

Regenerative Therapie des Herzens durch Aktivierung endogener Stammzellen

MolMed I VO 2017

17. 5. 2017

Ao. Univ. Prof. Dr. **Georg Weitzer**
Zentrum für Medizinische Biochemie,
Medizinische Universität Wien

Sie finden die Vorlesung und Lernunterlagen auf meiner Homepage unter dem URL

<http://homepage.univie.ac.at/georg.weitzer/>

Inhalt

- Herzerkrankungen
- Therapiemöglichkeiten
- Entstehung, Anatomie und Funktionsweise des Herzens
- Regenerationsvermögen des Herzens
- Künstliche (therapeutische) Regeneration des Herzens mit Zellen
- Welche Zelltypen stehen zur Verfügung?
- Therapieversuche
 - mit Stammzellen und Muskelzellen
 - durch Aktivierung der endogenen Stammzellen.

Was sind Herzerkrankungen?

Wie entstehen sie?

Wie werden sie klassifiziert?

Herzerkrankungen (Kardiomyopathien) = Herzinsuffizienz = beeinträchtigte Herzfunktion

...ist die häufigste Ursache von vorzeitigem Tod (WHO, 2016, 31% der Todesursachen, weltweit)

Ursachen:

Koronare Herzkrankheit z.B.: chronische Atherosklerose der Herzkranzarterien oder akuter Herzinfarkt

Abnormer Bluthochdruck = Hypertonie

Genetisch bedingte (angeborene) Herzfehler (1%)

Anatomische Anomalien (Stenosen, Herzklappenfehler, Scheidewandlöcher) z.B. Holt-Oram Syndrom

Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien)

Weitere Risikofaktoren sind:

Übergewicht z.B. hohe Cholesterinwerte Chronischer Bluthochdruck (Hypertonie)

Unbehandelte Zuckerkrankheit (Diabetes melitus) Übermäßiges Rauchen

Infektiöse Endokarditis (bakteriell, viral) Rheumatische Herzerkrankungen (Autoimmunerkrankungen)

Konsequenz:

Herzversagen wegen fortschreitender, die Herzanatomie betreffende Umbauprozesse = „Remodeling“.

Therapie:

Medikamentös bei leichten Ausformungen → mechanische Kreislaufunterstützung (Pumpen) → Herztransplantation oder künstliches Herz oder zukünftig alternativ „Stammzelltherapie“.

Klassifikationen der Herzerkrankungen

Klassifikation der [New York Heart Association](#) (NYHA) [I - IV] und der [American Heart Association](#) (AHA) [A - D]

NYHA I

Keine körperliche Einschränkung. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.

Stadium A: Hohes Herzinsuffizienzrisiko, da Risikofaktoren vorliegen, die stark mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz assoziiert sind; keine strukturelle Herzerkrankung, zuvor noch nie Herzinsuffizienzsymptome.

NYHA II

Leichte Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit. Keine Beschwerden in Ruhe aber Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris bei alltäglicher körperlicher Belastung.

Stadium B: Strukturelle Herzerkrankung, die eng mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz assoziiert ist, bisher keine Herzinsuffizienzsymptome.

NYHA III

Höhergradige Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris bei geringer körperlicher Belastung.

Stadium C: Frühere oder derzeitige Herzinsuffizienzsymptome bei struktureller Herzerkrankung.

NYHA IV

Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Immobilität.

Stadium D: Fortgeschrittene strukturelle Herzerkrankung und schwere Herzinsuffizienzsymptome in Ruhe trotz maximaler medikamentöser Therapie (spezielle Therapie erforderlich, z. B. Herztransplantation, oder Kunstherz oder eben regenerative Stammzelltherapie).

Was ist regenerative (Stamm)zelltherapie?

- A:
Einbringen von Zellen in die geschädigte Region des Herzens mit dem Ziel, dort die normale Herzfunktion wieder herzustellen.
- B:
Zeitlich und örtlich begrenzte Aktivierung der im Herzen vorkommenden Stammzellen.

Welche Zellen kann man ins Herz einbringen?

Welche Zellen kommen im Herzen überhaupt vor?

Wie ist das Herz aufgebaut und wie funktioniert es?

Wie entsteht das Herz?

Funktionsweise

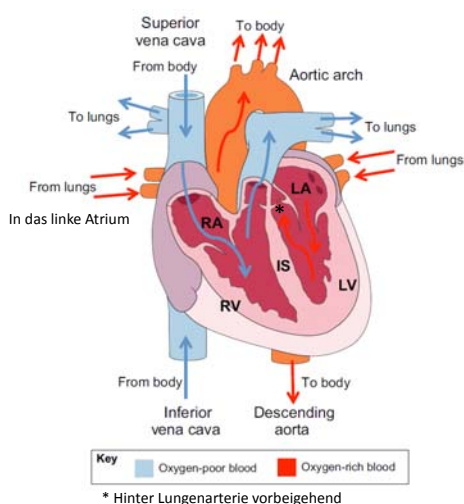


Fig. 1. The adult mammalian heart. The adult mammalian heart is made up of four chambers: the right and left ventricles (RV and LV) and right and left atria (RA and LA). The ventricles are separated by the interventricular septum (IS). The vena cava and the aorta carry the flow of blood to and from the heart, respectively. Blood low in oxygen (blue arrows) from the different tissues is collected into the right atrium via the superior and inferior vena cava and flows to the lungs through the right ventricle. Oxygenated blood (red arrows) from the lungs flows into the left atrium and is pumped into the aorta by the left ventricle. This system allows oxygenated and non-oxygenated blood to be completely separate.

Abbildung aus :<http://dev.biologists.org/content/143/8/1242>

Georg Weitzer

Aufbau des Säugetierherzens und die darin vorkommenden wichtigsten Zelltypen

Ventrale Ansicht

Reizleitungssystem:

- Sinusknoten
- Atrio-Ventrikulärknoten
- Hiss-Bündel
- Purkinje-Fasern

Erstes Herzfeld = Laterales Mesoderm
 Zweites Herzfeld = Rachen Mesoderm
 Craniale Neuralleistenzellen
 Mesangioblasten der Aorta
 Knochenmarksstammzellen (?)

↓

Epikardium
 Myokardium
 Endokardium
 Herzklappen (4)

↓

Schrittmacherzellen
 Atriale Kardiomyozyten
 Ventrikuläre Kardiomyocyten
 Kardiale Fibroblasten
 Endothelzellen, glatte Muskelz.
 Telozyten, Perizyten
 Mastzellen, Makrophagen, ...
 Herzstammzellen

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Aug;14(8):529-41. doi: 10.1038/nrm3619. Epub 2013 Jul 10.
 Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair.
 Xin M¹, Olson EN, Bassel-Duby R.

Die Versorgung des Herzens mit Blut

Ventrale Ansicht

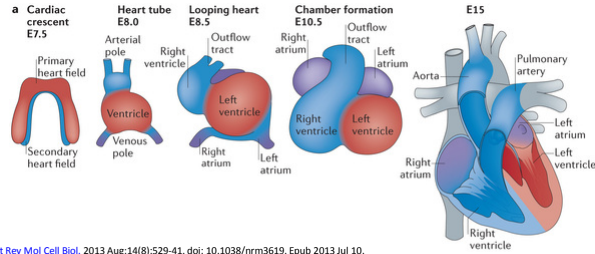
Das Herz von unten = dorsal

Aorta
 Vena cava superior
 Pulmonararterie

Quelle: **Herzmarkt**, Primar Dr. Georg Gaul
 Verlag: Hoffmann-Greif, www.verlaghoffmann-greif.de

Quelle: <http://www.google.at/search?hl=de&rlz=1C180&source=unidir&start=1&stop=10&btnG=Suchen&btnI=Abbrechen&btnC=Zurück&btnS=Weiter>

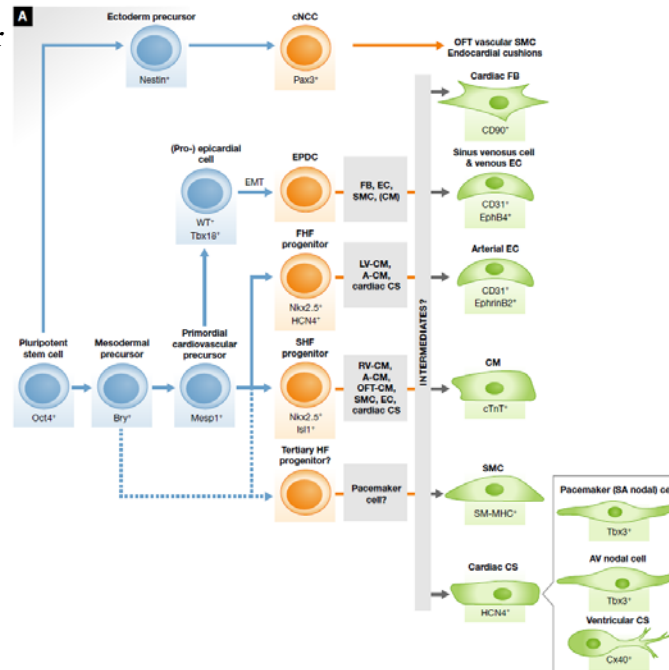
Entwicklung des Herzens während der Embryogenese



[Nat Rev Mol Cell Biol.](#) 2013 Aug;14(8):529-41. doi: 10.1038/nrm3619. Epub 2013 Jul 10.
Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair.
[Xin M¹](#), [Olson EN](#), [Bassel-Duby R](#)

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Entwicklung der Herzzellen



Quelle: <http://emboj.embopress.org/content/34/6/710>

Zelluläre Zusammensetzung des Herzens

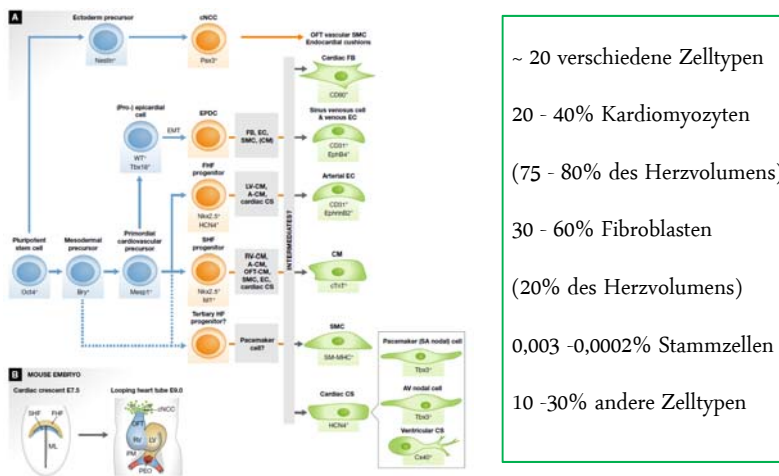
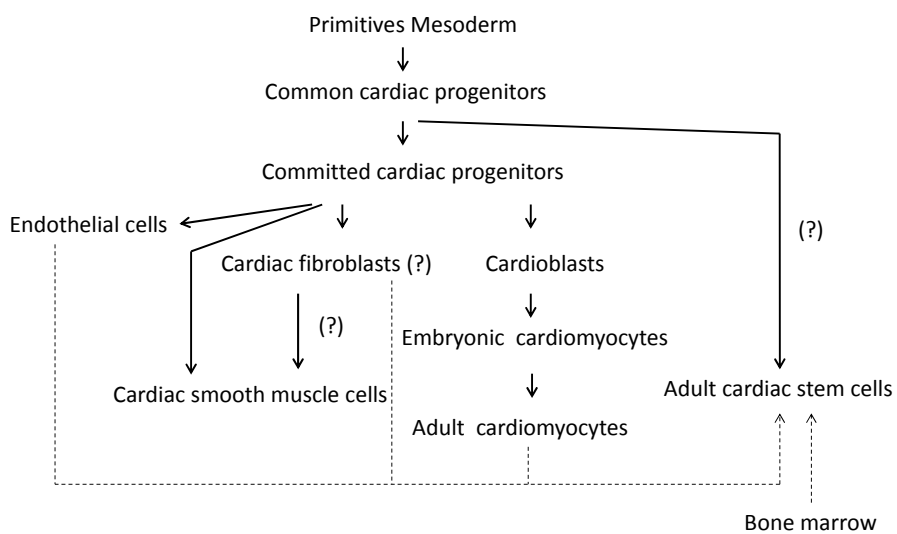


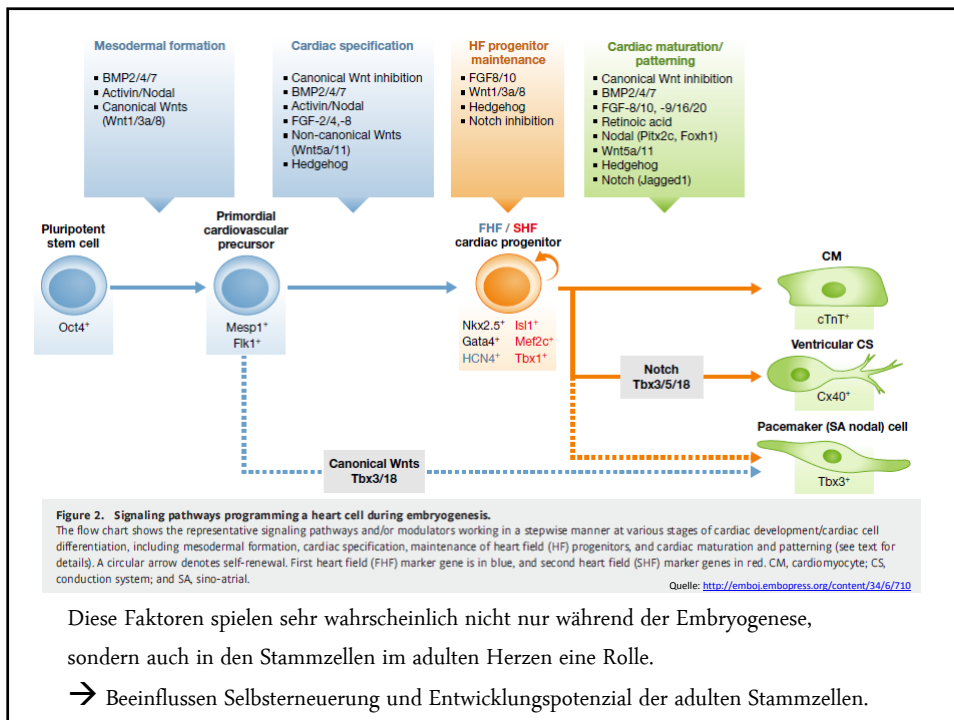
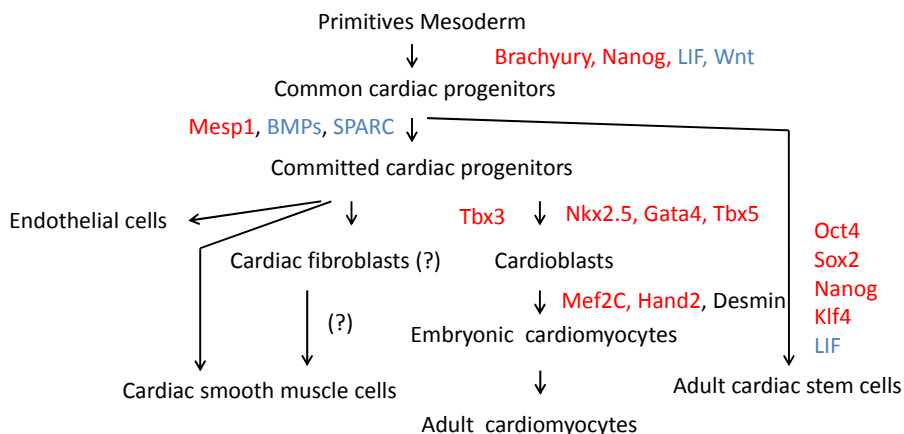
Figure 1. Fate map of cardiac cell lineages during development.
 (A) A cellular flow chart shows the stepwise commitment of pluripotent stem cells via various cardiac progenitor cells, including the first and second heart field (FHF and SHF) progenitors, epicardium-derived progenitor cells (EPDCs) and so-called tertiary heart field (HF) progenitors, and putative intermediates toward mature cardiac cell types during heart development. Mature cardiac cells include cardiomyocytes (CMs), vascular smooth muscle cells (SMCs), arterial and venous endothelial cells (ECs), fibroblasts (FBs), and conductive cells of the cardiac conduction system (CS), which include pacemaker (sino-atrial [SA] nodal) cells, atrio-ventricular (AV) nodal cells, and the ventricular CS cells (ex. Purkinje fibers). The gray boxes in the middle indicate the major mature cell types that each cardiac progenitor differentiates into. Cardiac neural crest cells (NCCs) originating from the ectoderm also contribute to vascular SMCs of the outflow tract (OFT) and thereby to OFT separation and patterning. (B) Cardiac development at the early stage of the mouse embryo. Developing hearts at murine embryonic day (E) 7.5 and 9.0 are shown. A, atria; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; LV, left ventricle; ML, midline; PEO, proepicardial organ; PM, pharyngeal mesoderm; and RV, right ventricle.
 Quelle: <http://embol.embopress.org/content/34/6/710>

Herzzellen und Herzstammzellen Entstehung



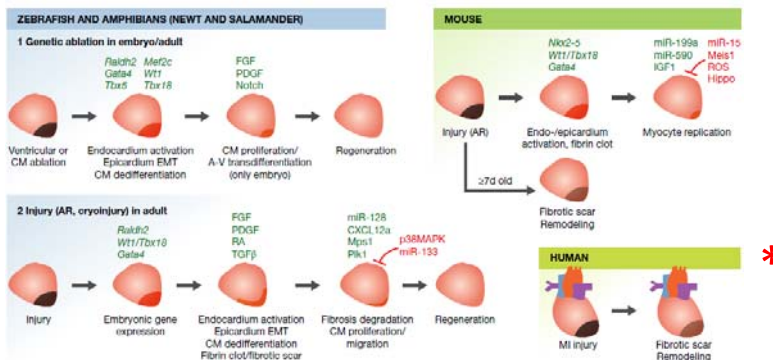
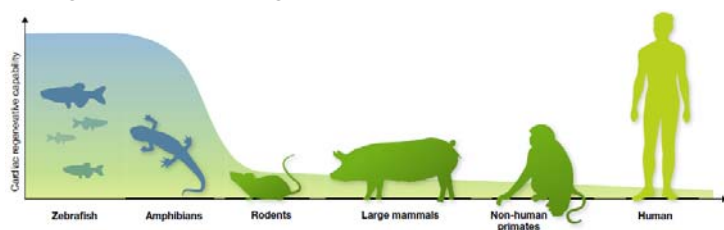
Wie wird die Entstehung der verschiedenen Herzzellen gesteuert?

Die wichtigsten die Differenzierung beeinflussenden Faktoren

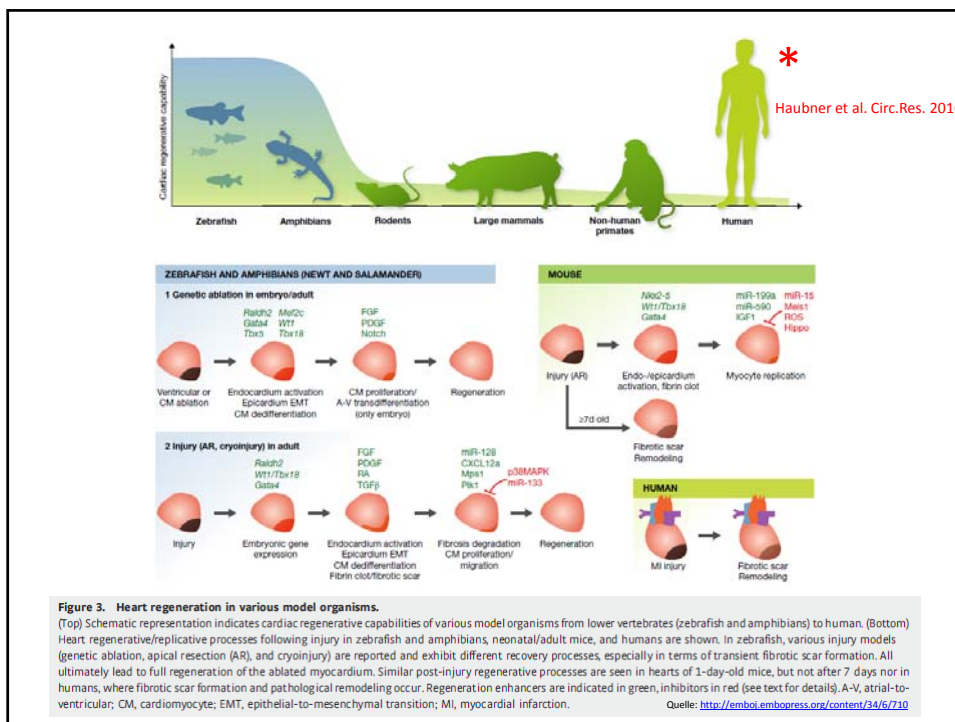


Kann sich das Herz regenerieren?

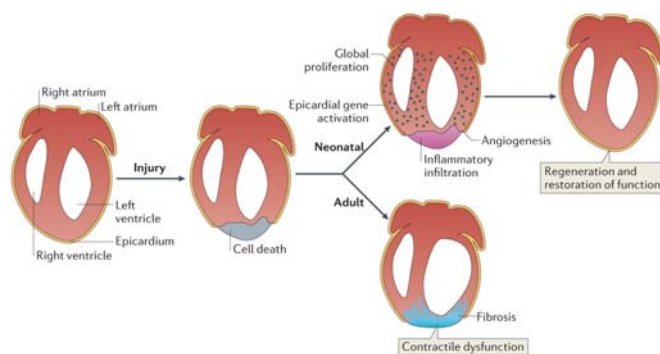
Zur Regenerationsfähigkeit des Herzens



Quelle: <http://embj.embopress.org/content/34/6/710>



Während der frühen Embryonalentwicklung und in „primitiven“ Spezies kann das Herz sich noch mit Hilfe von Stamm- oder Vorläuferzellen regenerieren.



Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Aug;14(8):529-41. doi: 10.1038/nrm3619. Epub 2013 Jul 10.
Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair.
Xin M¹, Olson EN, Bassel-Duby R.

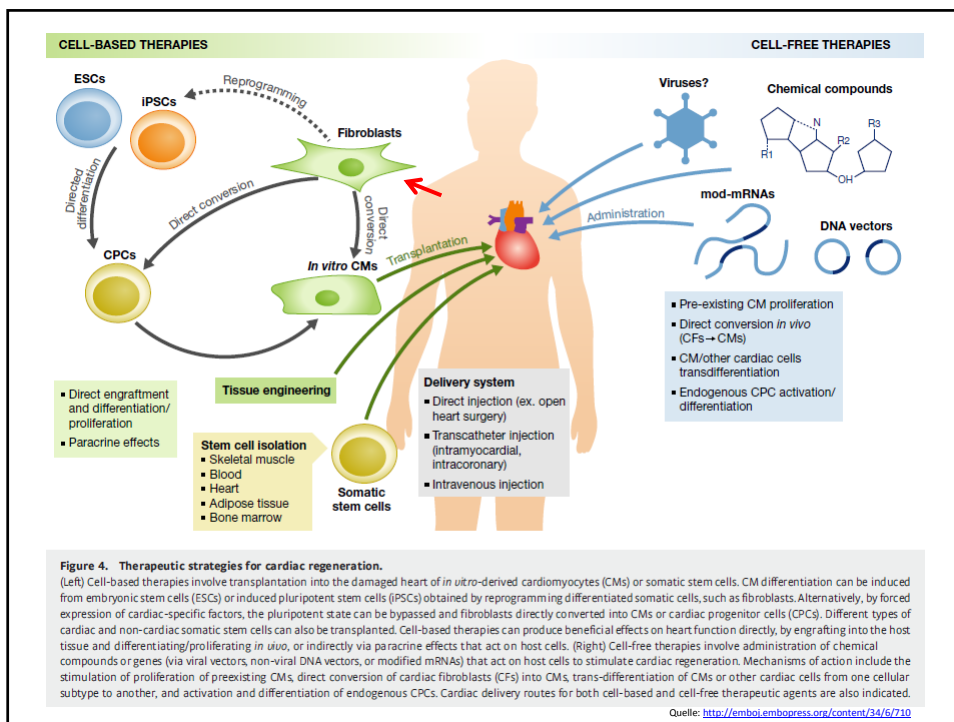
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Das menschliche Herz ...

- kann sich, nach Verletzungen nicht spontan regenerieren. Es kommt zur Vernarbung und in der Folge ...
- wird es bei Überbelastung hypertroph. Dies führt zu „cardiac remodeling“ und irreversiblen Schäden bis hin zum Herzversagen.
- Pro Jahr entstehen ca. 1% neue Herzzellen; aber was ist die Quelle dieser?

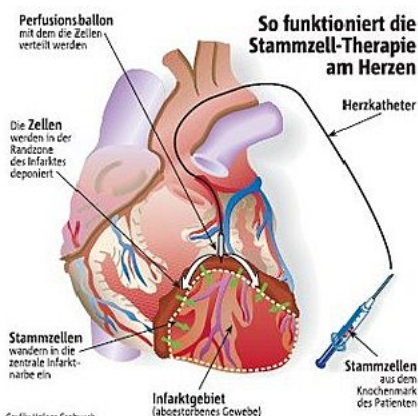
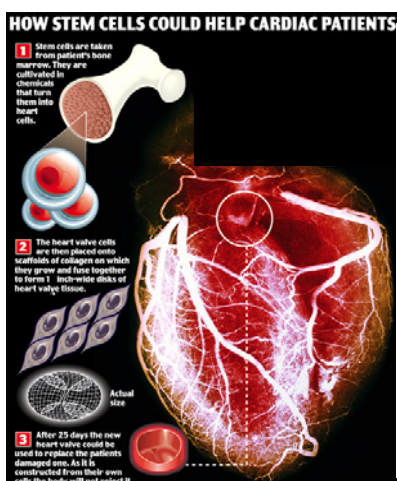
Wie kann man die Regeneration des Herzens künstlich herbeiführen?

- Durch die Zuführung von autologen oder allogenen exogenen Zellen
- Durch Aktivierung von endogenen Stammzellen.



Erste Stammzelltransplantationsversuche:

Heilungsversuche von Herzkrankheiten mittels Knochenmark-Stammzellen.



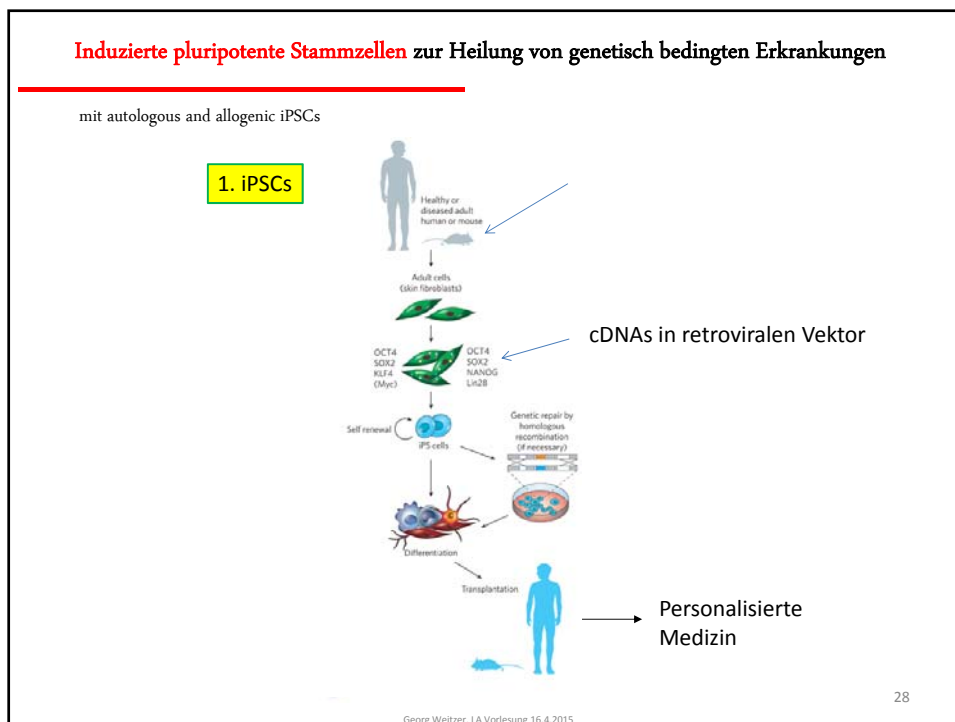
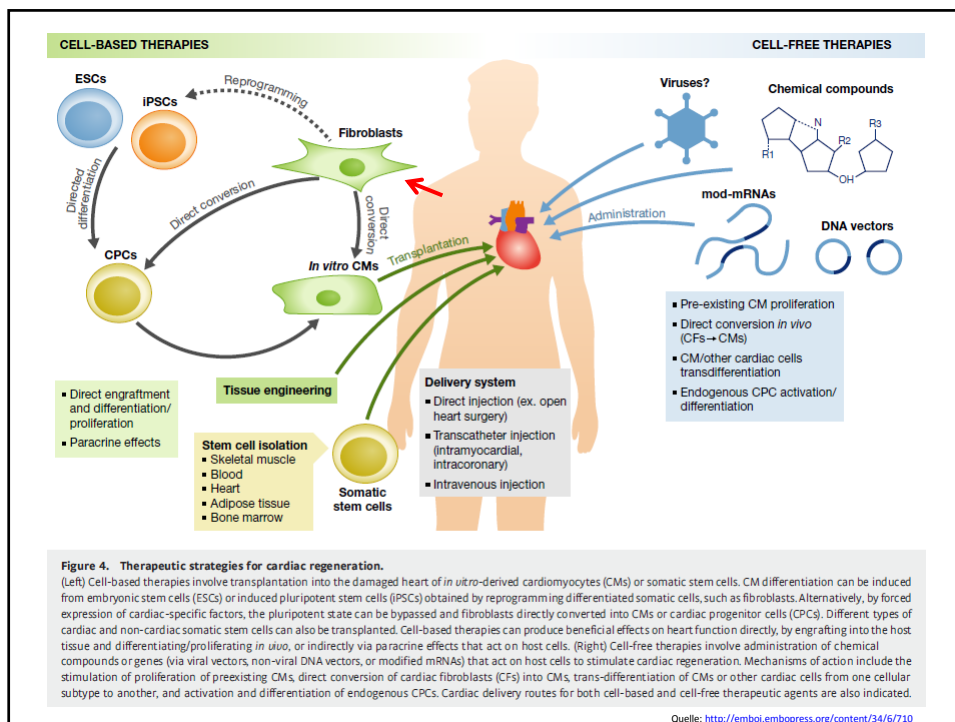
Nach 16 Jahre noch immer kein Erfolg!

Mittlere Steigerung der linksventriculären Auswurfleistung um 3,5 %.

Welche Zellen stehen für die Herztherapie zur Verfügung?

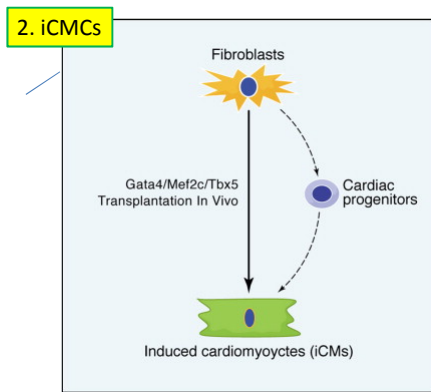
Therapieversuche nach Herzinfarkt

- Maus und Ratte:
 - Mit transgenen ESC-CMCs
 - Mit transgenen iPSC-CMCs
 - Mit FACS - isolierten CSCs
 - Mit iCMCs
 - Mit iPSCs
- Affe und Schwein:
 - Mit transgenen iPSC-CMCs
- Mensch:
 - Mit hämatopoetischen Stammzellpopulationen
 - Mit Myoblasten
 - Mit Fettstammzellen
 - Mit CSCs



Induzierte Herzmuskelzellen (iCMCs) zur Heilung von Herzkrankheiten und Infarkt

autologous and allogenic iCMCs Fibroblasts with a alphaMHC::GFP transgene + Gata4, Mef2C, Tbx5 → iCMCs



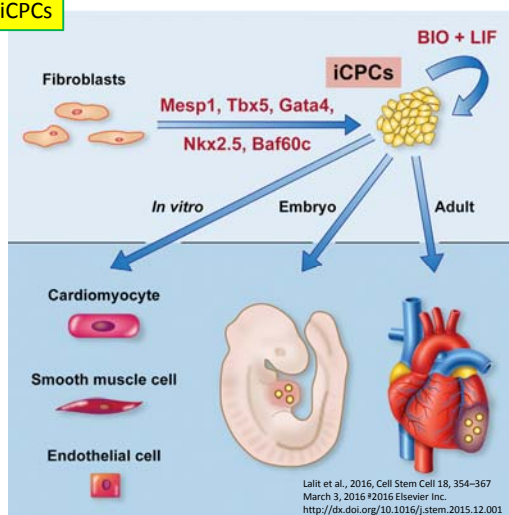
Ausbeute und Reinheit?

29

Georg Weitzer, MolMed Vorlesung 2.5.2016

Direktes Reprogrammieren von Fibroblasten zu induzierten kardialen Vorläuferzellen (iCPCs)

3. iCPCs



Gene, die wenn transient exprimiert, Fibroblasten in iCPCs umwandeln.

- Mesp1 = Mesoderm Posterior 1, Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor (TF)
- Tbx5 = T-box TF
- Gata4 = GATA-binding TF; a Zink-finger TF
- Nkx2.5 = Homeobox-containing TF
- Baf60C = SMARCD3 Bestandteil des SWI/SNF Chromatinregulationskomplexes

Erhalt der Selbsterneuerung und des Differenzierungs-potenziales durch

- LIF = Leucemia inhibitory factor; ein Zytokin der Interleukin (IL)-6 Gruppe → pSTAT3
- BIO oder CHIR99021= Inhibitoren der Glycogensynthasekinase 3 α ; ersetzt aktives Wnt Signaling

→ aktiviert β -Catenin



Stammzellen aus dem Fettgewebe

4. ADSCs

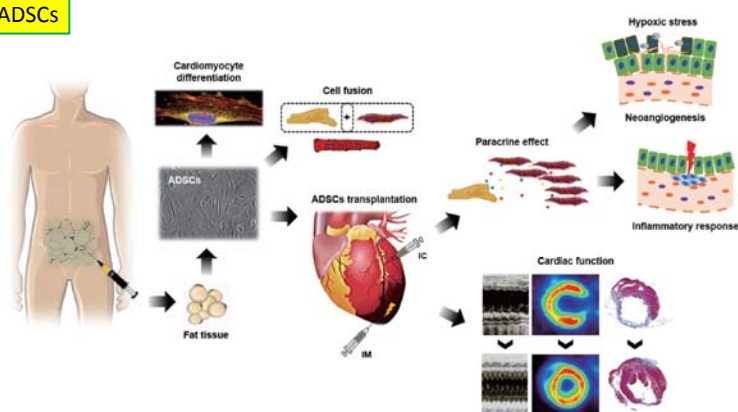


Fig. 1. Effects of ADSCs on myocardial regeneration. ADSCs can be harvested readily, safely, and abundantly by liposuction. They can be cultured *in vitro* and differentiated into cardiomyocytes and other mesenchymal cells through direct transdifferentiation or cell-fusion. When transplanted into the infarcted myocardium by IC infusion or IM injection, ADSCs might contribute towards improvement in cardiac function. The suggested mechanisms include their paracrine effects modulating inflammatory response and inducing neovascularization under hypoxic stress. ADSCs: adipose tissue-derived stem cells, IC: intracoronary, IM: intramuscular.

Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378017/>

Isolierung und Charakterisierung von Herzstammzellen

5. CSCs

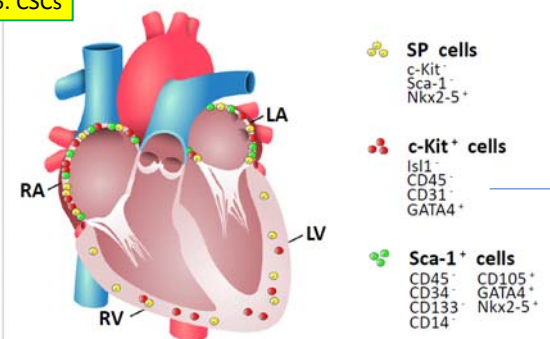


Figure 2: Localization of cardiac resident progenitor cell populations in the human adult heart. Both side population (SP)- and c-Kit-positive cells can be found in the atrial and ventricular myocardium. In contrast, Sca1-positive progenitors are identified in the atria only. Characteristic markers for each resident population are indicated. LA, left atrium; LV, left ventricle; RA, right atrium.

Cyganek et al., *J Clin Exp Cardiol* 2013, S11
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9880.S11-008>

Isolierung mittel FACS oder MaCS

Problem: Marker nicht herzstammzellspezifisch

Alternative:

Durch Selektion der schnell wachsenden Stammzellen unter Zuhilfenahme von embryonalen Stammzellen und LIF.

Problem:

Bleibender Einfluss der embryonalen Stammzellen Und der Feeder Zellen auf die Herzstammzellen durch Exosomen.

33

Alternative zur Stammzelltransplantation:

Aktivierung endogener Herzstammzellen

Durch Wachstumsfaktoren

Durch Peptide

Durch synthetic small molecules (SySMs) = klassische „Medikamente“

Durch small interfering RNAs (siRNAs)

Transportiert durch Exosomen

Wachstumsfaktoren:

Insulin-like growth factor 1(Igf-1/HGF) (2011)

Stem cell factor (SCF) (2014)

Peptid:

Apelin-13 (2016) [Thymosin β 4 (2007, 2012 widerlegt)]

SySM:

Resveratrol (2017)

Aktivierung endogener CSCs durch SCF oder Igf1

Publiziert Sanada et al. 2014 Circulation Research bzw Ig1: Ellison et al., 2011 JACC

- Manche CSCs sind c-Kit positiv (← c-Kit-pos. Zellen sind keine CSCs; 2015)
- Stem cell factor (SCF) aktiviert selektiv die Selbsterneuerung von c-Kit positiv CSCs.
- Dies führt zu einer Linderung der Hypertrophy des alternden Herzens durch gesteigerte Hyperplasie.

aber: bisher alles nur in der Maus, der Ratte oder im Schwein beobachtet!

Aktivierung endogener CSCs durch Apelin-13

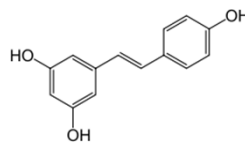
Publiziert am 22.2.1016 Zhang et al. Cell Transplantation

- Das 13 aa peptide Apelin-13
- bindet an orphan G protein-coupled recptor und
- steigert die Expression der Stammzellmarker c-Kit, Sca1 und Flk1
- im post-myocardial infarction (MI) Rattenherz.
- **Aber:** APLNR kommt in sehr veilen Geweben vor. --> Nebenwirkungen ?

Aktivierung endogener und exogener CSCs durch

Publiziert am 25.1.1017 Ling et al., Molecular Medicine Reports

- Reseveratol mindert Apotose der Herzzellen
- Steigert die Anzahl an Sca1-positiven CSCs
- steigert die Expression VEGF und SDF-1alpha
- im post-myocardial infarction (MI) Rattenherz.
- **Aber:** Sca1 nur in der Maus exprimiert und SDF1alpha rekrutiert auch bone marrow derived stem cells (Zaruba et al. 2009 in Cell Stem Cells).



VEGT = vascular endothelial growth factor
SDF = stromal cell derived factor

Hürden auf dem Weg zu einer Therapie der Herzinsuffizienz

- Mechanismen der Regeneration?
- Wie funktioniert die Herzstammzellennische?
- Arten von transplantierten Zellen?
- Benötigt Anzahl an Zellen?
- Auswahl der Subtypen von Herzmuskelzellen?
- Elektro-mechanische Kopplung der Muskelzellen?
- Parakrine Aktivierung endogener Zellen?
- Tumorbildung durch transplantierte Zellen?
- Arten der Verabreichung der Zellen?
- Viren als Vektoren für die Gentherapie?
- Langzeitwirkungen der Zelltherapien unbekannt?
- In vitro Ausbildung von Geweben?

Sie finden die Vorlesung auf meiner Homepage unter dem URL

<http://homepage.univie.ac.at/georg.weitzer/>

Quellen soweit nicht bei den Abbildungen angegeben

- <http://www.leading-medicine-guide.at/Medizinische-Fachartikel/Herzfehler>
- www.recherche-vie.ch
- <http://www.netdokter.at/krankheit/herzinsuffizienz-7545>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Herzinsuffizienz>
- <http://www.netdokter.at/krankheit/rheuma-7406>
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

Lernunterlage <http://emboj.embopress.org/content/34/6/710>

Review

Focus: Induced Pluripotency & Cellular Reprogramming

Programming and reprogramming a human heart cell

Makoto Sahara^{1,2*}, Federica Santoro¹ & Kenneth R Chien^{1,2**}



DOI 10.15252/emboj.201490683 | Received 14 November 2014 | Revised 17 December 2014 | Accepted 2 January 2015 | Published online 20 February 2015
The EMBO Journal (2015) 34: 710–738

Georg Weitzer, Mol Med I Vorlesung 17.5.2017

40