

Teil 2 Die in vitro Differenzierung von Stammzellen

- 2.1 Embryonale Stammzellen
 - Embryoid Bodies
- 2.2. Somatische Stammzellen
 - Herzstammzellen → Cardiac bodies / Cardiospheren
 - Hirnstammzellen → Neurospheren
 - Gezielte Transdifferenzierung durch **Um**programmieren von Fibroblasten etc. zu z.B. Kardiomyozyten-Vorläuferzellen
- 2.3. Organoide

2.1 Embryonale Stammzellen

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

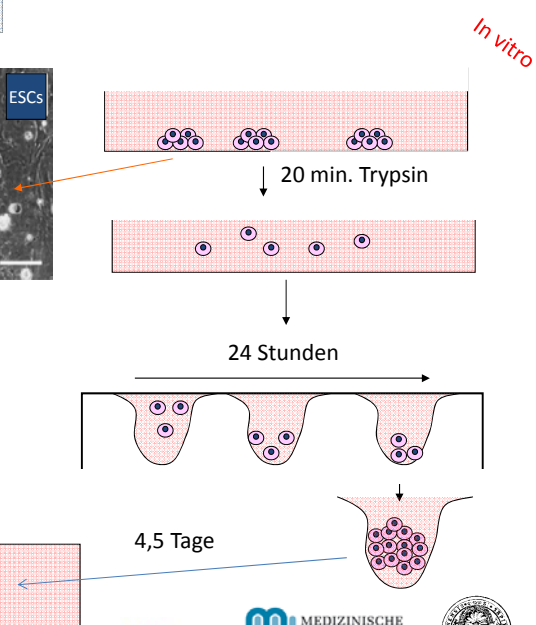
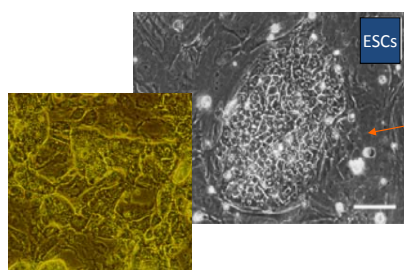
	In der Maus	Im Menschen
2.1.1 Pre-implantations Entwicklung:	Tag 0 – 4	0 - (6-12)
2.1.2. Pre-gastrulations Entwicklung :	Tag 4 – 7	9 – 16
2.1.3. Gastrulation / Keimblattbildung:	Tag 7 - 9...	16 – 21...

Georg Weitzer

MAX
PERUTZ
LABSM
MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

3

Herstellung von Embryoid Bodies

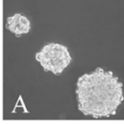
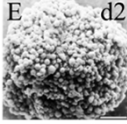
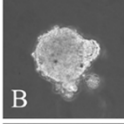
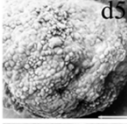
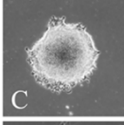
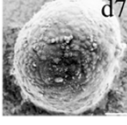
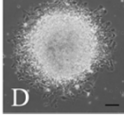


Georg Weitzer

MAX
PERUTZ
LABSM
MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

4

Embryoid Bodies

Tag 1-3		
Tag 4,5		
Tag 5.5		
Tag 6.5		


Anna Wobus,
Gatersleben, D

Erfinderin der von ESC
abstammenden Embryoid Bodies

Georg Weitzer

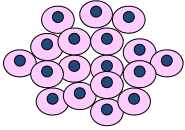
MAX PERUTZ LABS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

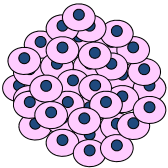


5

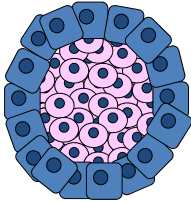
ESC Aggregat Tag 1



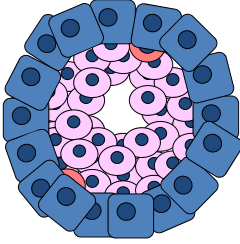
Kompaktierung Tag 1-2



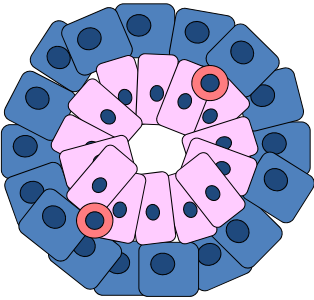
Embryoid Body Tag 3



Embryoid Body Tag 4




Embryoid Body Tag 4,5



Georg Weitzer

MAX PERUTZ LABS



6

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

In vivo Zygote

6-7 cell divisions

Trophectoderm

Inner Cell Mass

Blastocyst

In vitro

Primitive Endoderm (Hypoblast)

Day 1 Day 1.5 Day 2 -3 Day 4

Georg Weitzer

MAX PERUTZ LABS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

7

The diagram illustrates the morphological development of a zygote. On the left, an 'In vivo' zygote is shown. An arrow labeled '6-7 cell divisions' points to a 'Blastocyst' on the right. The blastocyst is labeled with 'Trophectoderm' (the outer layer) and 'Inner Cell Mass' (the inner cluster). Below this, 'In vitro' stages are shown for 'Day 1', 'Day 1.5', 'Day 2 -3', and 'Day 4'. The 'Day 4' stage shows a 'Primitive Endoderm (Hypoblast)' and a corresponding fluorescence image of the same stage.

Quelle:CDvor2000

EB d4.7

EB d4.7 Querschnitt

Der Hypoblast und Epiblast bildet sich, aber kein Trophectoderm.

Embryoid Bodies verhalten sich wie die Innere Zellmasse.

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

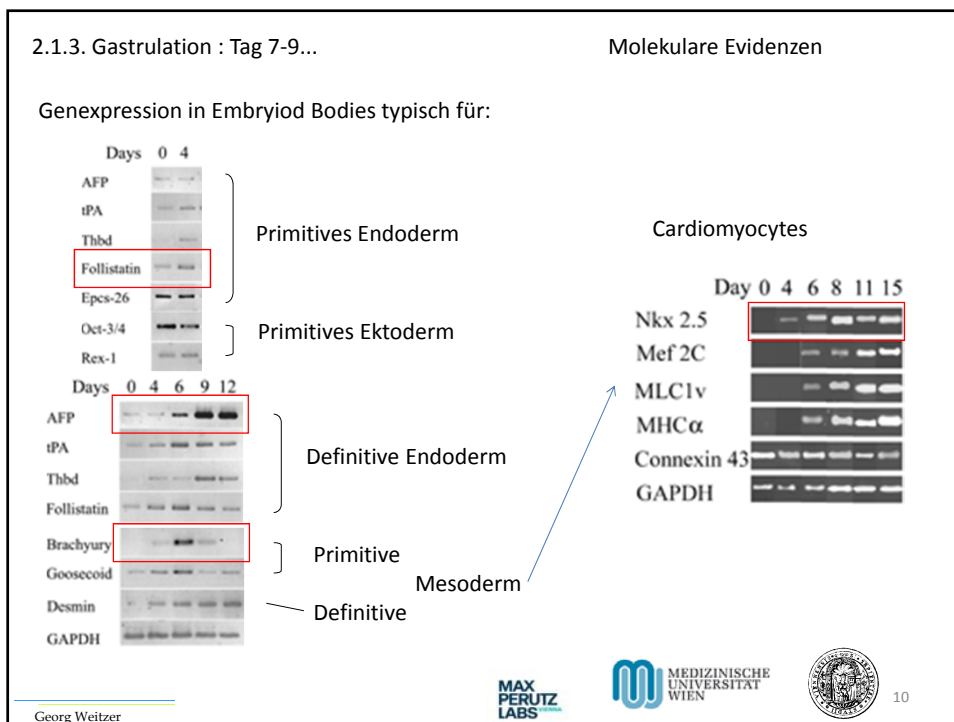
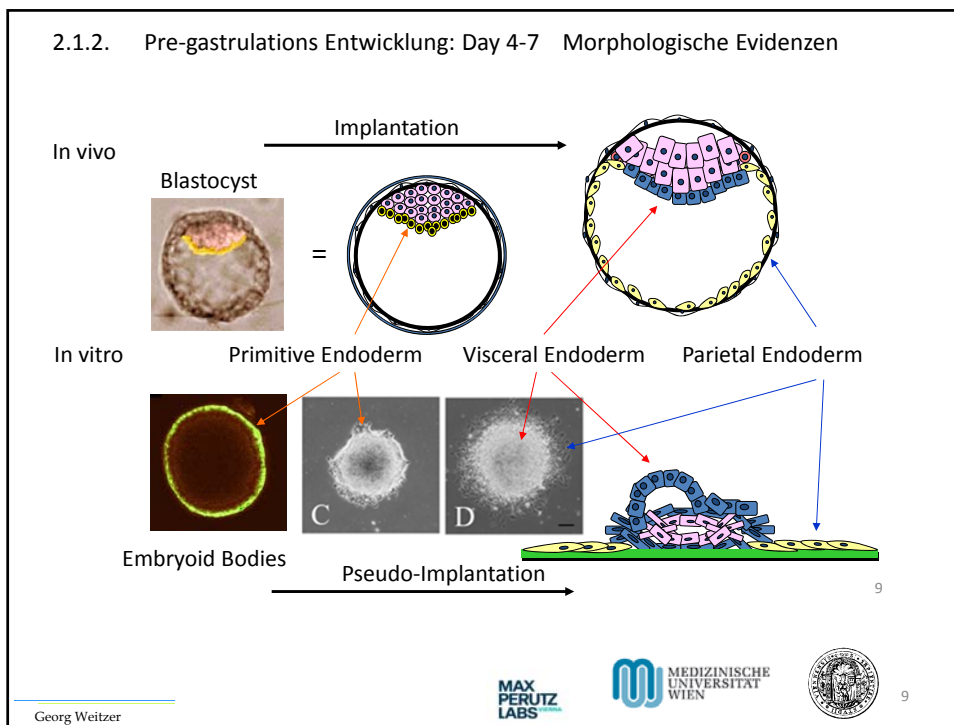
Georg Weitzer

MAX PERUTZ LABS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

8

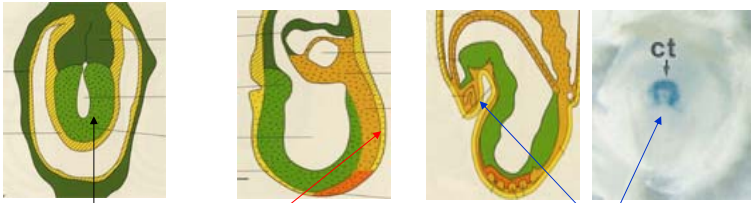
Two fluorescence microscopy images of Embryoid Bodies (EB) at day 4.7. The left image shows a whole EB with a bright orange center and a green outer ring. The right image is a cross-section ('EB d4.7 Querschnitt') showing a green outer ring and a dark center.



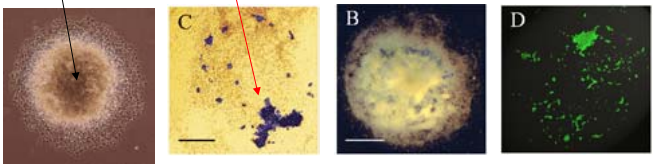
2.1.3. Gastrulation : Tag 7-9... Morphologische Evidenzen

In vivo

Egg cylinder stage Primitive streak stage Head fold stage



In vitro Prim. Ectoderm Primitive Mesoderm Cardiocytes




Embryoid Body Day 6 Erythrocytes Day 8

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

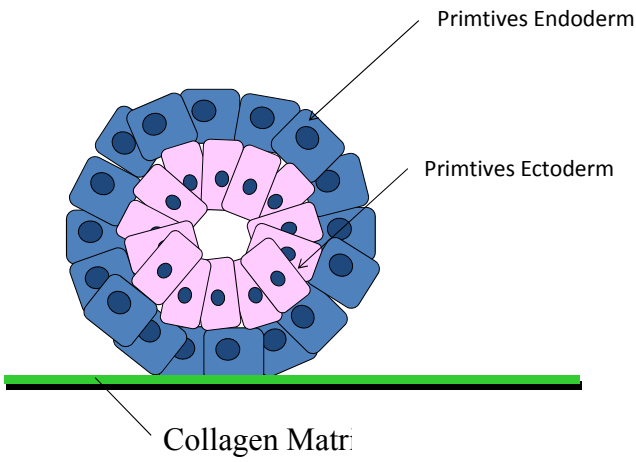
Georg Weitzer

MAX PERUTZ LABS MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN



11

Pseudo-Implantation von Embryoid Bodies




Primitives Endoderm

Primitives Ectoderm

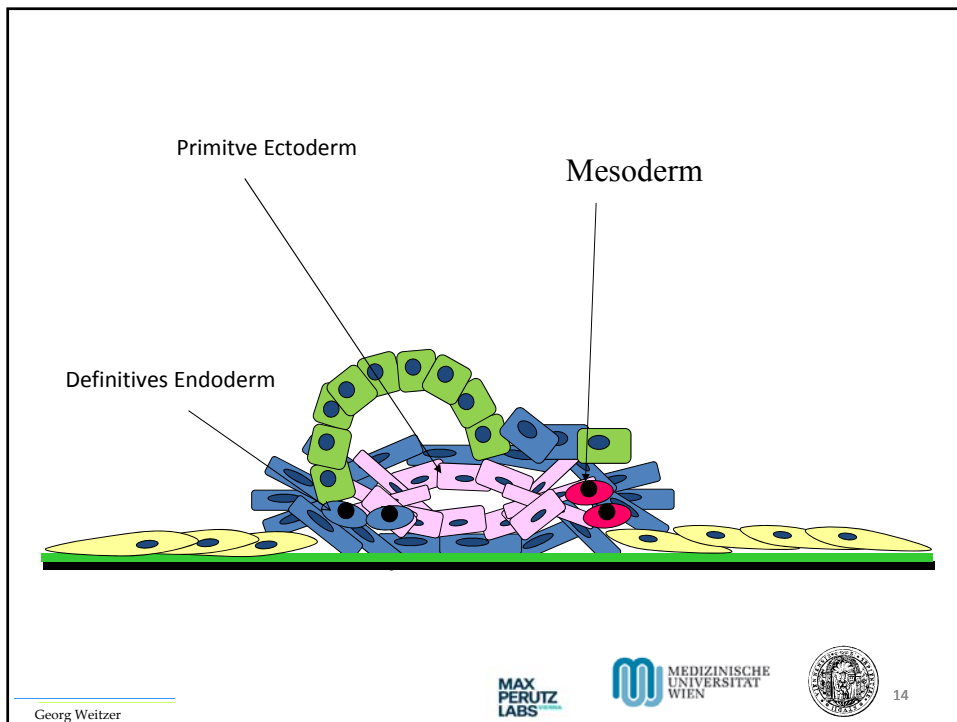
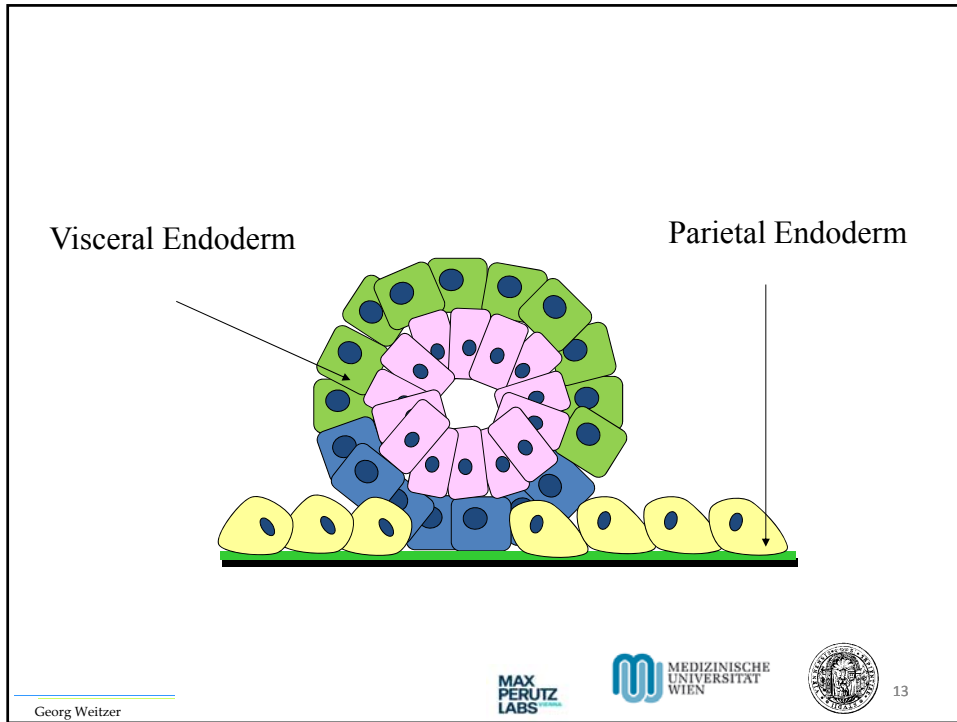
Collagen Matr.

Georg Weitzer

MAX PERUTZ LABS MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN



12



Egg cylinder stage embryo

Trophoblast Reichert's membrane

Proamniotic cavity

Blastocoel

culture medium

Visceral endoderm

Parietal endoderm

collagen coated plastic

Day 7 embryoid body

Ist die Entstehung der somatischen Zellen während der Gastrulation chaotisch?

Georg Weitzer

MAX PERUTZ LABS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

15

Development of "implanted" embryoid bodies

Point symmetry → Line symmetry

Day 6 Day 6.5 Day 7.0 Day 8.0 Day 9.0

Georg Weitzer

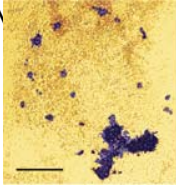
MAX PERUTZ LABS

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

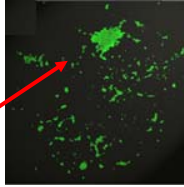
16

Mesodermbildung in Embryoid Bodies

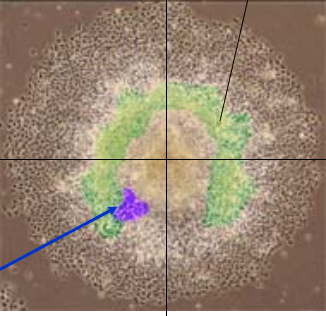
Primitive N



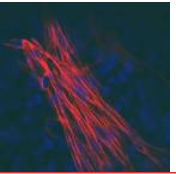
Cardiomyocyt



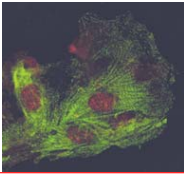
Braking line symmetry



Brachyury



MHC α



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







17

2.1.4. Gerichtete in vitro Differenzierung von Stammzellen → Auf dem Weg zu Organoiden

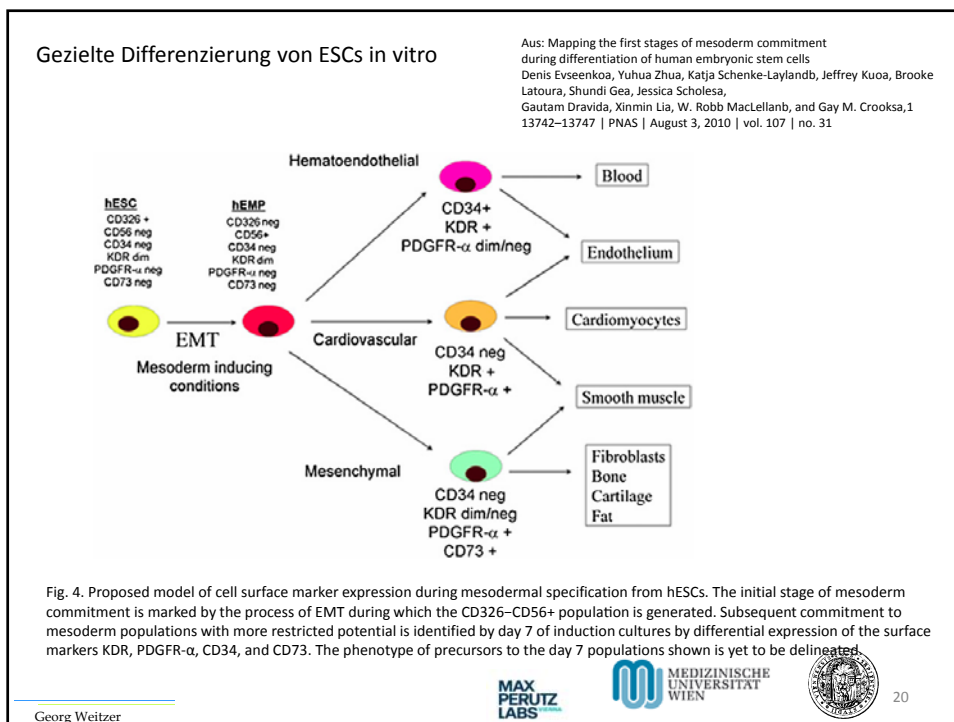
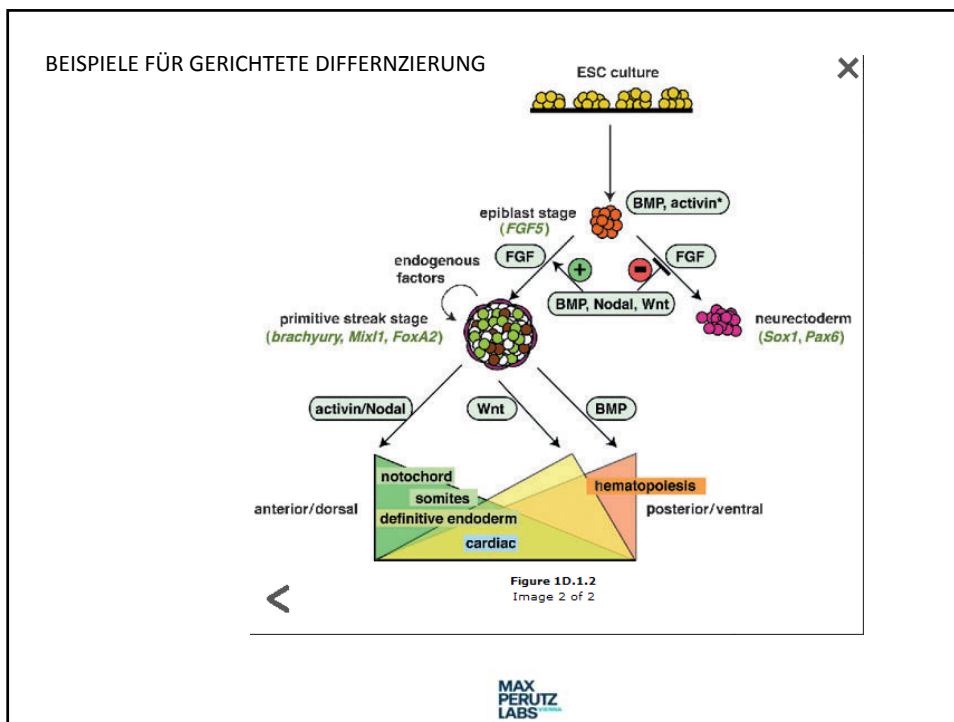
Ohne Beeinflussung entstehen alle Zelltypen.

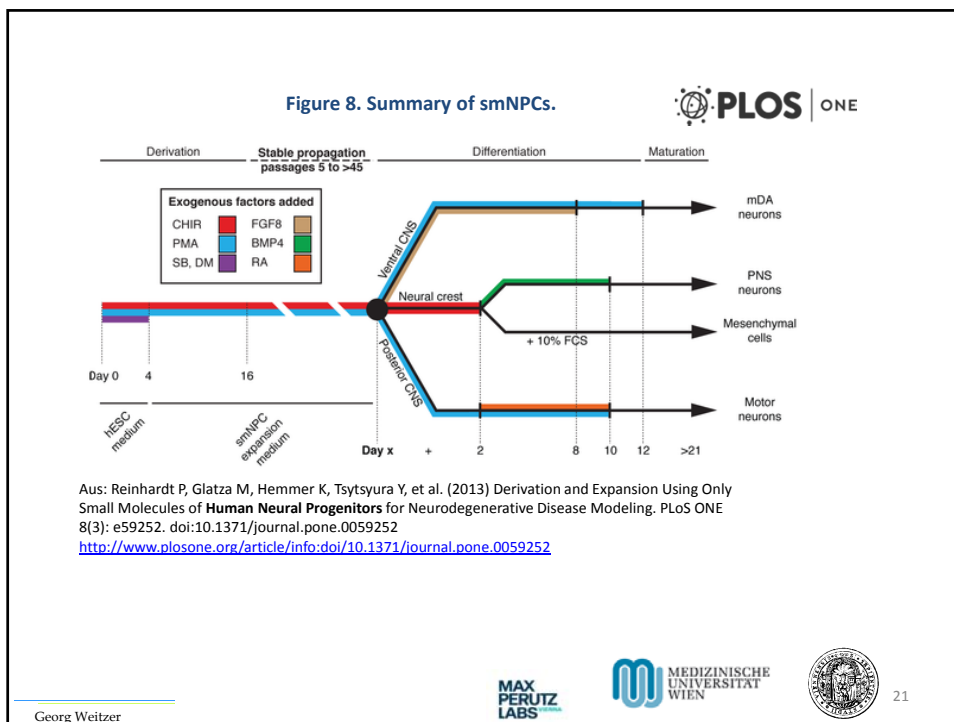


Figure 5 | Transcription factor cross-antagonisms in a cascading landscape of unstable and stable cell states. The territory, represented as a mountain range, depicts all possible solutions of a single regulatory network that specifies cell identity. Robust network states correspond to stably differentiated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

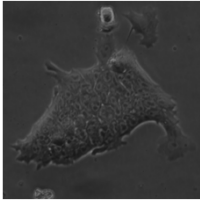






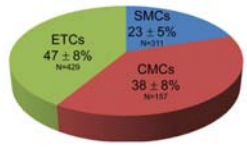
4.2. somatische Stammzellen

4.2.1. Herzstammzellen → Cardiac bodies



Differenzieren zu

- Herzmuskelzellen
- Vaskulären Endothelzellen
- Glatten Muskelzellen
- ? Herzspezifischen Fibroblasten



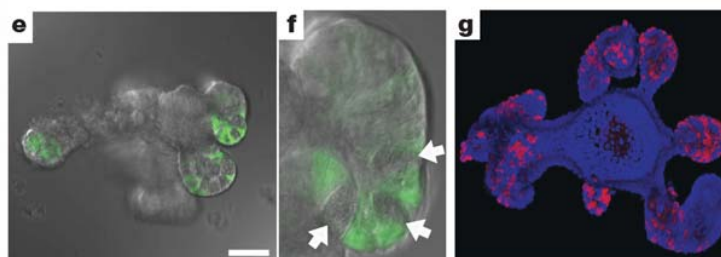
4.2.2. Neuronale Stammzellen → Neurosphären → verschiedene Typen von Nervenzellen

4.3. Organoide Experimentell gesteuerte Weiterentwicklung von Embryoid Bodies.
 Organoide = 2. Generation von Embryoid Bodies

Georg Weitzer
 MAX PERUTZ LABS
 MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

Erste Organoide: Mini Darm Single Lgr5⁺ 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⁺ stem cells at the bottoms of small-intestinal crypts⁴. 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⁺ stem cells can also initiate these crypt–villus organoids. Tracing experiments indicate that the Lgr5⁺ 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⁺ cells form crypt organoids, with Lgr5–GFP⁺ cells and Paneth cells (white arrows) located at crypt bottoms. Scale bar, 50 μ 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 Hans Clevers Lab

Georg Weitzer

MAX
PERUTZ
LABS

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

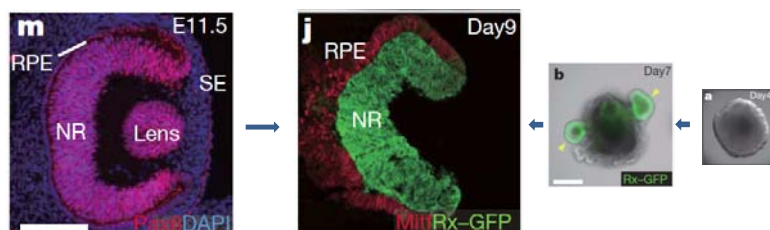


23

2. Augen

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

Mototsugu Eiraku, Nozomu Takata, Hiroki Ishibashi, Masako Kawada, Eriko Sakakura, Satoru Okuda, Kiyotoshi Sekiguchi, Taiji Adachi & Yoshiki Sasai



Maus

Embryoid bodies

doi:10.1038/nature09941

7 APRIL 2011 | VOL 472 | NATURE | 51

Georg Weitzer

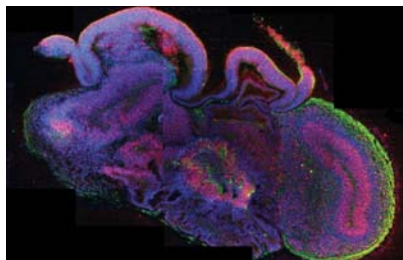
MAX
PERUTZ
LABS

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



24

3. Hirn



Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

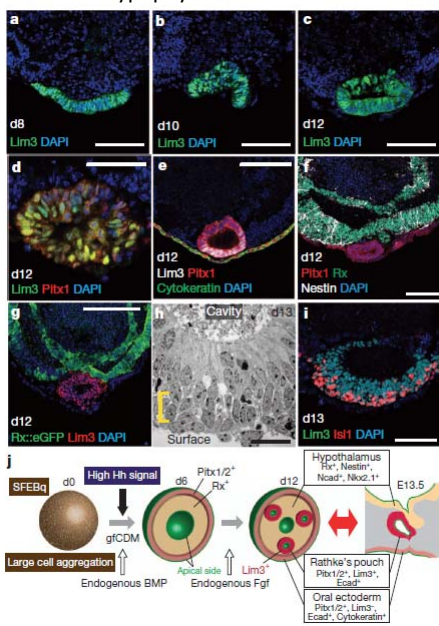
[Madeline A. Lancaster](#)¹, [Magdalena Renner](#)¹, [Carol-Anne Martin](#)², [Daniel Wenzel](#)¹, [Louise S. Bicknell](#)², [Matthew E. Hurles](#)³, [Tessa Homfray](#)⁴, [Josef M. Penninger](#)¹, [Andrew P. Jackson](#)² & [Juergen A. Knoblich](#)¹
 Nature Volume: 501, Pages: 373–379 Date published: (19 September 2013) DOI: doi:10.1038/nature12517
 Published online 28 August 2013

Georg Weitzer



25

4. Adenohypophyse



Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture
[Hidetaka Suga](#), [Taisuke Kadoshima](#), [Maki Minaguchi](#), [Masatoshi Ohgushi](#), [Mika Soeni](#), [Tokushige Nakano](#), [Nozomu Takata](#), [Takafumi Wataya](#), [Keiko Mugeruma](#), [Hiroyuki Miyoshi](#), [Shigenobu Yonemura](#), [Yutaka Oiso](#) & [Yoshiki Sasaki](#)
 Nature volume 480, pages 57–62 (01 December 2011)

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. Delaminating 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).

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 adrenocorticotrophic 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.

Georg Weitzer



26

Thema diese Seminars:

Organoide als Advanced therapy (bio-)medical products (ATMPs) und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin

Fragen:

Welche Arbeiten über Organoiden wurden zwischen 2014 und 2019 publiziert?

Was sind die wesentlichen Fortschritte, die erzielt wurden?

Ist eine medizinische Anwendung von Organoiden als AMPs vorstellbar?

Einfacher:

Kann man mit Organoiden Menschen therapieren und heilen?

Was sind Organoiden?

Was sind Organe?



27

Was ist ein Organ?

Ein Organ (von [altgriechisch](#) ὄργανον *organon*, deutsch ‚Werkzeug, Sinneswerkzeug‘) ist ein spezialisierter Körperteil aus unterschiedlichen [Zellen](#) und [Geweben](#).

Ein Organ ist eine abgegrenzte Funktionseinheit in einem vielzelligen Lebewesen.

Ein Organ geht auf eine eigene Organanlage zurück und durchläuft eine spezifische [Organogenese](#).

Das Zusammenspiel der Organe realisiert den [Organismus](#).

Organe sind funktional durch [Organsysteme](#) direkt miteinander verbunden.



28

Was ist ein Organoid?

Organoid sind künstlich hergestellte Gewebe und Organ-ähnliche Zellaggregate aus dem Reagenzglas.

Organoid entstehen aus Stammzellen durch (von außen beeinflusste) Selbstorganisationsprozesse.

Die gezielte Herstellung der Organoid entwickelte sich aus der Herstellung und Weiterentwicklung von embryoid bodies, und schon Gewebe-spezifischen Stammzellaggregaten, wie cardiac bodies, Cardiospheren und Neurospheren.

In einer bahnbrechenden Arbeit wurde 2011 erstmals, durch eine japanische Gruppe gezeigt, dass aus embryoid bodies funktionstüchtige Mäuseaugen entstehen können.

Seit diesem Zeitpunkt intensivierte sich die Forschung um Mini-brains, Mini-hearts, Mini-guts und Mini-pankreas.

Mini-pankreas, wurden bereits in Mäusen zur Heilung von Diabetes Typ 1 getestet.

Suchbegriffe zu dem Thema „Organoid als Advanced therapy (bio-) medical products (ATMPs) und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin“.

Organoid: 12065 Einträge in der Datenbank PUBMED am 11.9.2019.

Advanced therapy medicinal products (ATMPs)

Suchbegriff combination: atmp OR "atmps" 208 Einträge (11.9.2019)

- zu wenig, weil zu Komplex - deshalb zB

"medicinal product" 895 Einträge

"medicinal product" AND organoid(s) 0

organoid AND "medical product" 0

→ Suche nach "organoids" in der Grundlagenforschung notwendig!

organoid[ti] 537 Einträge (12.9.2019)

→ organoid[ti] AND <organ type>