

Teil 2 Die in vitro Differenzierung von Stammzellen

- 2.1 Embryonale Stammzellen und iPSCs, snt-ESCs
 - Embryoid Bodies
- 2.2. Somatische Stammzellen
 - Herzstammzellen → Cardiac bodies / Cardiospheren
 - Hirnstammzellen → Neurospheren
 - Gezielte Transdifferenzierung durch Umprogrammieren von Fibroblasten etc. zu z.B. Kardiomyozyten-Vorläuferzellen
- 2.3. Organoide

Inhalt

- Was sind Stammzellen ?
 - Welche Arten von Stammzellen gibt es?
 - Worin unterscheiden sich Stammzellen von anderen (somatischen) Zellen?
 - Wo spielen Stammzellen in unserem Körper eine Rolle?
 - Künstlich hergestellte Stammzellen
- Was kann man mit Stammzellen (nicht) machen?
 - Grundlagenforschung Stammzellenbiologie: Wie funktionieren Stammzellen?
Erforschung von Entwicklungsprozessen
Erforschung von Krankheitsursachen
 - Zelltherapie: Heilung von Krankheiten?
- Warum ist Stammzellenforschung und deren Anwendung einer ethischen Güterabwägung zu unterziehen?

Was kann man mit Stammzellen machen?

Grundlagenforschung

Stammzellenbiologie: Wie funktionieren Stammzellen?

Erforschung von Entwicklungsprozessen

Erforschung von Krankheitsursachen

Stammzellen sind ein gutes Modell für grundlegende Arbeiten zur Zellbiologie.

Genregulation (z.B. zum Erhalt der Selbsterneuerung)

Genexpression (z.B. zum Erhalt der Differenzierungsbereitschaft)

Regulation des Metabolismus (z.B. Warburg Effekt bei Krebsstammzellen)

usw. und

um die Eigenschaften und Verhaltensweisen von allen Arten von Stammzellen zu erforschen.

Für weitere Details, siehe meine „Embryonen- und Stammzellforschung I + II“ Vorlesungen auf der Uni Wien.

Was kann man mit Stammzellen machen?

Grundlagenforschung

Stammzellenbiologie: Wie funktionieren Stammzellen?

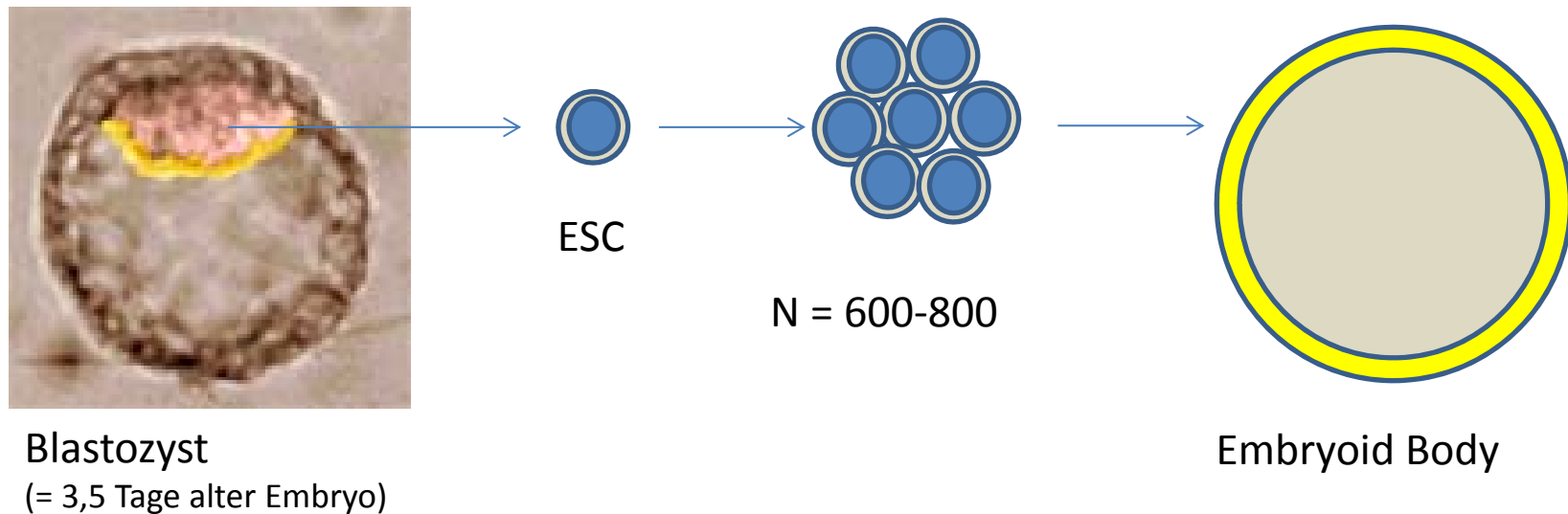
Erforschung von Entwicklungsprozessen – in vivo und in vitro

Erforschung von Krankheitsursachen

Herstellen von Embryoid Bodies und Organoiden

In vitro

Durch Aggregation von wildtyp und genetisch veränderten embryonalen Stammzellen und spontaner autonomer aber regulierbarer Differenzierung dieser Zellen.



→ Erforschung der Funktionen der einzelnen Gene und des Entwicklungspotentials der verschiedenen Stammzellen wurde so möglich.

2.1 Embryonale Stammzellen

Embryoid Bodies – ein Modell für die frühe Embryogenese?

Wie entstehen somatische Zellen in Embryoid Bodies?

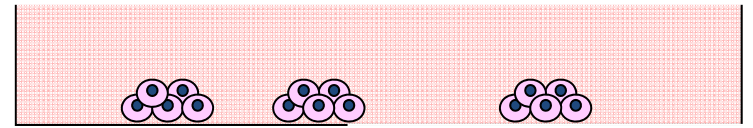
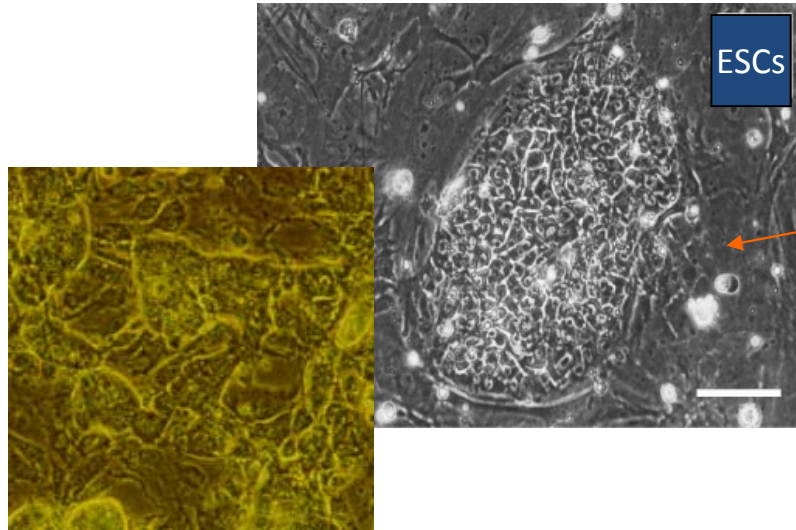
Ist die Gastrulation chaotisch, oder gibt es reproduzierbare morphologische Strukturen?

Vergleich der Entwicklungsabschnitte in vivo und in vitro

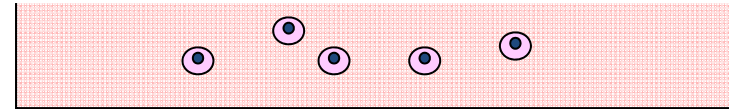
	In der Maus	Im Menschen
2.1.1	Pre-implantations Entwicklung: Tag 0 – 4	0 - (6-12)
2.1.2.	Pre-gastrulations Entwicklung : Tag 4 – 7	9 – 16
2.1.3.	Gastrulation / Keimblattbildung: Tag 7 - 9...	16 – 21...

Herstellung von Embryoid Bodies

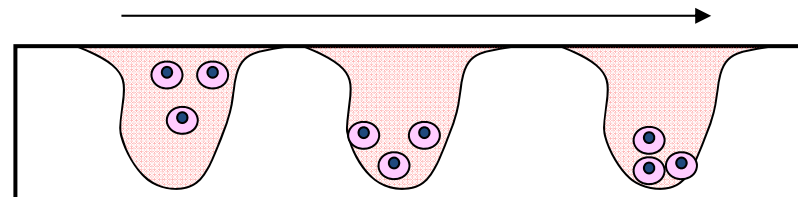
In vitro



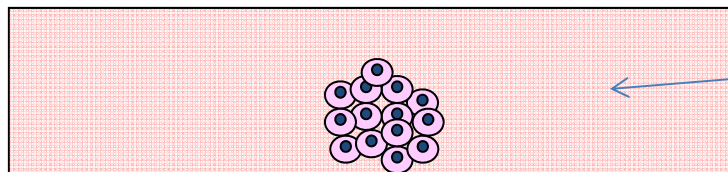
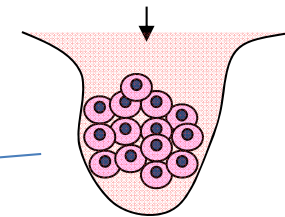
↓ 20 min. Trypsin



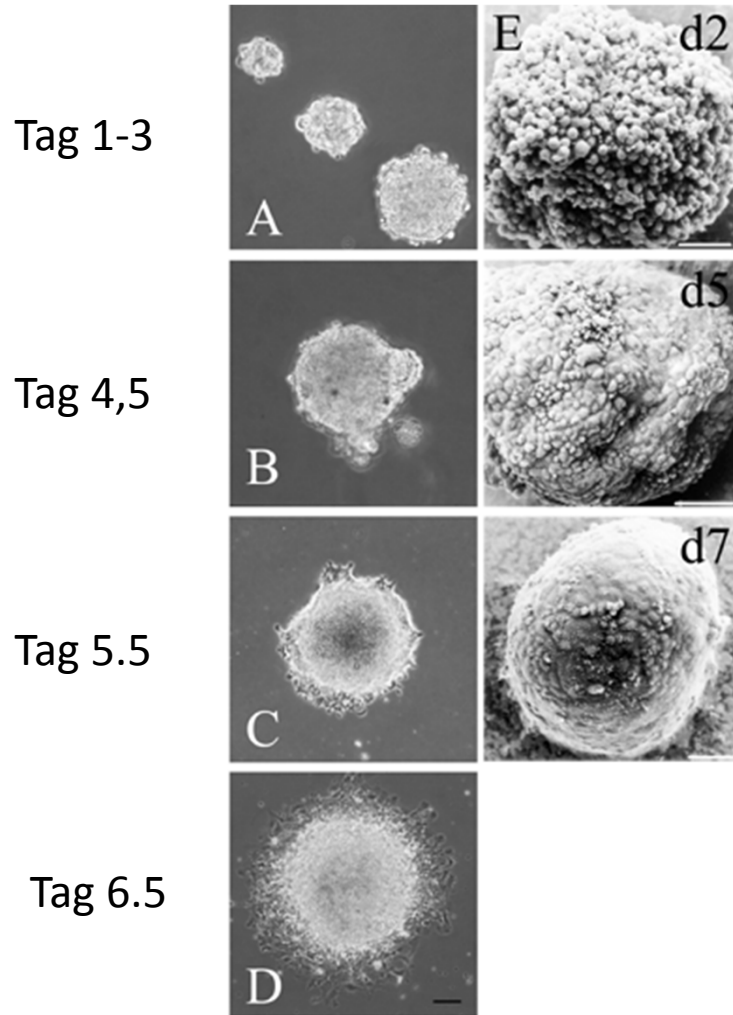
24 Stunden



4,5 Tage



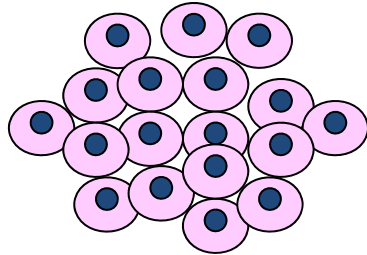
Embryoid Bodies



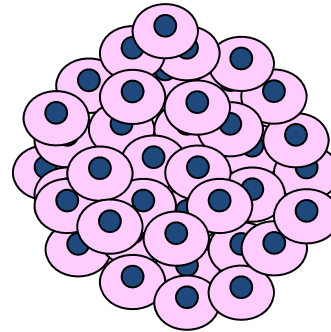
Anna Wobus,
Gatersleben, D

Erfinderin der von ESC
abstammenden Embryoid Bodies

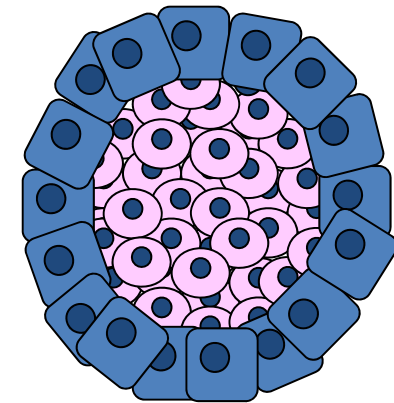
ESC Aggregat Tag 1



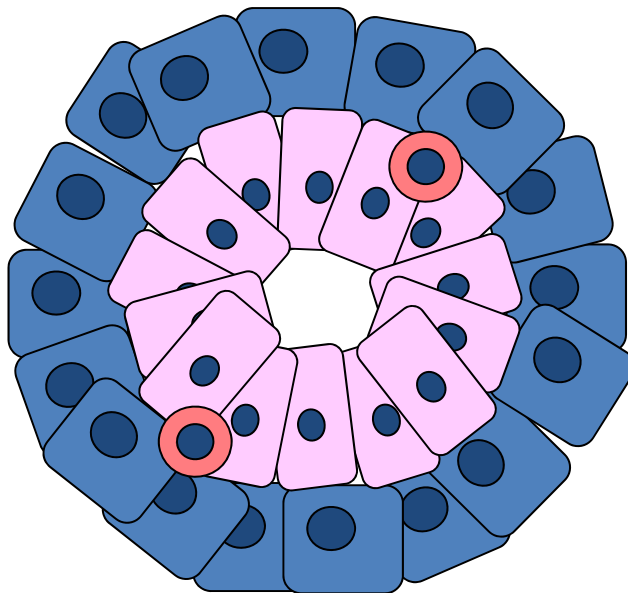
Kompaktierung Tag 1-2



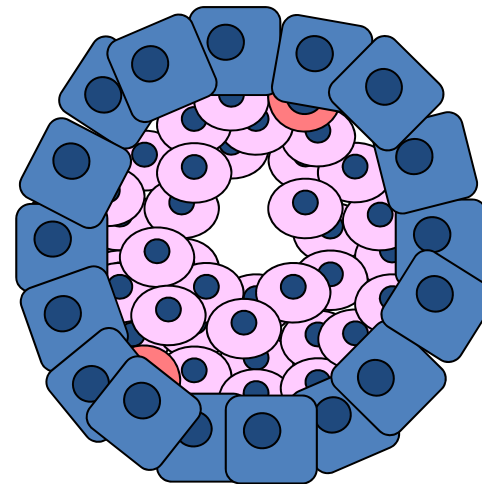
Embryoid Body Tag 3



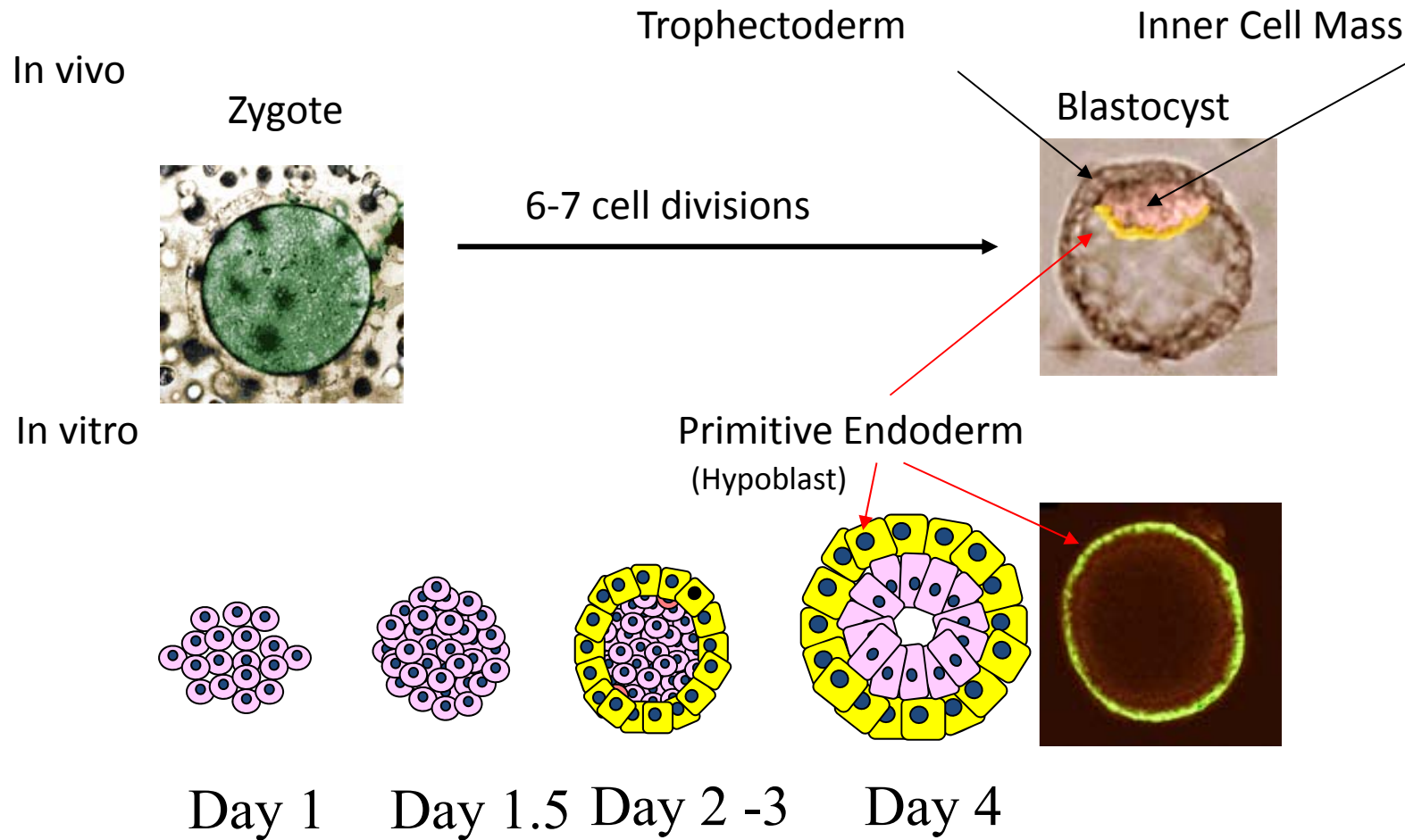
Embryoid Body Tag 4,5

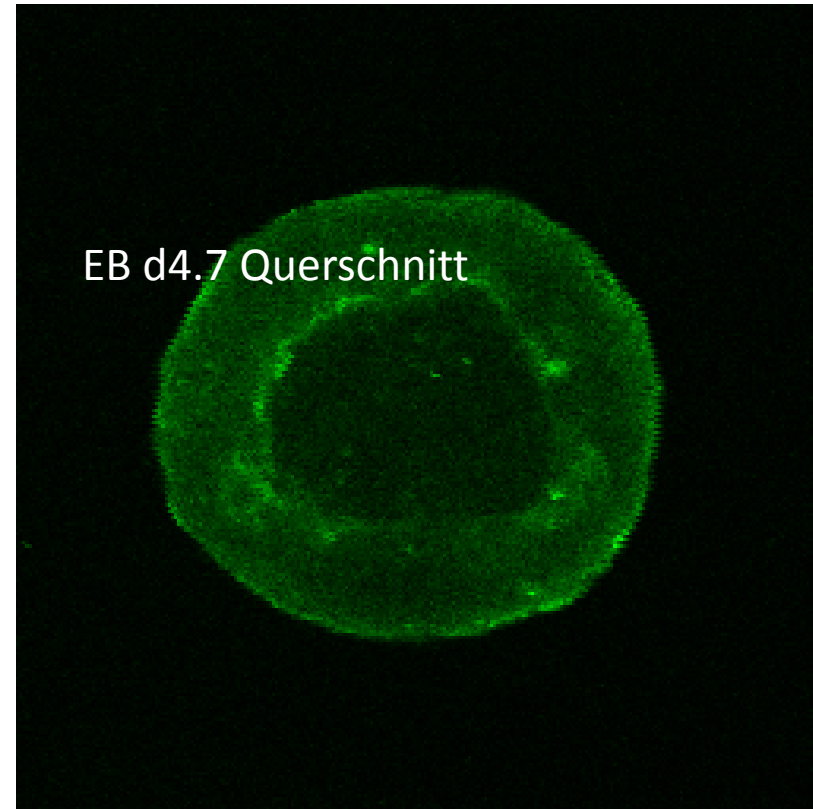
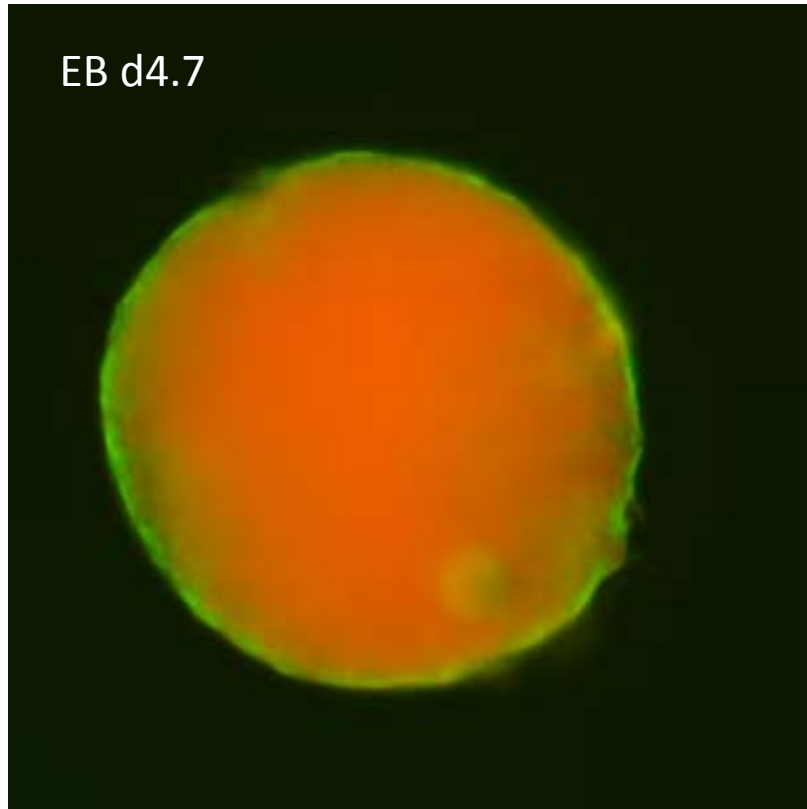


Embryoid Body Tag 4



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



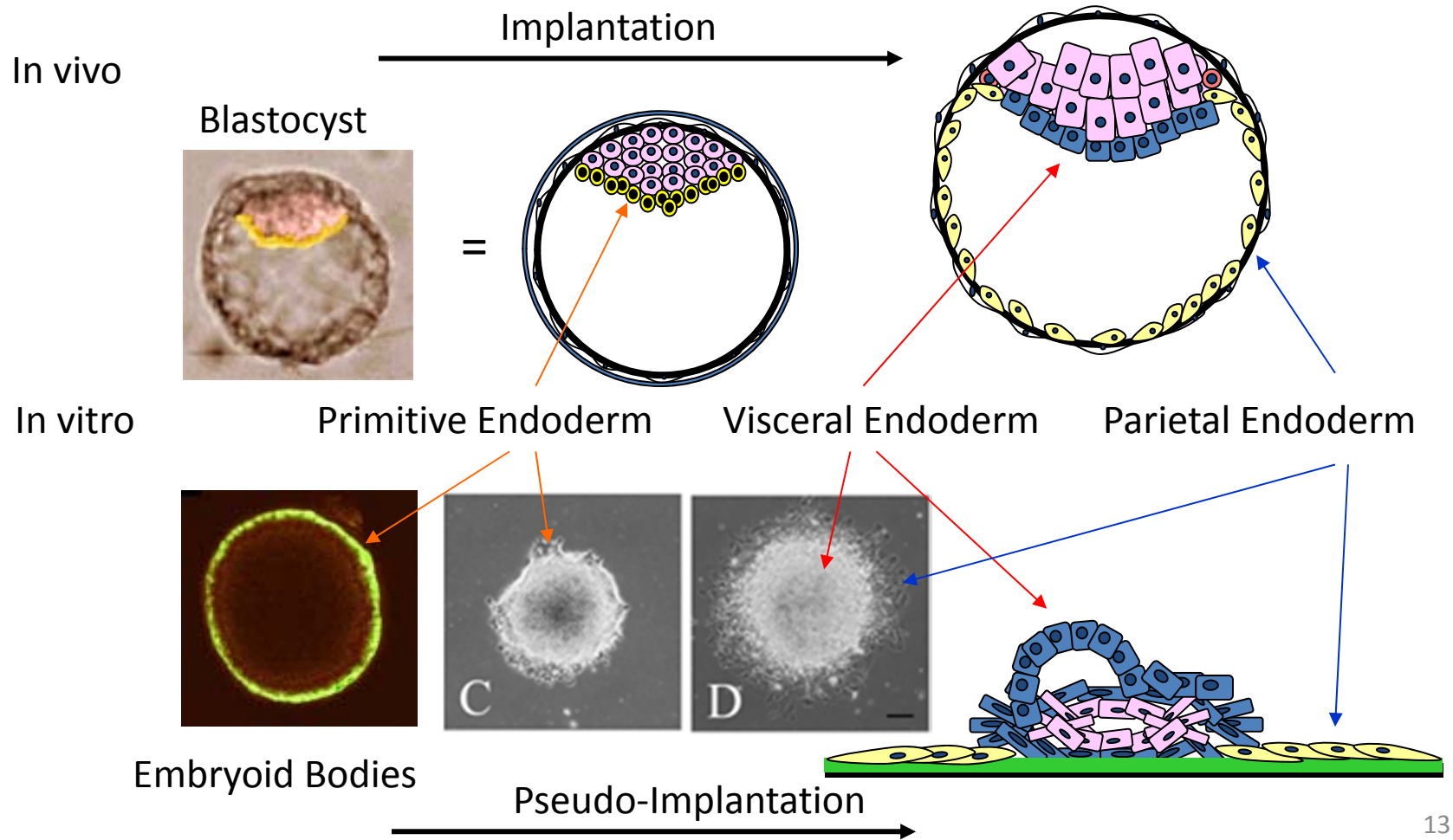


Der Hypoblast und Epiblast bildet sich, aber kein Trophektoderm.

Embryoid Bodies verhalten sich wie die Innere Zellmasse.

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

2.1.2. Pre-gastrulations Entwicklung: Day 4-7 Morphologische Evidenzen

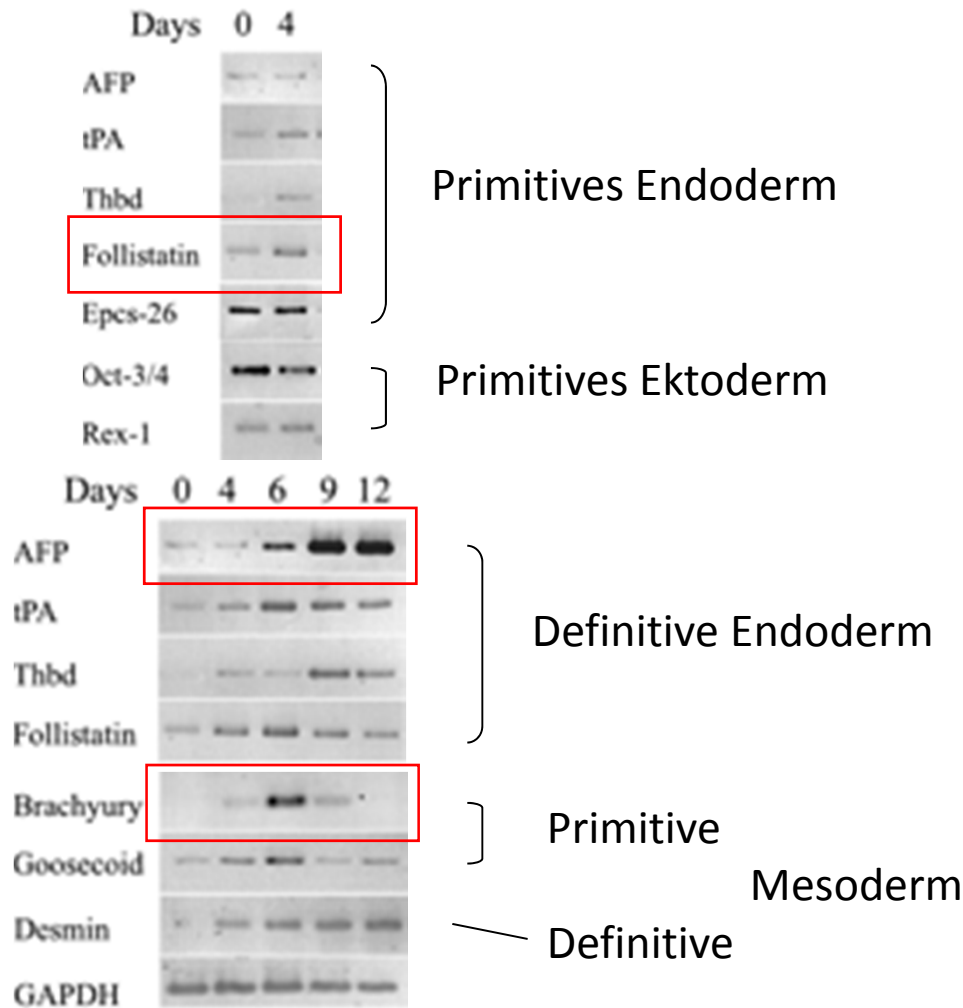


13

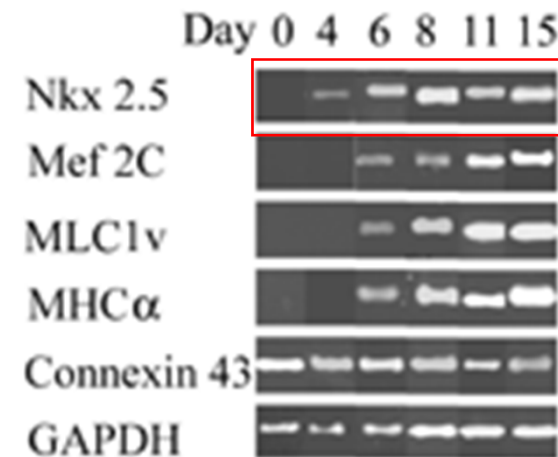
2.1.3. Gastrulation : Tag 7-9...

Molekulare Evidenzen

Genexpression in Embryoid Bodies typisch für:



Cardiomyocytes



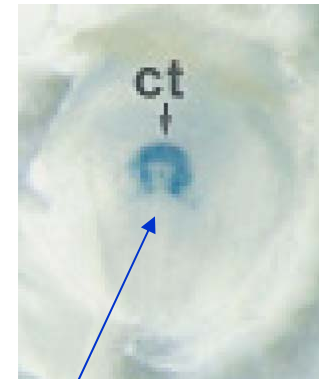
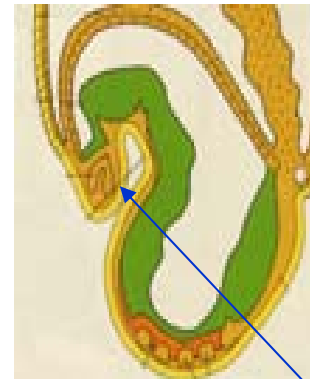
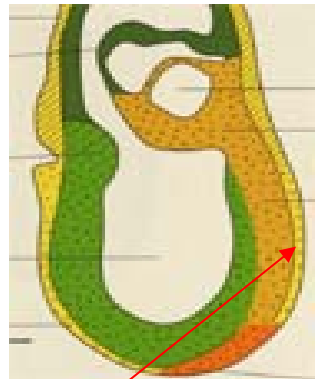
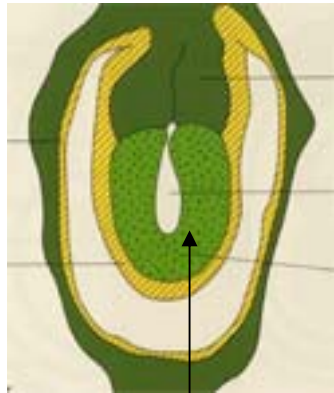
2.1.3. Gastrulation : Tag 7-9... Morphologische Evidenzen

In vivo

Egg cylinder stage

Primitive streak stage

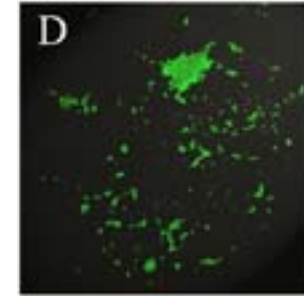
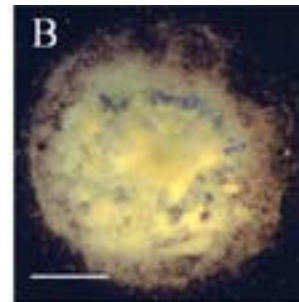
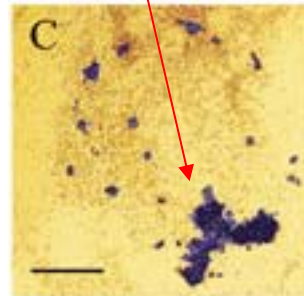
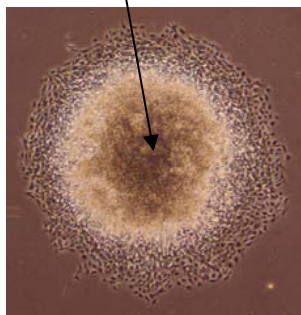
Head fold stage



In vitro Prim. Ectoderm

Primitive Mesoderm

Cardiocytes



Embryoid Body

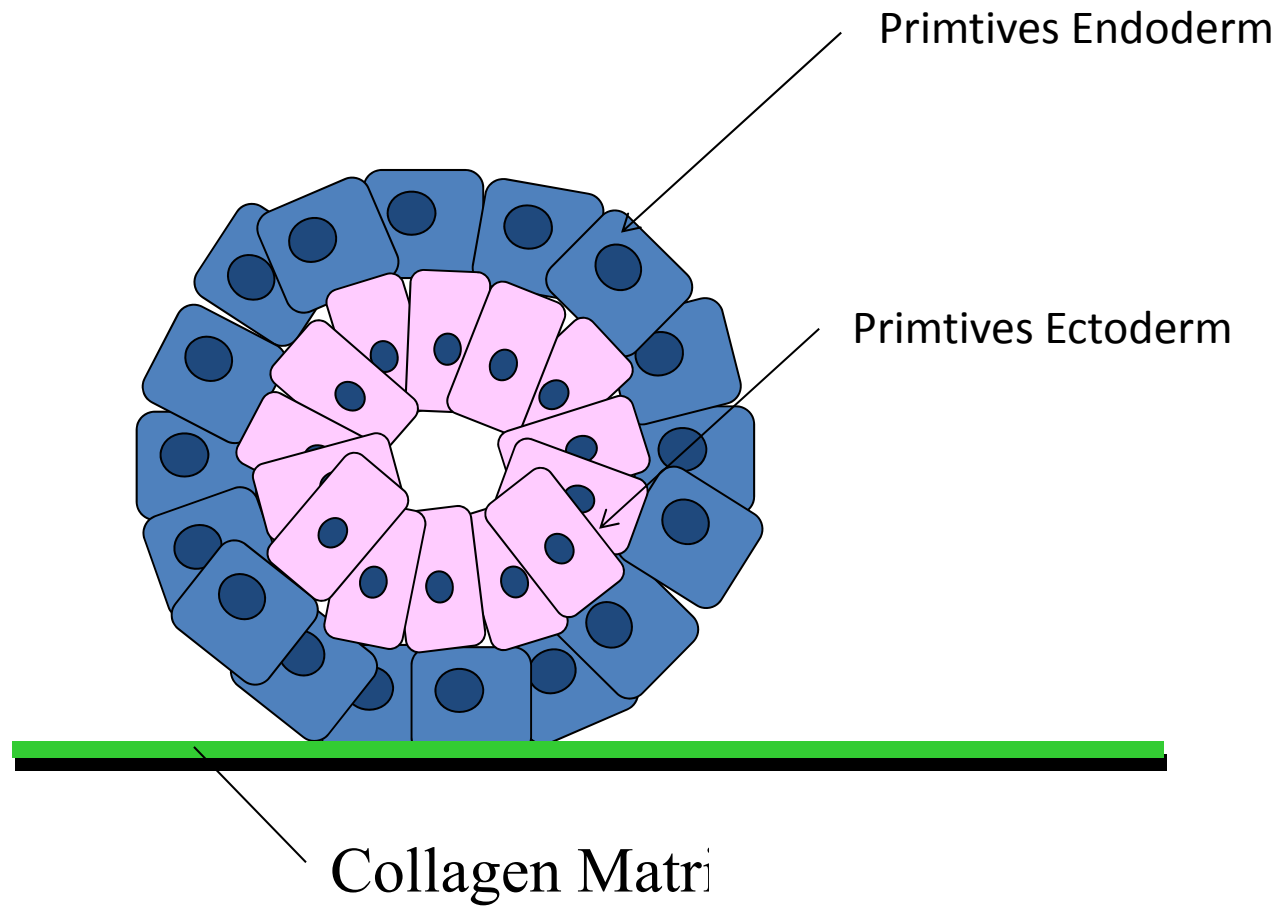
Day 6

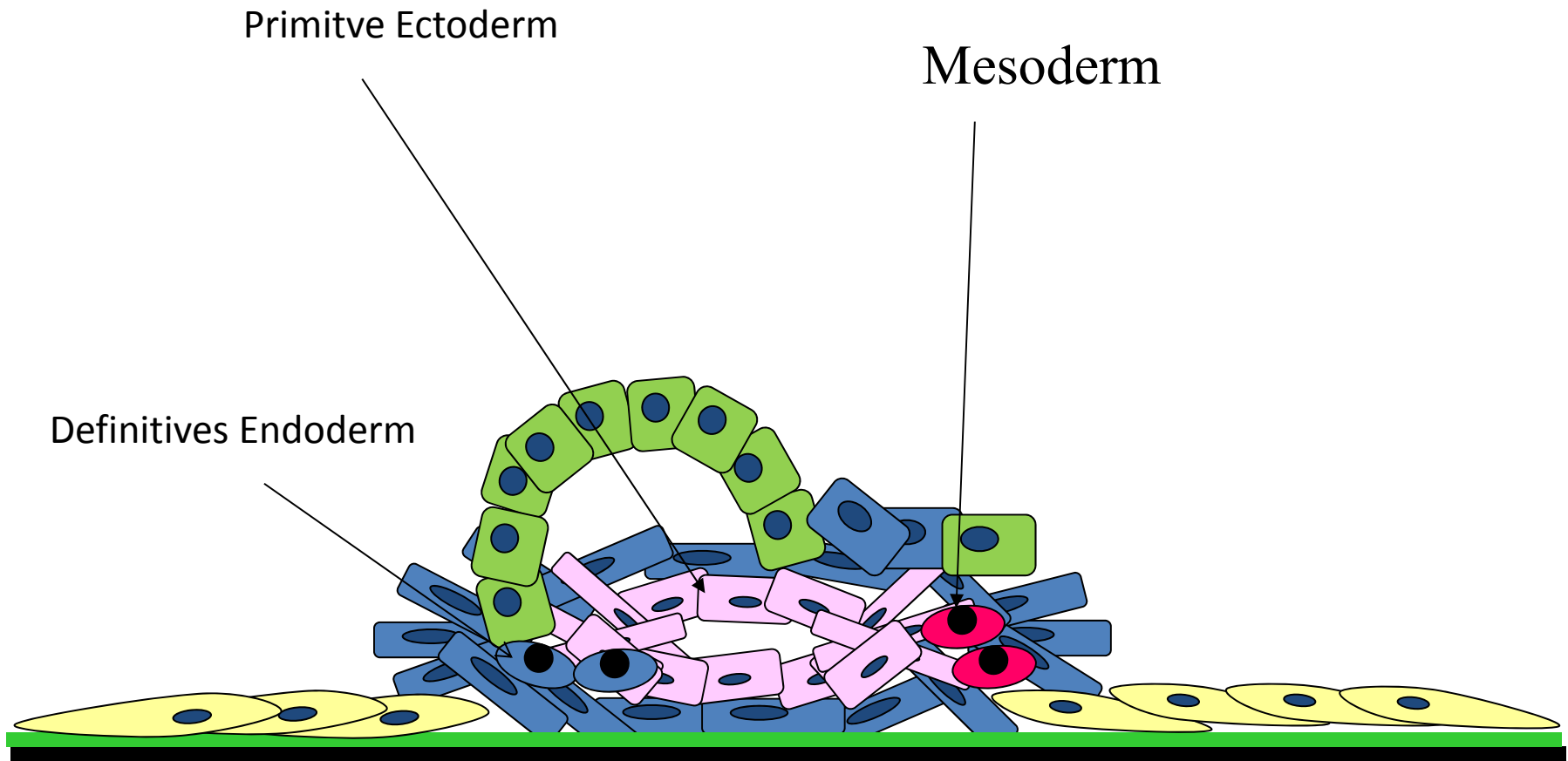
Erythrocytes

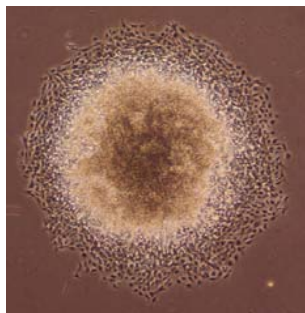
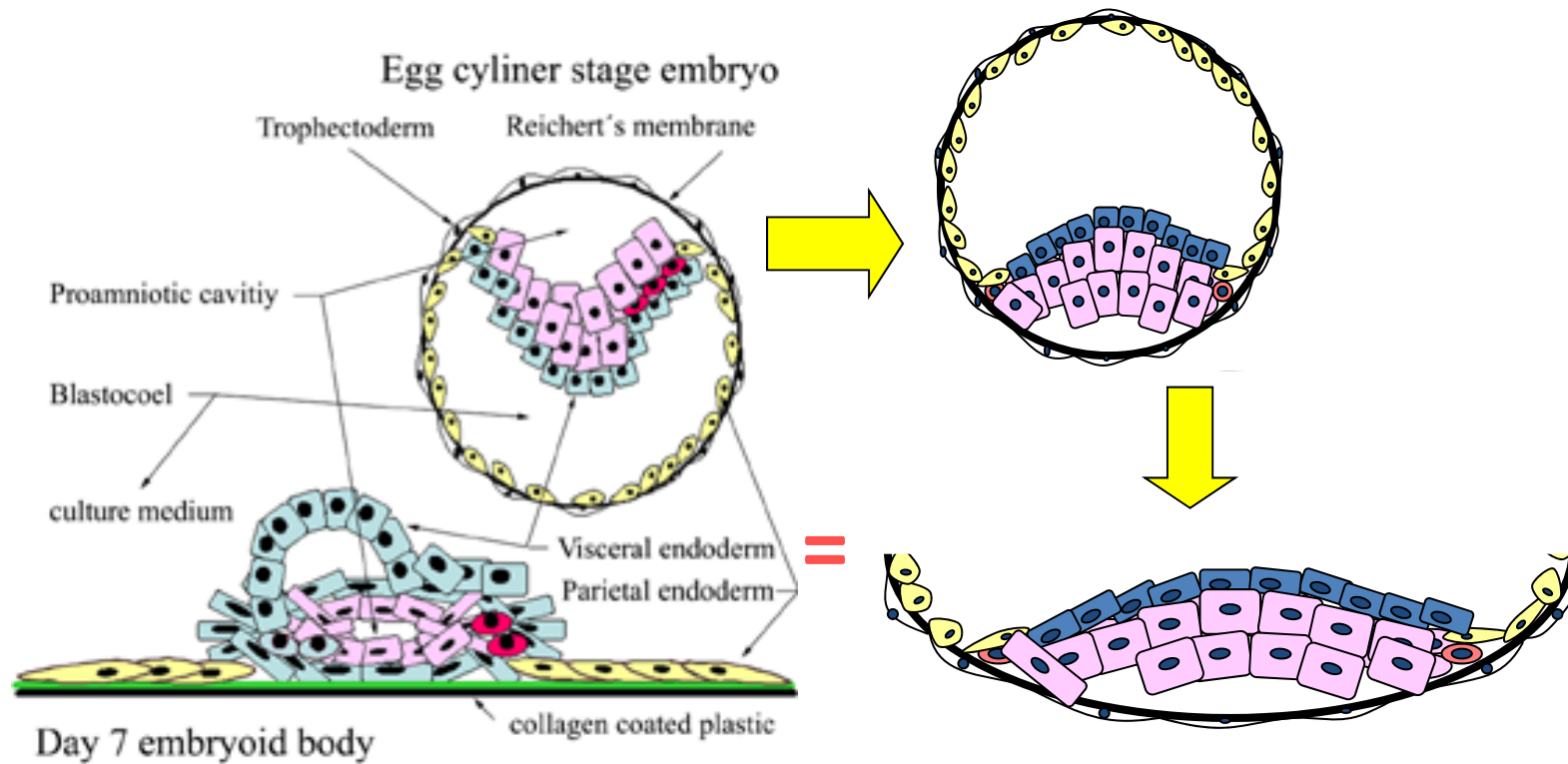
Day 8

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

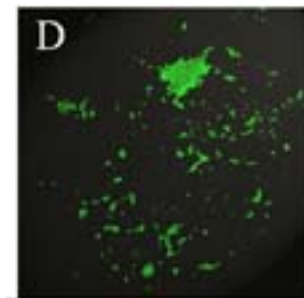
Pseudo-Implantation von Embryoid Bodies







Ist die Entstehung der somatischen Zellen während der Gastrulation chaotisch?



Development of “implanted” embryoid bodies

Point symmetry \longrightarrow Line symmetry

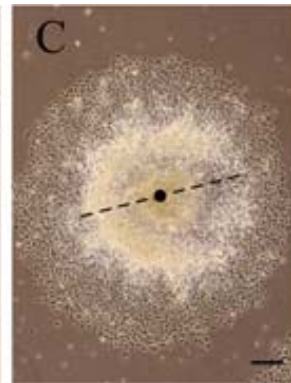
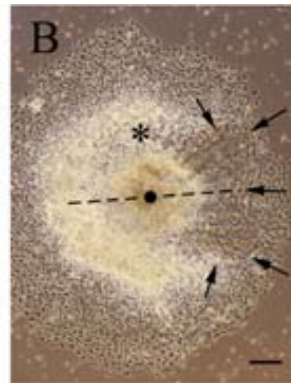
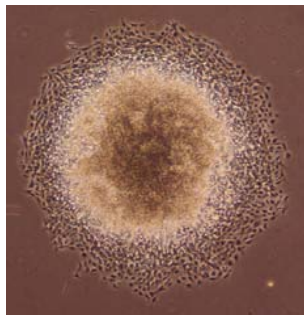
Day 6

Day 6.5

Day 7.0

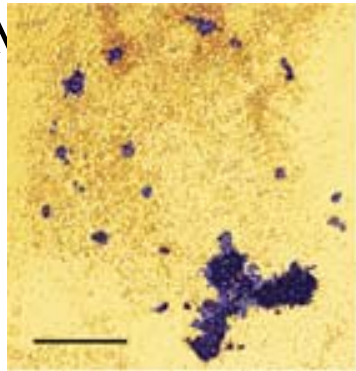
Day 8.0

Day 9.0

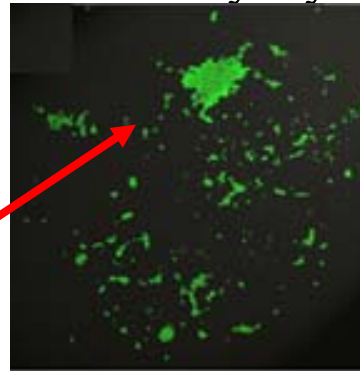


Mesodermbildung in Embryoid Bodies

Primitive EB



Cardiomyocyt

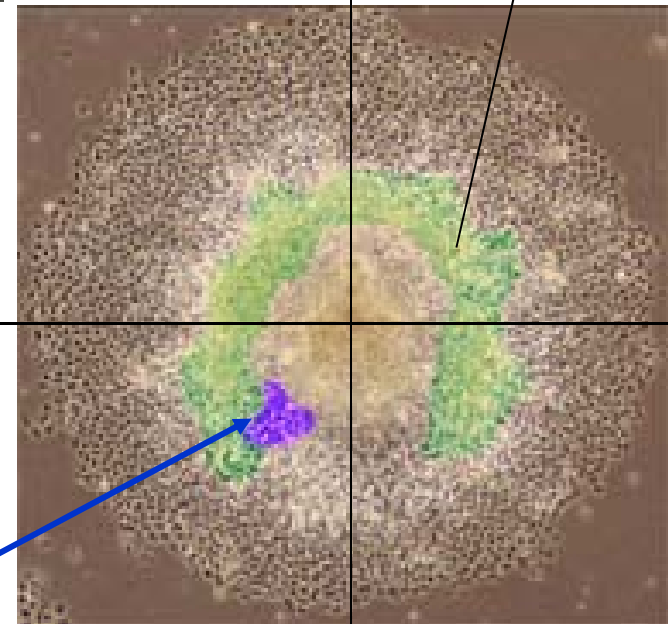


Braking line symmetry

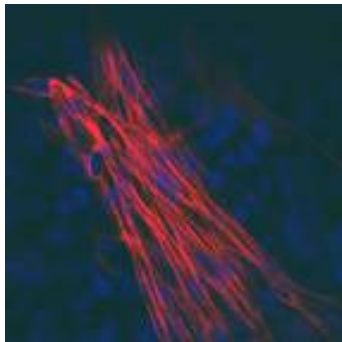
Area where mesodermal cells emerge

left

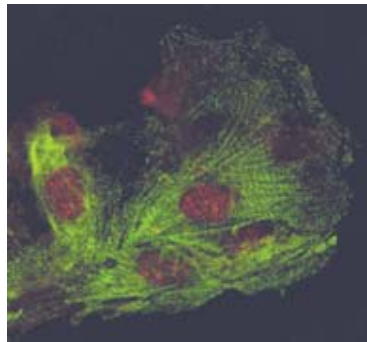
right



Brachyury



MHC α



upper

lower

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



Embryoid Bodies sind asymmetrisch!

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

Ohne Beeinflussung entstehen alle Zelltypen.

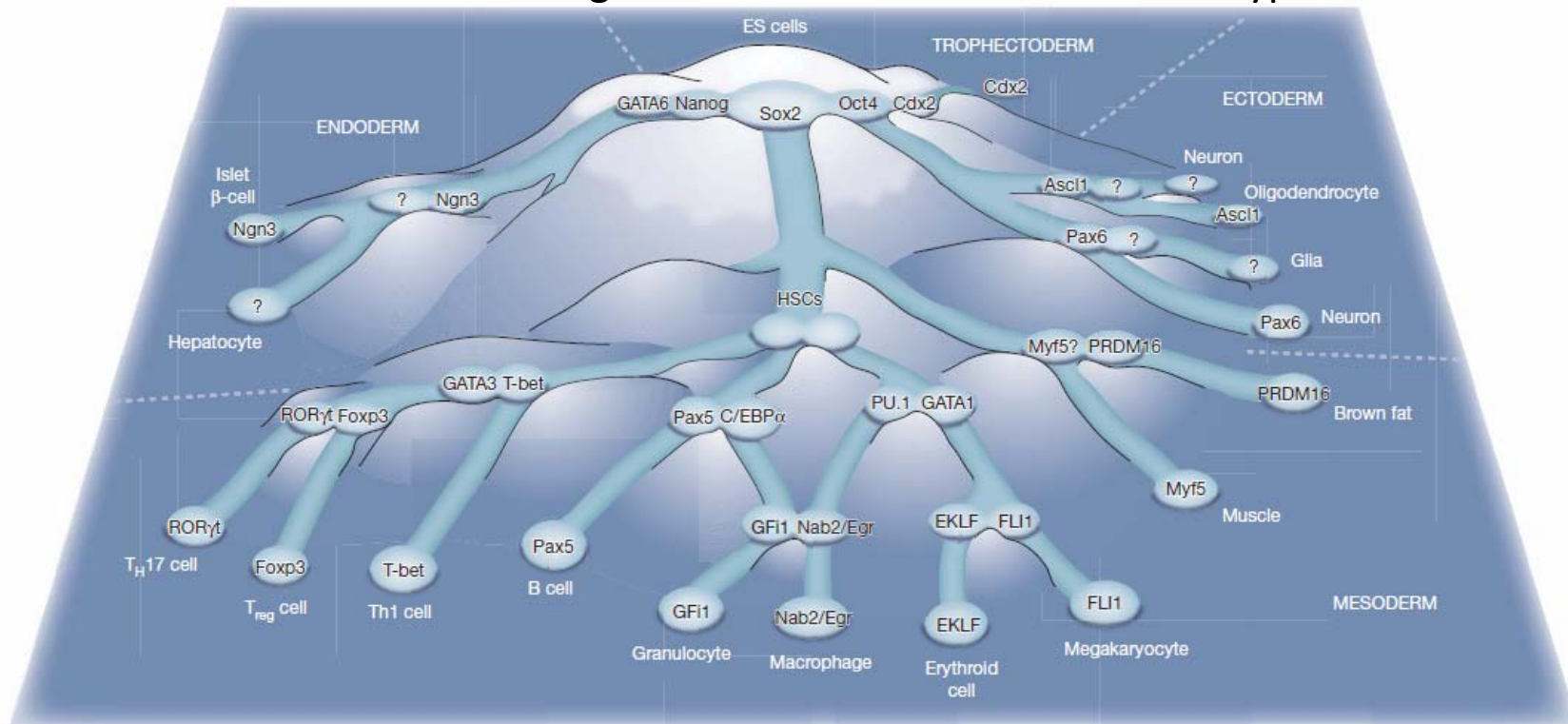


Figure 5 | Transcription factor cross-antagonisms in a cascading landscape of unstable and stable cell states. The territory, represented as a mountain range, depicts all possible solutions of a single regulatory network that specifies cell identity. Robust network states correspond to stably differentiated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

BEISPIELE FÜR GERICHTETE DIFFERNZIERUNG

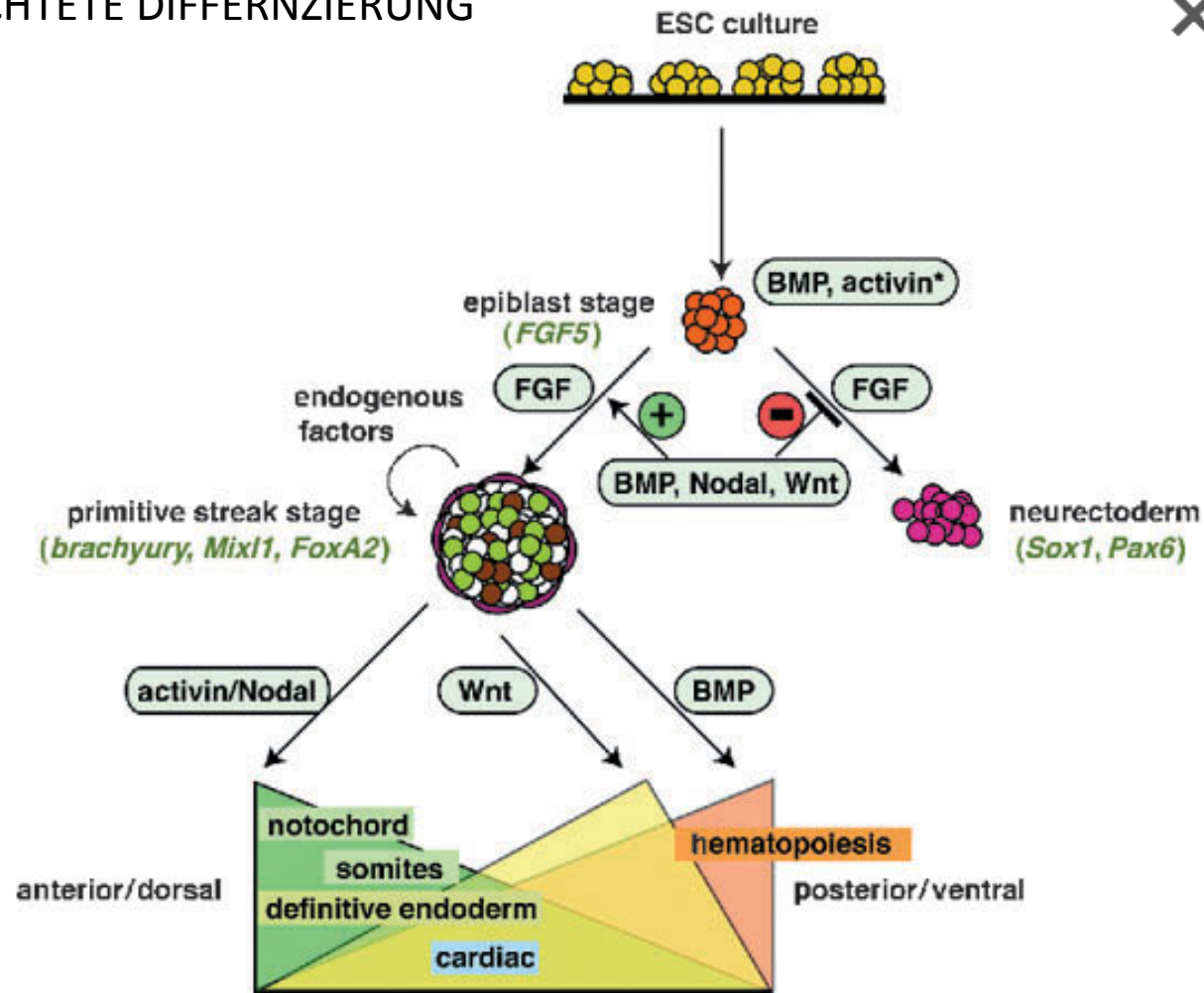


Figure 1D.1.2
Image 2 of 2

Gezielte Differenzierung von ESCs in vitro

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 Scholesa, Gautam Dravida, Xinmin Lia, W. Robb MacLellanb, and Gay M. Crooksa, 13742–13747 | PNAS | August 3, 2010 | vol. 107 | no. 31

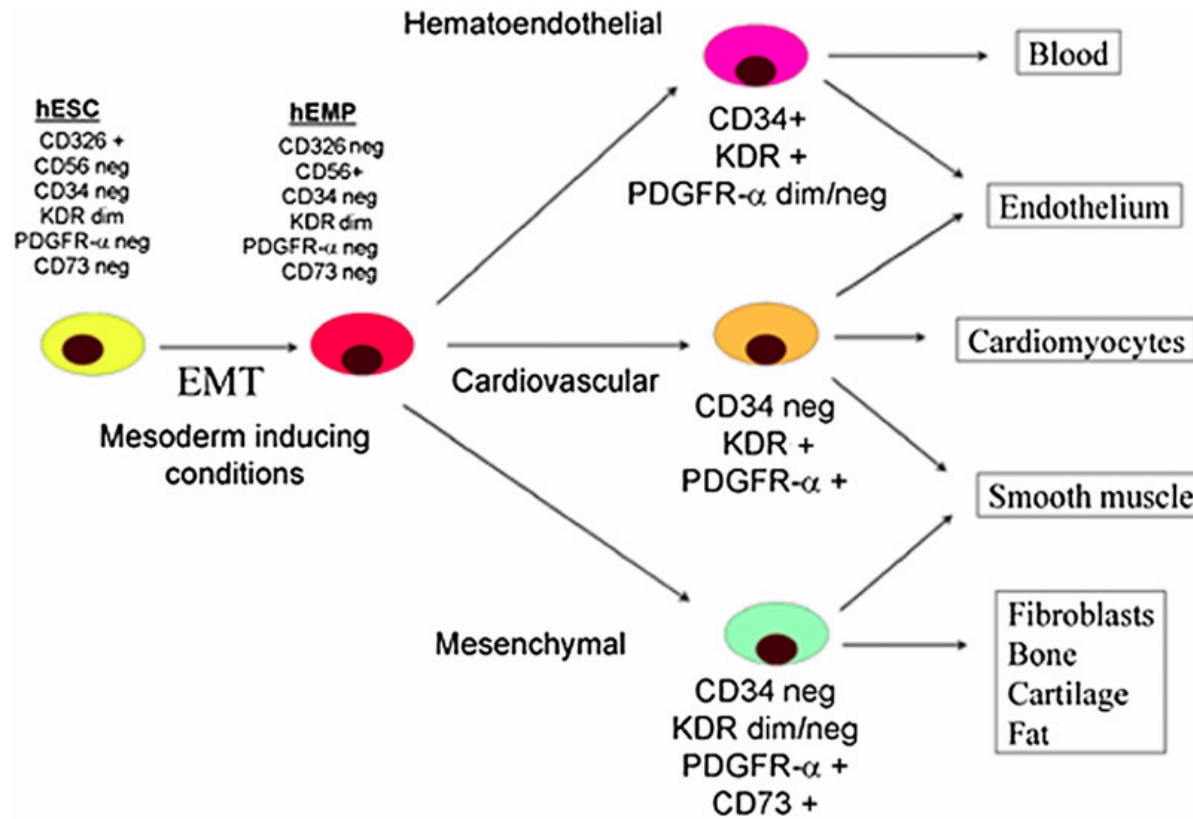
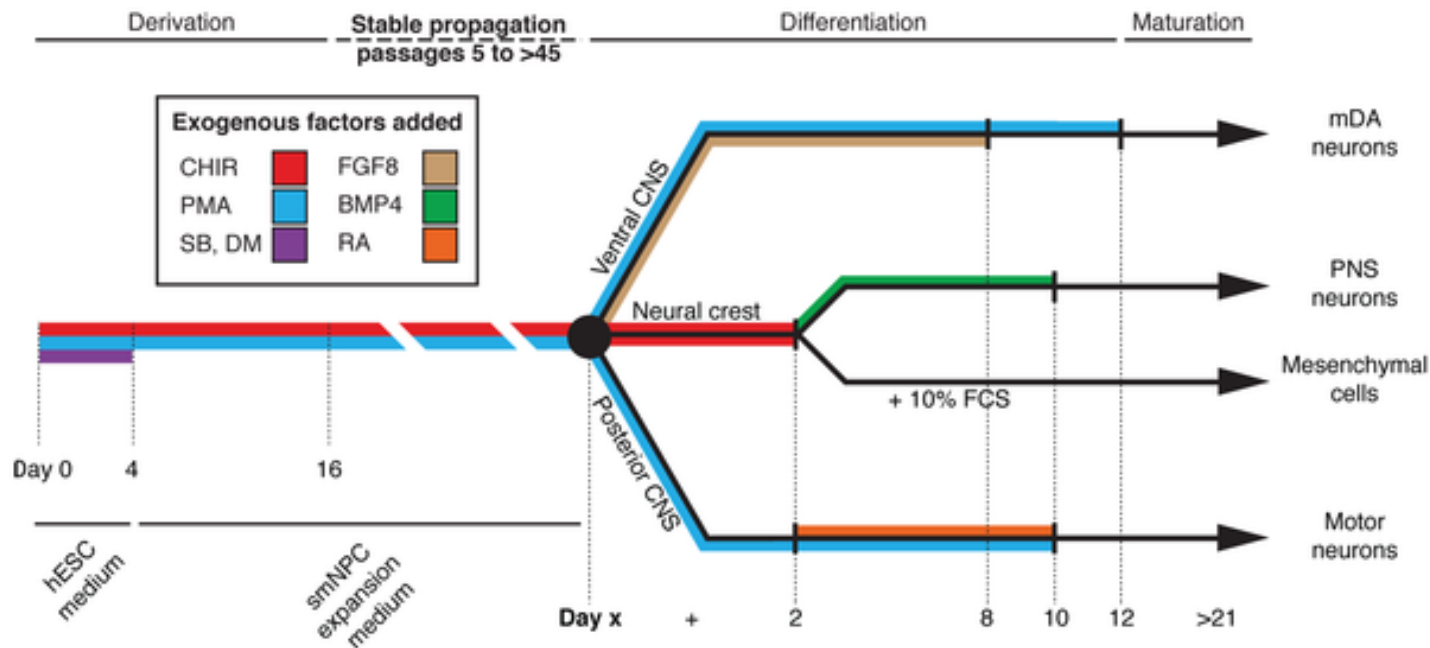


Fig. 4. Proposed model of cell surface marker expression during mesodermal specification from hESCs. The initial stage of mesoderm commitment is marked by the process of EMT during which the CD326–CD56+ population is generated. Subsequent commitment to mesoderm populations with more restricted potential is identified by day 7 of induction cultures by differential expression of the surface markers KDR, PDGFR- α , CD34, and CD73. The phenotype of precursors to the day 7 populations shown is yet to be delineated.

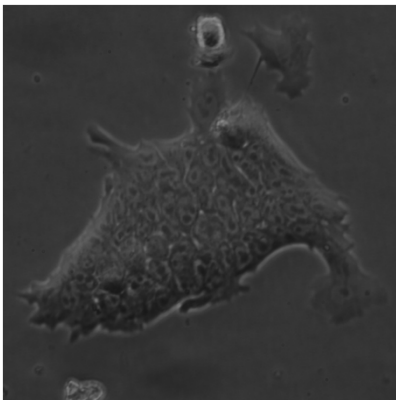
Figure 8. Summary of smNPCs.



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>

4.2. Somatische Stammzellen

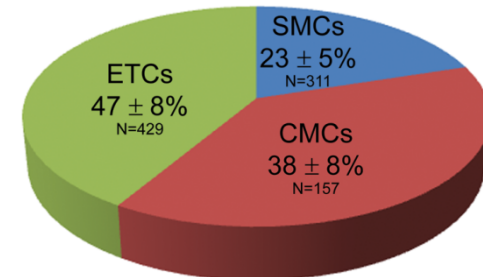
4.2.1. Herzstammzellen → Cardiac bodies



Differenzieren zu



Herzmuskelzellen
Vaskulären Endothelzellen
Glatten Muskelzellen
? Herzspezifischen Fibroblasten

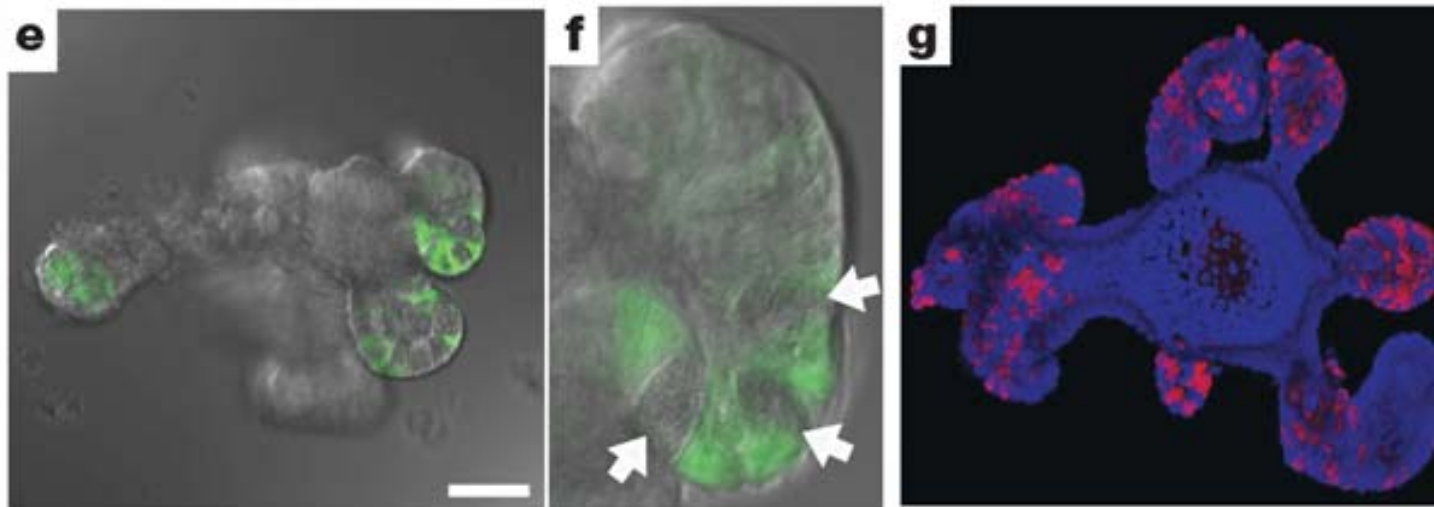


4.2.2. Neuronale Stammzellen → Neurosphären → verschiedene Typen von Nervenzellen

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

1. Mini Darm (Erstes Organoid) - 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 crypts¹. 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.



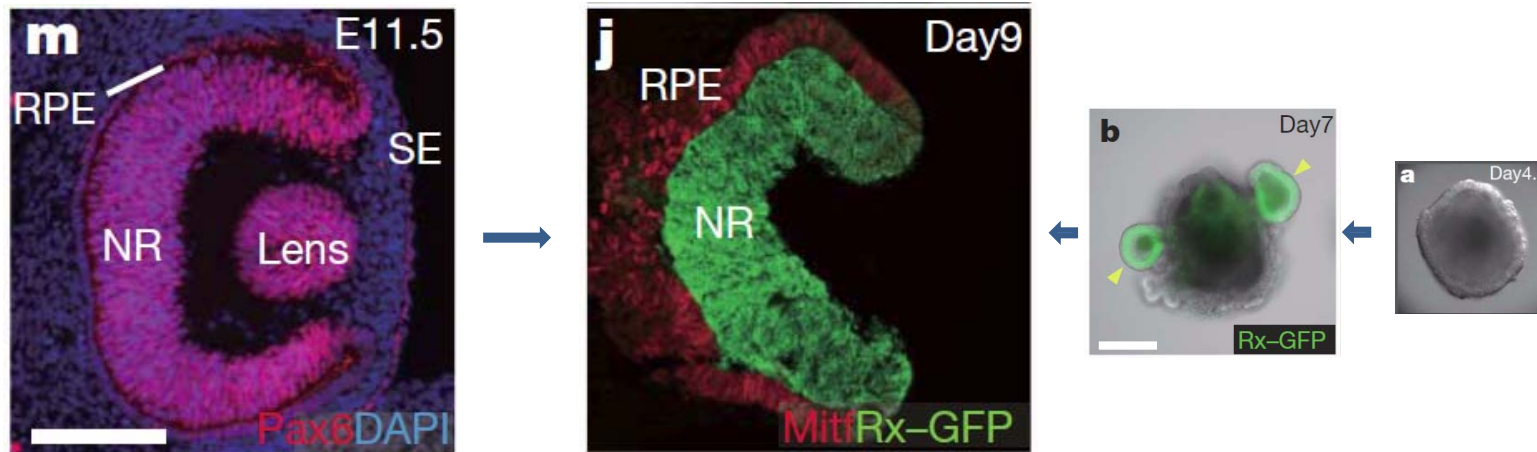
e, f, Fourteen days after sorting, single GFP^{hi} cells form crypt organoids, with Lgr5–GFP⁺ cells and Paneth cells (white arrows) located at crypt bottoms. Scale bar, 50 μ m. **f**, Higher magnification of **e**. **g**, Organoids cultured with the thymidine analogue EdU (red) for 1 h. Note that only 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

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



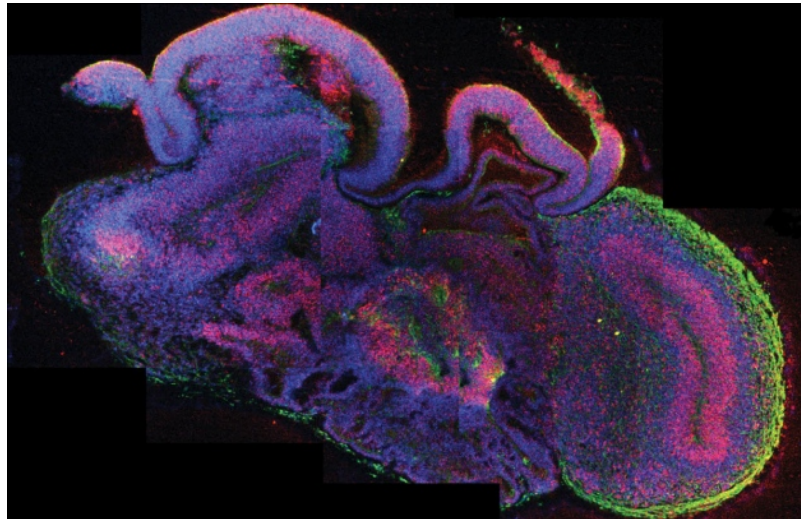
Maus

Embryoid bodies

doi:10.1038/nature09941

7 APRIL 2011 | VOL 472 | NATURE | 51

3. Hirn



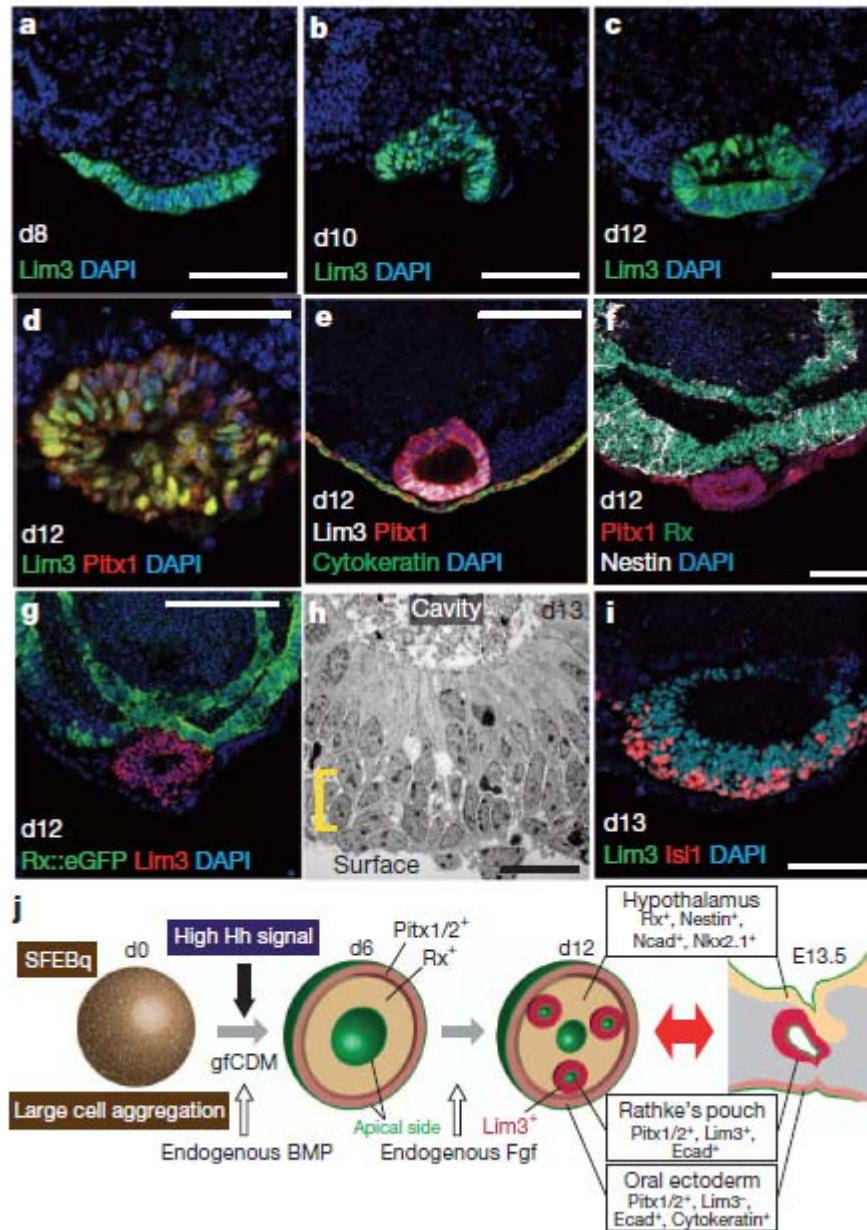
Cerebral organoids model human brain development and microcephaly

[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**

4. Adenohypophyse



Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture

Hidetaka Suga, Taisuke Kadoshima, Maki Minaguchi, Masatoshi Ohgushi, Miika Soen, Tokushige Nakano, Nozomu Takata, Takafumi Wataya, Keiko Muguruma, Hiroyuki Miyoshi, Shigenobu Yonemura, Yutaka Oiso & Yoshiki Sasai

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), pan-cytokeratin (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

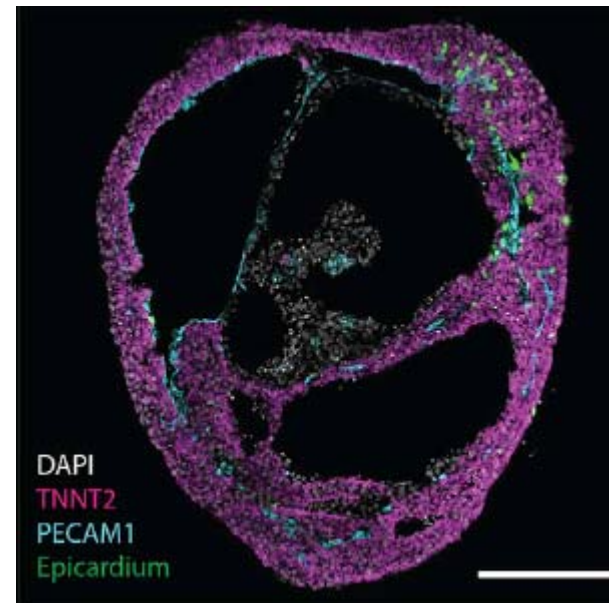
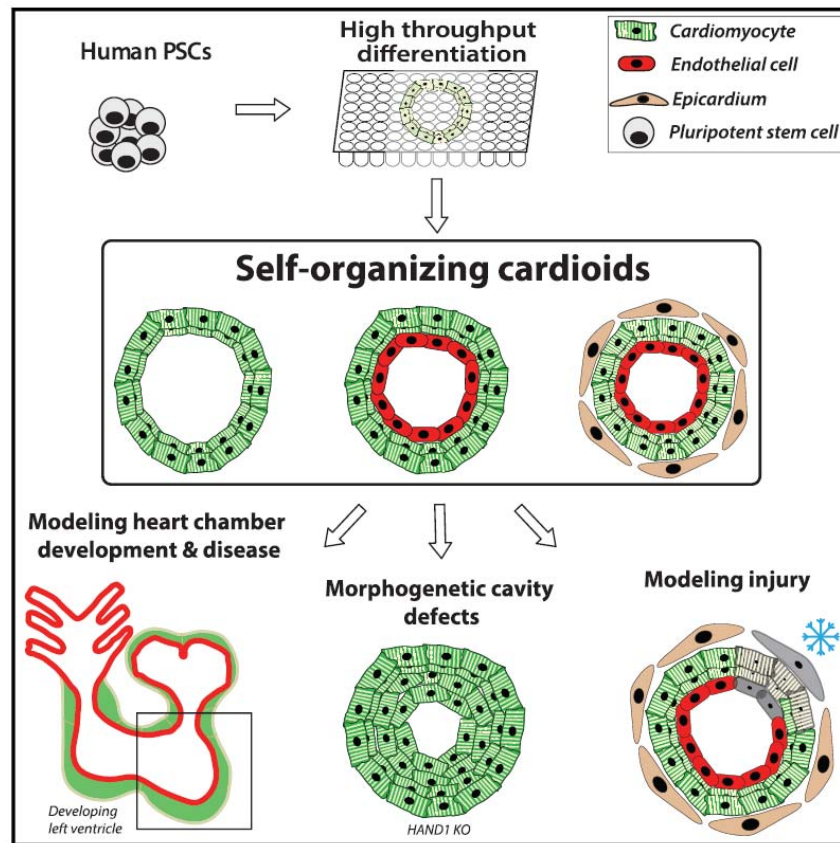
Suga et al., 2011 | VOL 480 | NATURE | 57 doi:10.1038/nature10637

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.

5. Herz-ähnliche Organoide - Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis.

Hofbauer P, Jahnel SM, Papai N, Giesshammer M, Deyett A, Schmidt C, Penc M, Tavernini K, Grdseloff N, Meledeth C, Ginistrelli LC, Ctorteccka C, Šalic Š, Novatchkova M, **Mendjan S**. Cell. 2021 Jun 10;184(12):3299-3317.e22. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.034. Epub 2021 May 20. PMID: 34019794

Graphical abstract



Thema diese Seminars:

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

Fragen:

Welche Arbeiten über Organoide wurden zwischen 2016 und 2021 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 Organoide?

Was sind Organe?

Was ist ein Organ?

Ein Organ (von [altgriechisch](#) ὄργανον *órganon*, 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](#) während der Ontogenese eines Organismus.

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

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

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, Cardiosphären und Neurosphären.

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.

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

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

Organoid: 16432 (11.10.2021) Einträge in der Datenbank PUBMED (12065 am 11.9.2019.)

Advanced therapy medicinal products (ATMPs)

Suchbegriff combination: atmp OR "atmps" 365 Einträge (208; 11.9.2019)

- zu wenig, weil zu Komplex - deshalb zB

"medicinal product" 1240 Einträge (895; 11.9.2019)

"medicinal product" AND organoid(s) 1

organoid AND "medical product" 0

→ Suche nach “organoids” in der Grundlagenforschung notwendig!

organoid[ti] 1027 Einträge (537; 12.9.2019)

→ organoid[ti] AND <organ type>