definitive endoderm, and Embryonic ectoderm; Primitive endoderm leads to Visceral endoderm and Parietal endoderm.

Gene expression patterns are shown for *Hex*, *Wnt3*, *Eomes*, and *Cripto* at 5.5 and 6.0 days post-coitum (dpc). *Hex* and *Wnt3* are expressed in the dorsal (D) region, while *Eomes* and *Cripto* are expressed in the ventral (V) region. The anterior (A) and posterior (P) regions are also indicated.

Current Opinion in Genetics & Development

From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo.  
 Lu CC, Brennan J, Robertson EJ

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

11

**Woher kommen die somatischen Stammzellen?**

**Die extra-embryonale Lage der Primären Keimzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen**

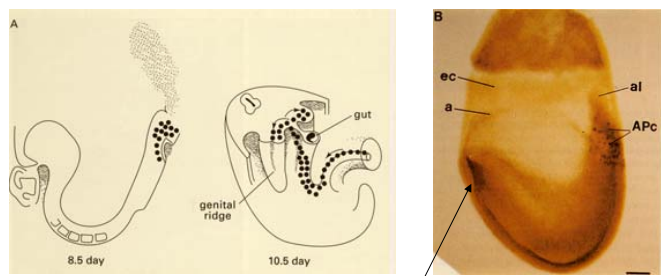
The diagram shows an E7.5 mouse embryo in a sagittal section. Key structures labeled include the Chorion, Amnion, Mesendoderm, Head Process, Node, and Primitive Streak. A red dot indicates the location of the first hematopoietic precursors (Erste Hämatopoetische Vorläuferzellen) in the visceral endoderm. An inset shows a magnified view of the extra-embryonic cavity, highlighting the Allantois, Visceral Endoderm, PGCs (Primordial Germ Cells), Niche/Support Cells, and Primitive Streak.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

12

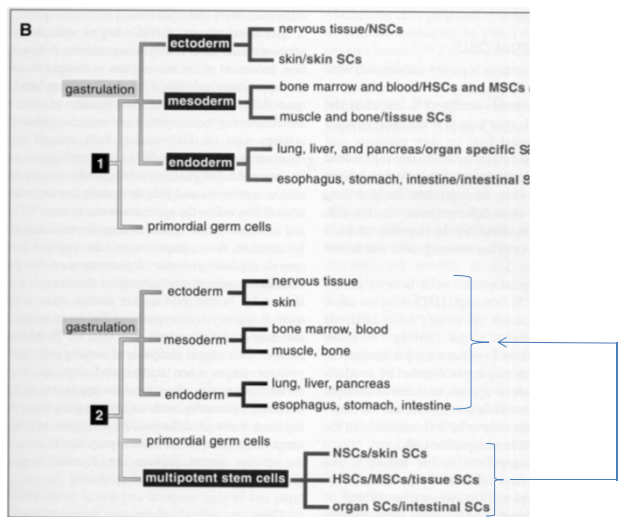
Das Einwandern der primären Keimzellen in die Geschlechtsorgane



Neuroektoderm des Kopfbereiches

Für weitere besprochene Details siehe  
 McLean, D. J. (2006). Vertebrate reproductive stem cells: recent insights  
 and technological advances. Semin Cell Dev Biol 17, 534-539.  
 Das pdf-file ist unter Lernunterlagen zugänglich.

Wie „überleben“ die Stammzellen die Gastrulation unbeschadet ?



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

Somatische Stammzellen werden „überall“ gefunden und beschrieben aber nicht isoliert.  
(siehe auch Kapitel 1 Historischer Überblick)

Letzte Beispiele: Lgr5-positive Leberstammzellen (Hans Clevers Lab)

Retina- Stammzellen im Aug des Zebrafisches (nur in situ mit  
unspezifischer Anfärbung (eGFP, tTomato oder CFP))

Wie könnte man somatische Stammzellen isolieren, charakterisieren und mit den in situ  
vorliegenden Zellen vergleichen?

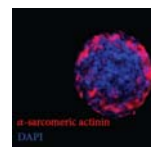
#### 4.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 4.2.1. 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<sup>+</sup>-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)
- Identifikation von besseren Markern (Markerkombinationen)
  - Lgr5 Dünndarm, Myf5 Myoblasten und Braune Fettzellen
- Neuerliche Isolierung mittels FACS oder MACS
- Identifikation der Nischenbedingungen und Kulturbedingungen
- Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.



## 4.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 4.2.2. Isolieren und Kultur gemeinsam mit den Nischenzellen zusammen
- Herstellung von Aggregaten aus nicht definierten Zellpopulationen („outgrowths“)
  - Z.B.: Cardiospheres\*
- 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, Laurentiu M. Popescu, Tiziano Moccetti, and Giuseppe Vassalli  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/916837>

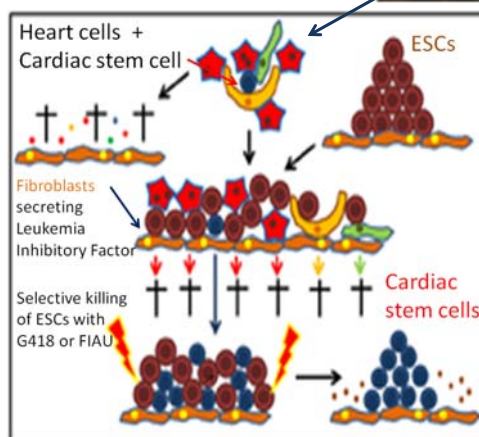


Georg Weitzer

17

## 4.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 4.2.3. Selektion von proliferierenden Zellen unter Annahme einer Nische
- Co-kultur von Geweben mit ESCs und „Nischen Zellen“
- Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.
- Identifikation der Nischen- und Kulturbedingungen
- Charakterisierung der Zelllinien und Vergleich mit primären Zellen.



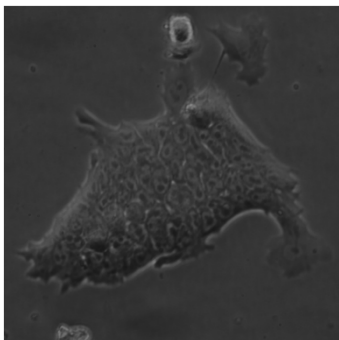
[Hoebaus et al., 2013](#)



Georg Weitzer

18

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.

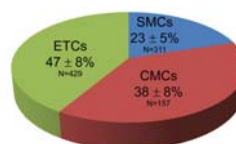


Eine Kolonie der Cardiovascular Progenitor Cells

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 ektodermalen Ursprungs.

## 5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?

(Zusammenfassung von dem in Kapitel 1 bis 4 gehörten.)

- Uneingeschränkte Selbsterneuerungsfähigkeit – self renewal  
Symmetrische und asymmetrische Zellteilung ist möglich.
- Benötigen eine Nische - niche (humorale und Zell-Zell Einflüsse)
- Klonalität (unter Nischenbedingungen) – clonality  
Sie haben uneingeschränkt genotypische und phenotypische Stabilität.
- Ruhefähigkeit (unter instruierenden Nischenbedingungen) - dormancy (Hibernation)
- Differenzierungspotenzial zu somatischen Zellen. – differentiation potential  
Je nach Stammzelltyp unterschiedlich ausgeprägt.

→ Eine Stammzelle hat in geeigneter Umgebung das unbegrenzte Potenzial zur phänotypisch stabilen Selbsterneuerung, zum Ruhen, und zur Hervorbringung von somatischen Zellen.

## 6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?

Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.

- 6.1. Embryoid bodies aus ESCs, iPSCs und ntESCs
- 6.2. Organoids aus ESCs, iPSCs und ntESCs
- 6.3. Direkte Re-Programmierung von somatischen Zellen; hauptsächlich Fibroblasten
- 6.4. Differenzierung aus iPSC- Zwischenstufen

6.5. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik:

Herstellen von transplantierbaren patienten-spezifische somatischen Zellen.

### 6.1. Embryoid bodies aus ESCs, iPSCs und ntESCs

(siehe auch Pluripotenzbeweis)

- Aggregation von ca. 800 ESCs zu Embryoid Bodies (EBs) in Tropfen für 4.5 Tage löst Gastrulations-ähnliche Prozesse aus.
- Transfer der EBs auf extrazelluläre Matrix (EMC)- Surrogat = Gelatine a, Tag 4.5 löst Implantations-ähnliche Prozesse und weitere Differenzierung der ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Zelltypen aus.
- Alle Zellarten des Säugetierkörpers können zwischen Tag 6 und ca. 50 entstehen.

ZB: Herzzellen entstehen ab Tag 7

glatte Muskelzellen ab Tag 15

## Die in vitro Differenzierung von Stammzellen zu Embryoid Bodies

– ein Modell für die frühe Embryogenese?

Wie entstehen somatische Zellen in Embryoid Bodies?

Ist die Gastrulation chaotisch, oder gibt es reproduzierbare morphologische Strukturen?

Vergleich der Entwicklungsabschnitte in vivo und in vitro

In der Maus

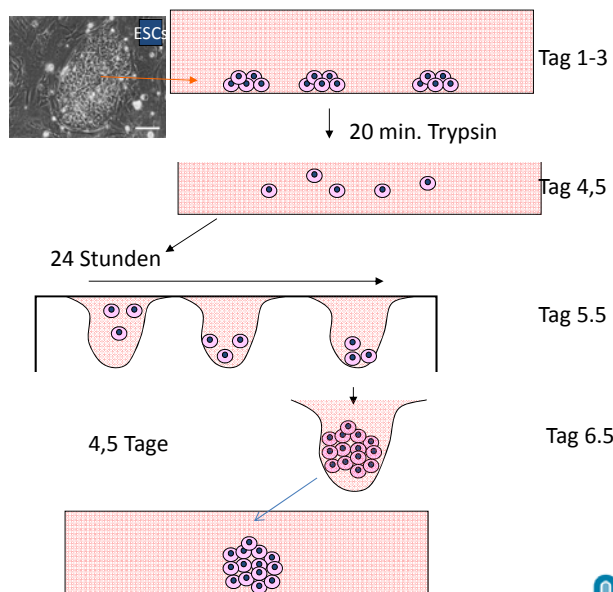
6.1.1 Pre-implantations Entwicklung: Tag 0 - 4

6.1.2 Pre-gastrulations Entwicklung : Tag 4 - 7

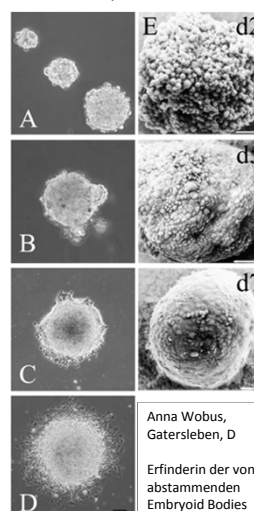
6.1.3 Gastrulation / Keimblattbildung: Tag 7 - 9...

Georg Weitzer

### Herstellung von Embryoid Bodies

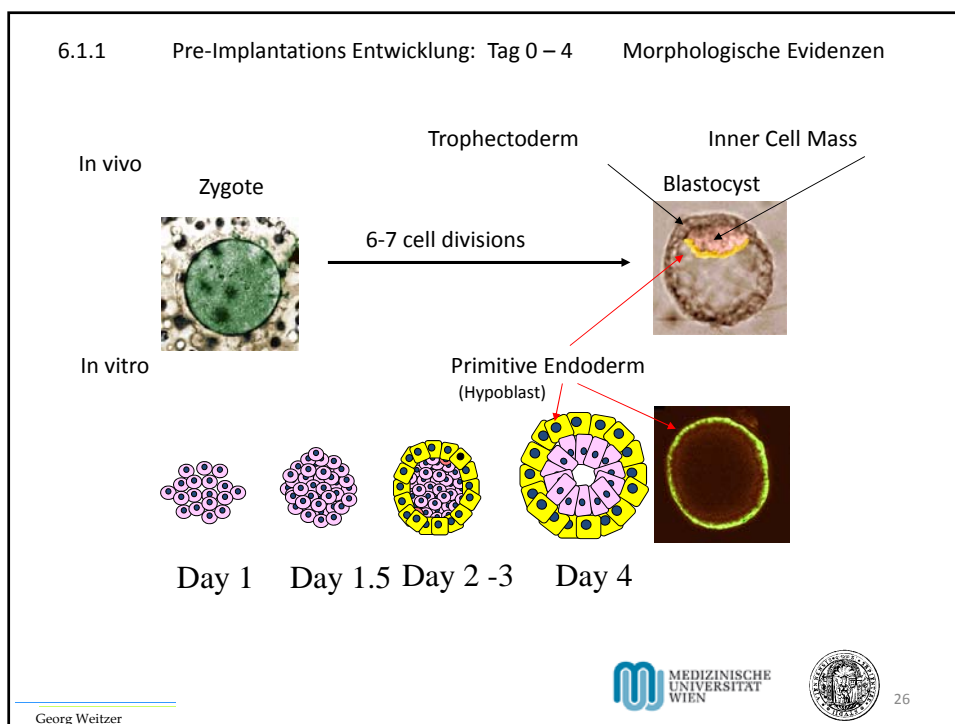
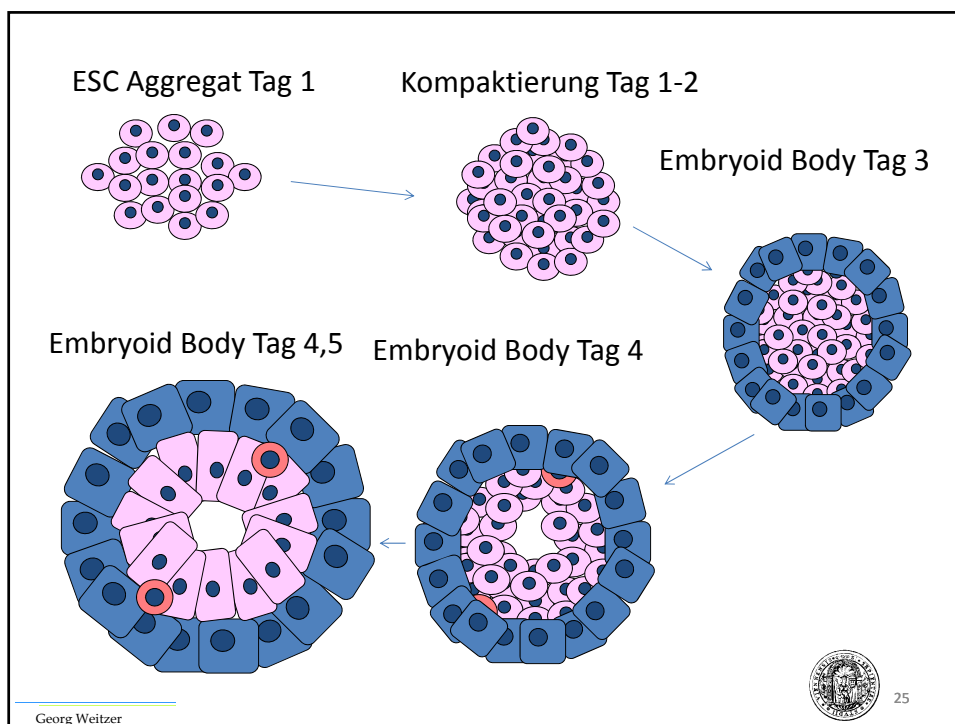


### Embryoid Bodies



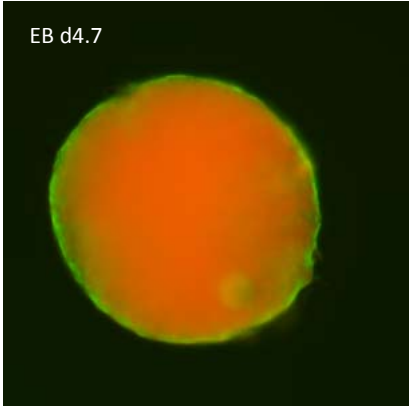
Anna Wobus,  
Gatersleben, D  
Erfinderin der von ESC  
abstammenden  
Embryoid Bodies  
(1985)

Georg Weitzer

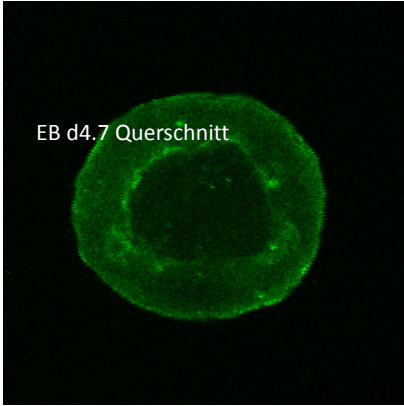


Quelle:CDvor2000

EB d4.7





EB d4.7 Querschnitt



Der Hypoblast und Epiblast bildet sich, aber kein Trophektoderm.

Embryoid Bodies verhalten sich wie die Innere Zellmasse.


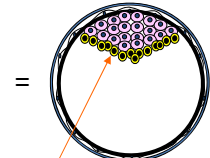
Kompaktierung der ESCs kann nicht wirklich mit der Kompaktierung der Blastomere verglichen werden.

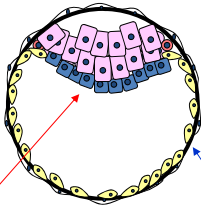


27

Georg Weitzer

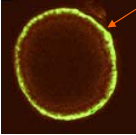
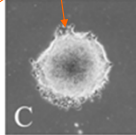
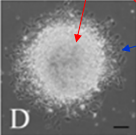
### 6.1.2. Pre-gastrulations Entwicklung: Day 4-7 Morphologische Evidenzen

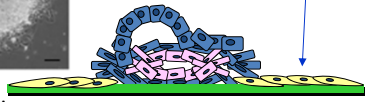
In vivo
Implantation




=




In vitro
Primitive Endoderm
Visceral Endoderm
Parietal Endoderm

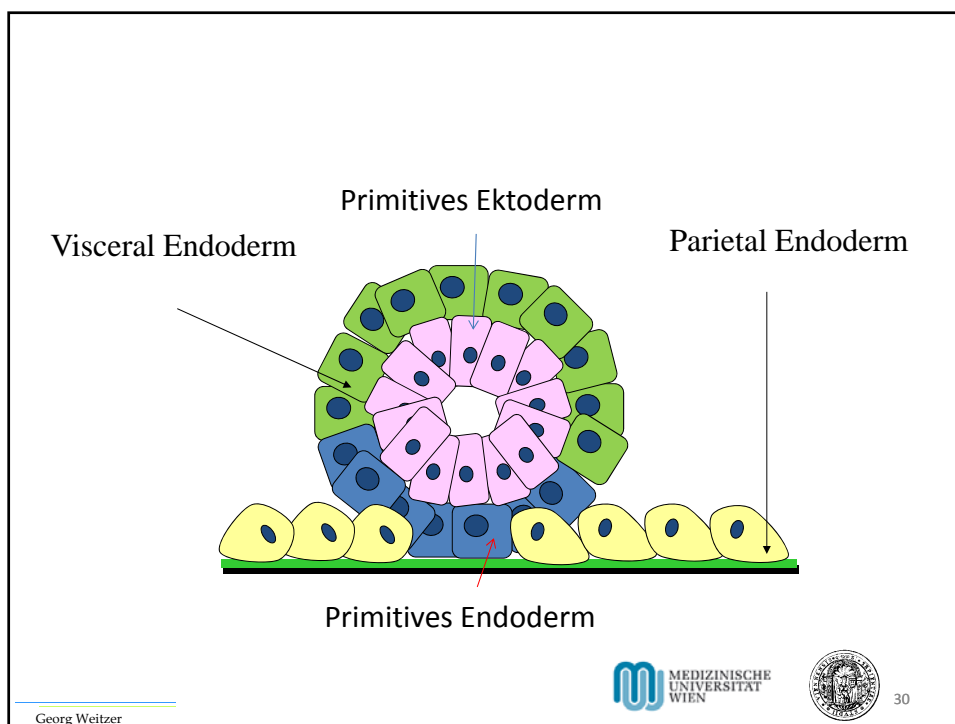
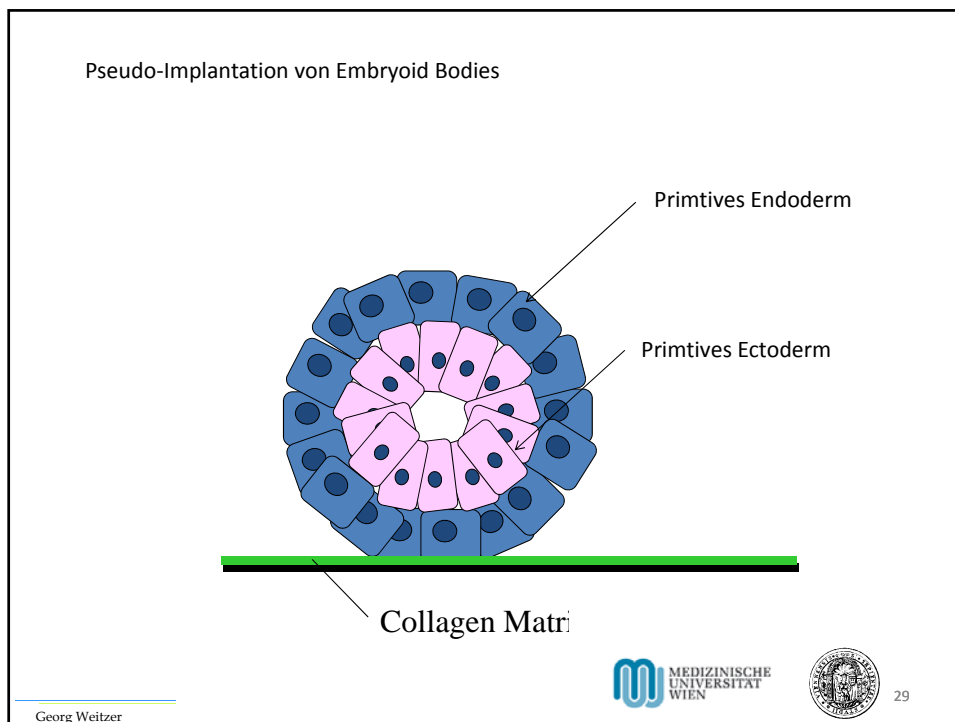

C

D


Pseudo-Implantation




28

Georg Weitzer





6.1.1 Pre-Implantations Entwicklung: Tag 0 – 4 Morphologische Evidenzen

In vitro

Visceral Endoderm

Parietal Endoderm

Dolichos biflorus agglutinin

Pseudo-implantation

$\beta$ -catenin

➔ Extra-embryonales Gewebe bildet sich genau so, wie um den Embryo.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

31

Primitve Ektoderm

Mesoderm

Definitives Endoderm ?

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

32

Ist die Entstehung der somatischen Zellen während der Gastrulation chaotisch?

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

33

### 6.1.3. Gastrulation : Tag 7-9... Morphologische Evidenzen

In vivo

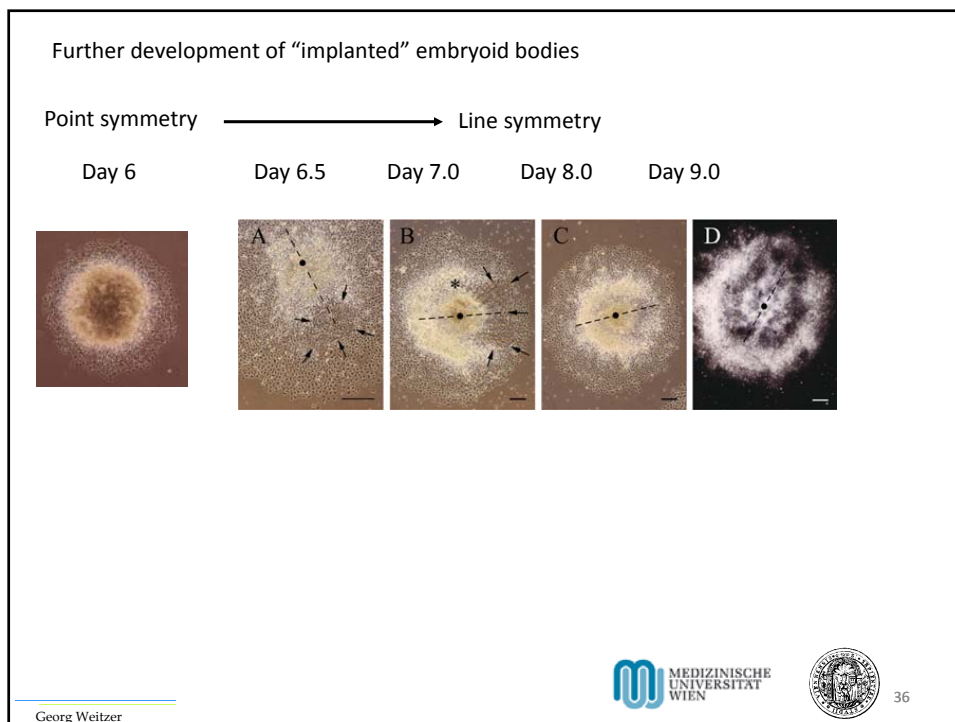
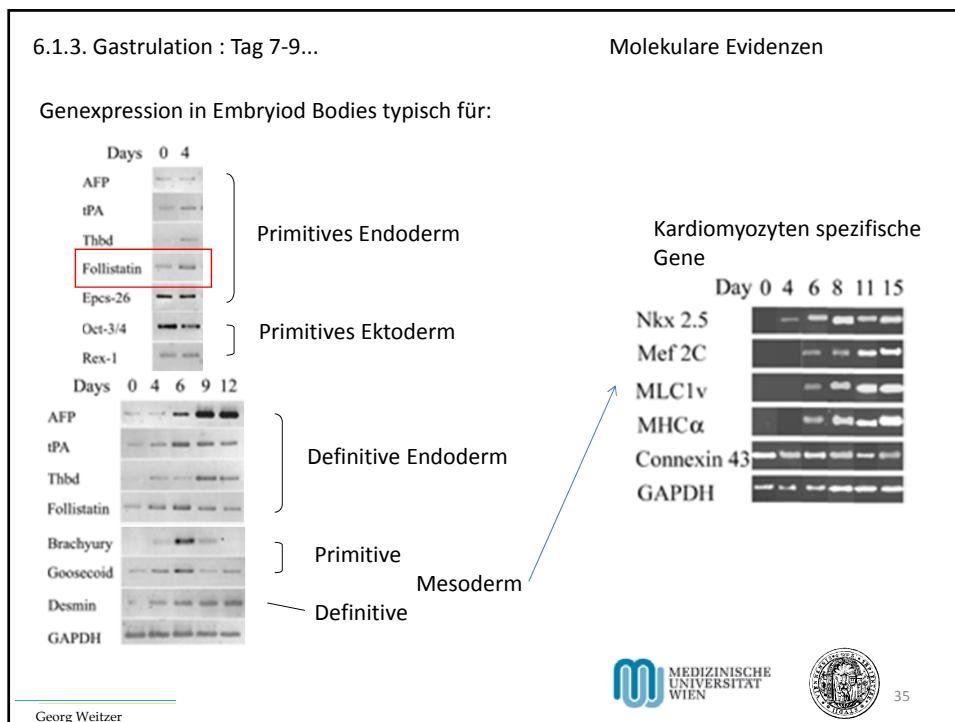
	Egg cylinder stage	Primitive streak stage	Head fold stage
In vivo			
In vitro	Prim. Ectoderm	Primitive Mesoderm	Cardiocytes
In vitro			
Embryoid Body	Day 5	Day 6 (T <sup>+</sup> Zellen)	Day 8
		Erythrocytes	

Der zeitliche Ablauf der Keimblattentwicklung in vitro ist fast gleich wie bei der Gastrulation in vivo.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

34



### Mesodermbildung in Embryoid Bodies

Primitve Mesoderm

Cardiomyocyt

Brachyury

MHC $\alpha$

Braking line symmetry

Area where mesodermal cells emerge

left right

upper lower

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

Embryoid Bodies sind asymmetrisch!

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

37

### Anwendungsmöglichkeiten:

Murine Embryo, day 7

Blastocyst, day 3.5

Embryonic Stem Cells

Embryoid Body, day 7

**In vivo**

**In vitro**

Embryoid bodies erlauben eine relative einfache Bestimmung der Potentialität von Stammzellen

... die Untersuchung von molekularen und zellulären Prozessen während der Embryogenese, die experimentell im Embryo nicht erfassbar sind.

... die Herstellung somatischer Zellen für die Therapie.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

38

## 6.2. Organoids aus ESCs, iPSCs und ntESCs

... Entstehen aus EBs unter speziellen Kulturbedingungen (sind eigentlich nur ein neuer Name für die seit 1986 bekannten und publizierten (Anna Wobus, Gatersleben) EBs.

1. Künstliche „Augen“ 2011
2. Künstliche „Hirne“ 2013
3. .... Siehe Lernunterlagen
4. Ad künstliche Kinder: Endometrium Organoide aus hESCs auf dem Weg zur künstlichen Plazenta. Siehe <https://www.nature.com/articles/ncb3516>

Oder nur Zelltypen, wie

1. Pancreatic  $\beta$ -cells  $\rightarrow$  Typ I Diabetes mellitus
2. Oligodendrozyten  $\rightarrow$  Querschnittlähmung
3. retinal pigment epithelium  $\rightarrow$  Macula degeneration

## Methoden der Induktion der Stammzellendifferenzierung

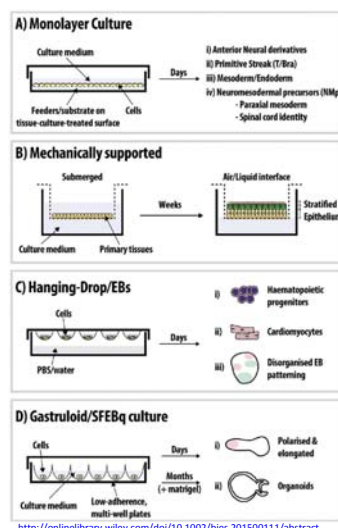
### Definition of Terms

**Genetic Program:** In Developmental Biology, a genetic program is a temporal sequence of changes of state of a cell or cell population, brought about by the decoding of a temporal order of gene expression scripted in the genome.

**Self-Assembly:** The formation of an ordered structure from non-equivalent parts as a system moves towards equilibrium.

**Self-Organization:** The spontaneous emergence of order or asymmetry from an initially homogeneous starting population that occurs in an energy-dependent manner.

**Genetically-Encoded Self-Assembly:** A genetic program that contains cell autonomous instructions as well as signalling events which can induce emergent properties.





Gerichtete in vitro Differenzierung von Stammzellen

Ohne Beeinflussung ..... entstehen alle Zelltypen.

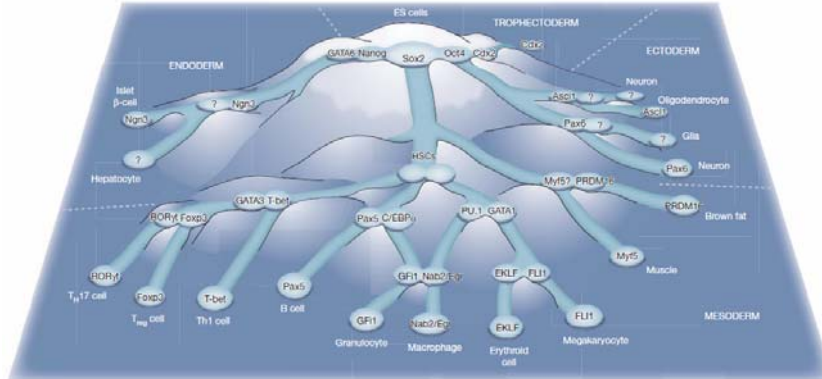
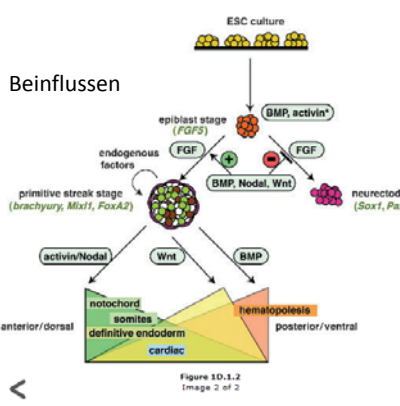


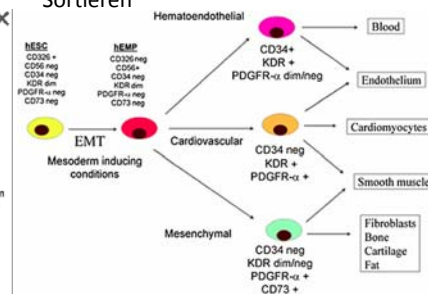
Figure 5 | Transcription factor cross-antagonisms in a cascading landscape of unstable and stable cell states. The territory, represented as a mountain range, depicts all possible solutions of a single regulatory network that specifies cell identity. Robust network states correspond to stably differentiated 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

BEISPIELE FÜR GERICHTETE DIFFERENZIERUNG

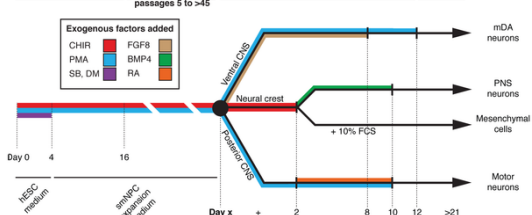


Sortieren



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

Aus: Reinhardt P, Glatza 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>

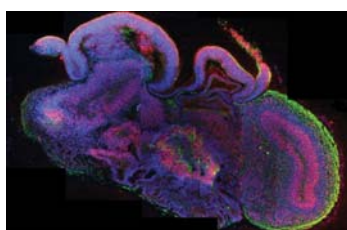
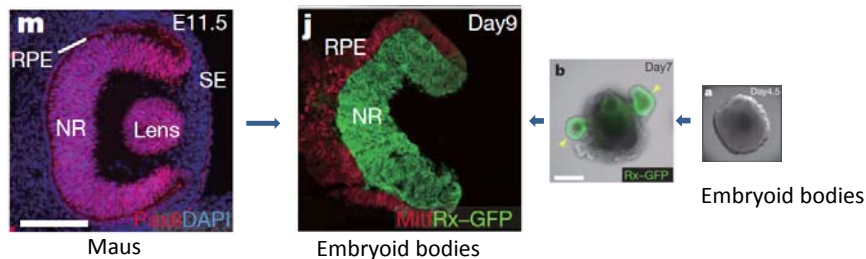


Beispiele für Organoide:

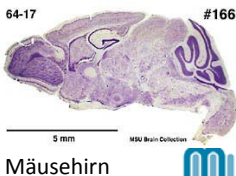
Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture

Mototsugu Eiraku<sup>1,2</sup>, Nozomu Takata<sup>1</sup>, Hiroki Ishibashi<sup>3</sup>, Masako Kawada<sup>1</sup>, Eriko Sakakura<sup>1,2</sup>, Satoru Okuda<sup>3</sup>, Kiyotoshi Sekiguchi<sup>4</sup>, Taiji Adachi<sup>3,5</sup> & Yoshiki Sasai<sup>1,2</sup>

doi:10.1038/nature09941 7 APRIL 2011 | VOL 472 | NATURE | 51



**Cerebral organoids model human brain development and microcephaly**  
 Madeline A. Lancaster,<sup>1</sup> Magdalena Renner,<sup>1</sup> Carol-Anne Martin,<sup>2</sup> Daniel Wenzel,<sup>1</sup> Louise S. Bicknell,<sup>2</sup> Matthew E. Hurles,<sup>3</sup> Tessa Homfray,<sup>4</sup> Josef M. Penninger,<sup>1</sup> Andrew P. Jackson<sup>2</sup> & Juergen A. Knoblich<sup>1</sup>  
 Nature Volume: 501, Pages: 373–379 Date published: (19 September 2013)  
 DOI: doi:10.1038/nature12517 Published online 28 August 2013



Georg Weitzer

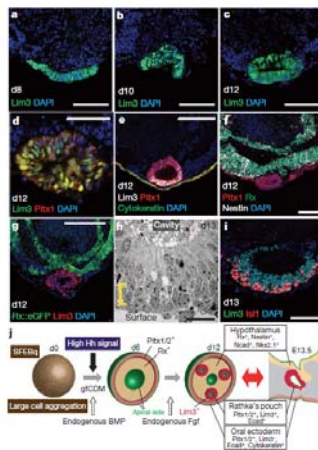


43

Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture

Suga et al., 2011 | VOL 480 | NATURE | 57 doi:10.1038/nature10637

The adenohypophysis (anterior pituitary) is a major centre for systemic hormones. At present, no efficient stem-cell culture for its generation is available, partly because of insufficient knowledge about how the pituitary primordium (Rathke's pouch) is induced in the embryonic head ectoderm. Here we report efficient self-formation of three-dimensional adenohypophysis tissues in an aggregate culture of mouse embryonic stem (ES) cells. ES cells were stimulated to differentiate into non-neural head ectoderm and hypothalamic neuroectoderm in adjacent layers within the aggregate, and treated with hedgehog signalling. Self-organization of Rathke's-pouch-like three-dimensional structures occurred at the interface of these two epithelia, as seen *in vivo*, and various endocrine cells including corticotrophs and somatotrophs were subsequently produced. The corticotrophs efficiently secreted adrenocorticotropic hormone in response to corticotrophin releasing hormone and, when grafted *in vivo*, these cells rescued the systemic glucocorticoid level in hypopituitary mice. Thus, functional anterior pituitary tissue self-forms in ES cell culture, recapitulating local tissue interactions.



**Figure 2 Spontaneous generation of Rathke's pouch-like vesicles in ES cell culture.** a–c, Morphogenesis of Lim31 epithelia. d–g, Immunostaining of day-12 pouch vesicles and surrounding tissues for Pitx1 (red, d–f), Lim3 (green, d, white, e; red, g), pancytokeratin (green, e), nestin (white, f) and Rx (green, f, g) in ES cell culture. h, Electron microscopy of the day-13 pouch. Delimiting cells on the basal side (bracket). i, Islet11 cells in the basal zone of the day-13 pouch. j, Schematic of in vitro generation of Rathke's pouches. Scale bars, 100 μm (a–c, e–g); 50 μm (d, i); 20 μm (h).

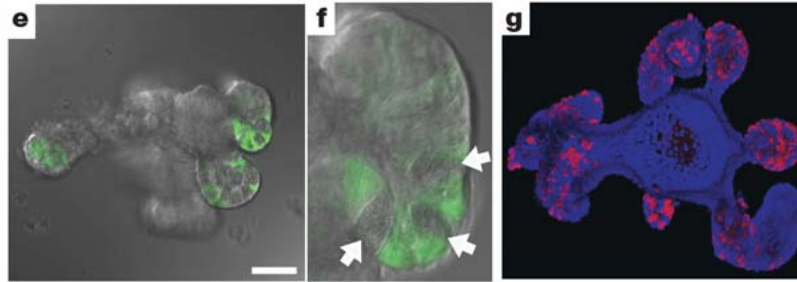
Georg Weitzer



44

### 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>+</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

Georg Weitzer

M MEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN



45

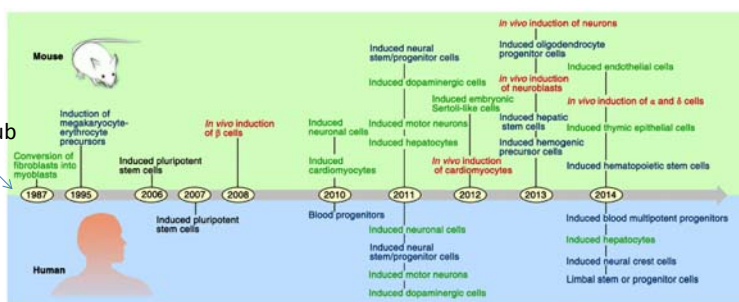
Folgendes wird in der 7. Doppelstunde noch besprochen werden.

### 6.3. Direkte Re-Programmierung von somatischen Zellen - Induzierte Transdifferenzierung

Quelle: hauptsächlich Fibroblasten

Methode: Kombination von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, zwischenzeitliches FACS-en und SySMs (chemical compounds)

Harold Weintraub



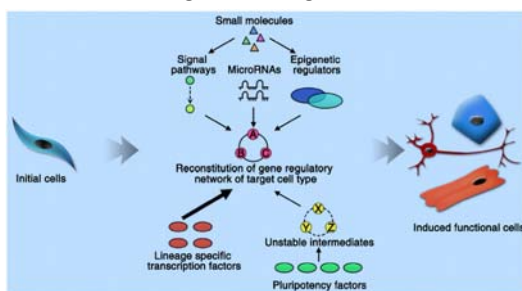
[http://www.cell.com/cell-stem-cell/references/S1934-5909\(16\)30261-2](http://www.cell.com/cell-stem-cell/references/S1934-5909(16)30261-2)

Georg Weitzer



47

### Methoden der direkten Re-Programmierung



Georg Weitzer

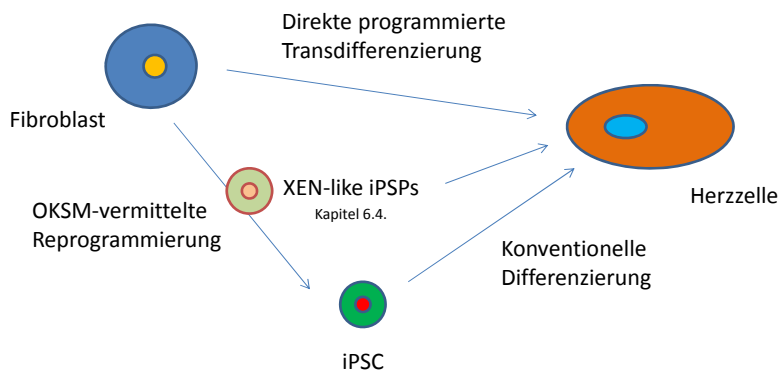


48

6.3.1 Herstellung von induzierten Herzellen:

Mouse: GATA4+Mef2C+Tbx5

Human: GMT + Mesp1 + EsrrG + FOG2 + Myocardin

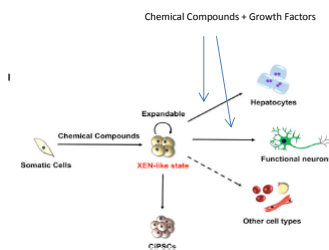


XEN = extraembryonic endoderm  
iPSPs = induced pluripotent progenitor cells

6.4. Differenzierung oder Programmierung von somatischen Zellen aus iPSC- Zwischenstufen

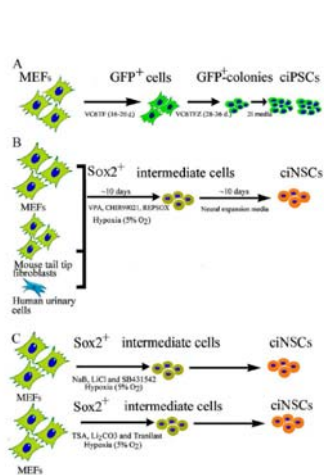
**Direct Reprogramming of Fibroblasts via a Chemically Induced XEN-like State**

Xiang Li,<sup>1,2</sup> Defang Liu,<sup>1,2,3</sup> Yantao Ma,<sup>1,4,5</sup> Xiaomin Du,<sup>1,2,5,6</sup> Junzhan Jing,<sup>3,8</sup> Lipeng Wang,<sup>1,6</sup> Bingqing Xie,<sup>2</sup> Da Sun,<sup>2</sup> Shaoliang Sun,<sup>7</sup> Xueqin Jin,<sup>8</sup> Xu Zhang,<sup>1</sup> Ting Zhao,<sup>1</sup> Jingyang Guan,<sup>1</sup> Zexuan Yi,<sup>1,5</sup> Weifeng Lai,<sup>1,4</sup> Ping Zheng,<sup>7</sup> Zhuo Huang,<sup>1,8</sup> Yanzhong Chang,<sup>6</sup> Zhen Chai,<sup>3,7</sup> Jun Xu,<sup>1</sup> and Hongkui Deng<sup>1,2,10,\*</sup>



XEN-like state of ciPSCs allow the direct reprogramming of fbs to  
iNs (Neurons)  
iHCs (Hepatocytes)

## 6.4. Differenzierung aus iPSC- Zwischenstufen

International Journal of  
Molecular Sciences

MDPI

Review

Chemically Induced Reprogramming of Somatic Cells  
to Pluripotent Stem Cells and Neural CellsDhruva Biswas<sup>1</sup> and Peng Jiang<sup>1,2,3,\*</sup>

**Figure 1.** Chemically induced reprogramming of ciPSCs and ciNSCs. (A) A schematic diagram showing direct iPSC reprogramming from MEF using the small-molecule cocktail, VC6TF (VPA, CHIR99021, E-616542, Tranylcypromine, Forskolin), and VC6TFZ (VPA, CHIR99021, E-616542, Tranylcypromine, Forskolin and DZNep) followed by application of two MEK and GSK3- $\beta$  inhibitors, also known as "2i", to finalize chemical reprogramming. Using a doxycycline (DOX)-inducible GFP-Oct4 expression screening system, ectopic GFP-Oct4 expression was induced during the first round, followed by DOX withdrawal and small molecule treatment. Epigenetic modulators, particularly 3-deazaneplanocin A (DZNep), an S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, were later added along with MEK and GSK3- $\beta$  inhibitors (2i), to achieve complete reprogramming; (B) The scheme of direct ciNSC reprogramming from MEFs, mouse tail fibroblasts, and human urinary cells using the small-molecule cocktail VCR (VPA, CHIR99021, and Repsox) and physiological hypoxia; (C) A schematic diagram showing direct ciNSC reprogramming from MEF using alternative cocktails NLS (sodium butyrate (NaB), Lithium chloride (LiCl) and SB431542) and Trilastat (Trichostatin A (TSA), Lithium chloride (Li2CO3) and Trilastat) and physiological hypoxia (5% O<sub>2</sub>).

 MEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN


51