

## 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

Georg Weitzer

MAX  
PERUTZ  
LABS

MEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN



1

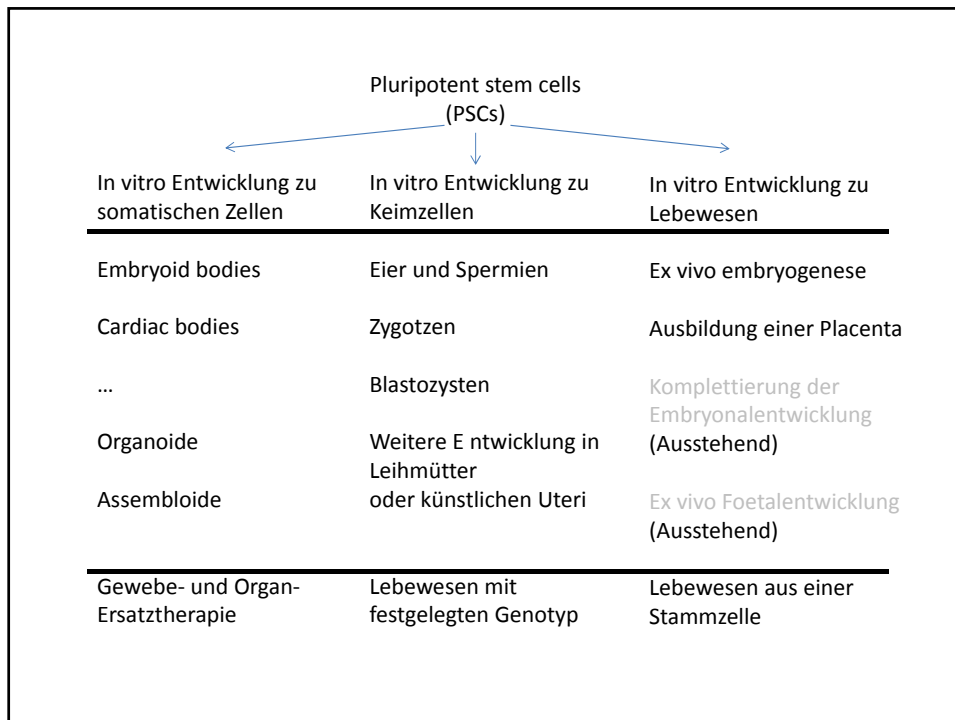
## Inhalt

---

- 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?

MAX  
PERUTZ  
LABS

2



## Was kann man mit Stammzellen machen?

Grundlagenforschung

**Stammzellenbiologie: Wie funktionieren Stammzellen?**

Erforschung von Entwicklungsprozessen

Erforschung von Krankheitsursachen

Zusammenfassung

Stammzellen sind ein gutes Modell für grundlegende Arbeiten zur Zellbiologie zum Studium der

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?

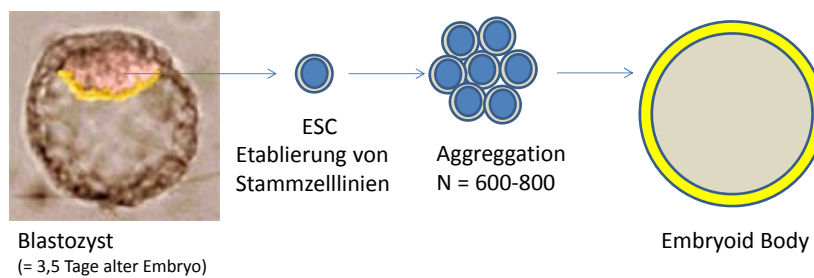
Erforschung von Entwicklungsprozessen – *in vivo* und *in vitro*

Erforschung von Krankheitsursachen

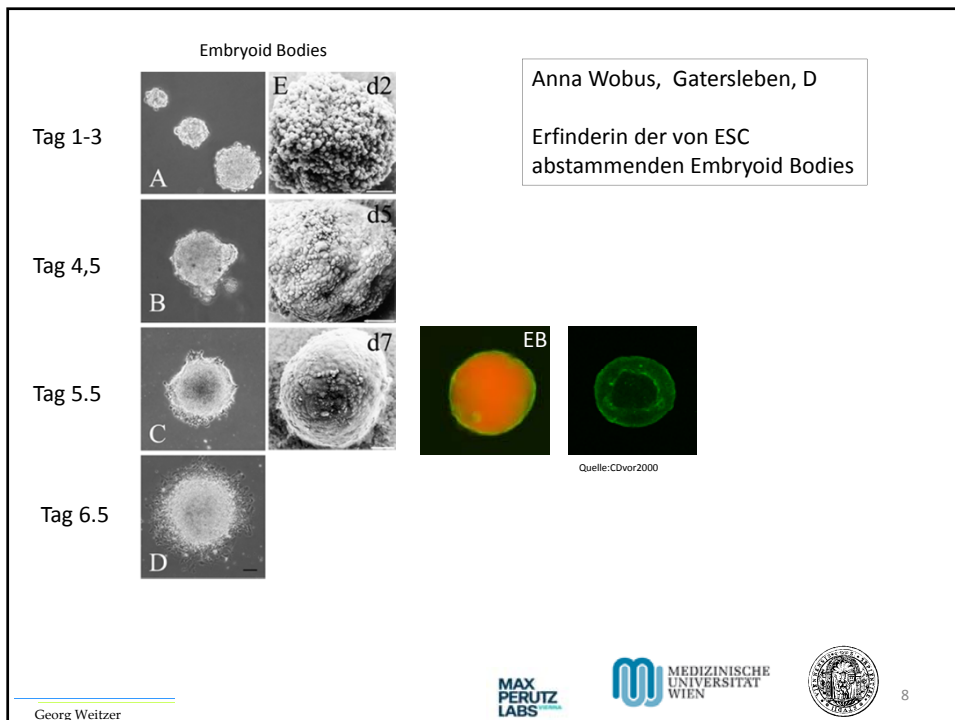
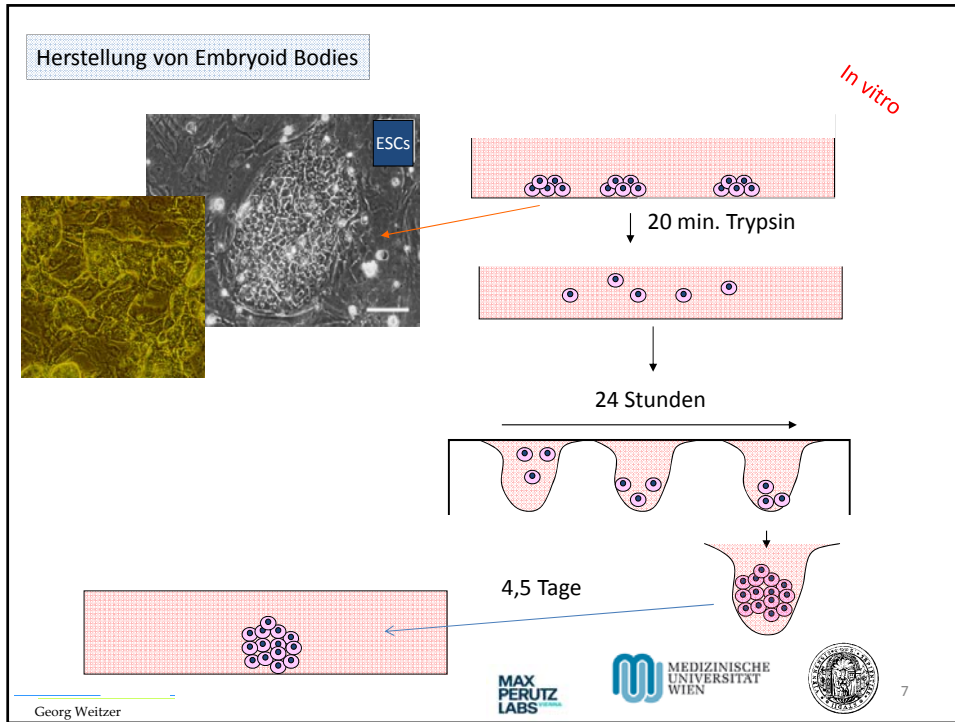
### Herstellen von Embryoid Bodies und Organoiden

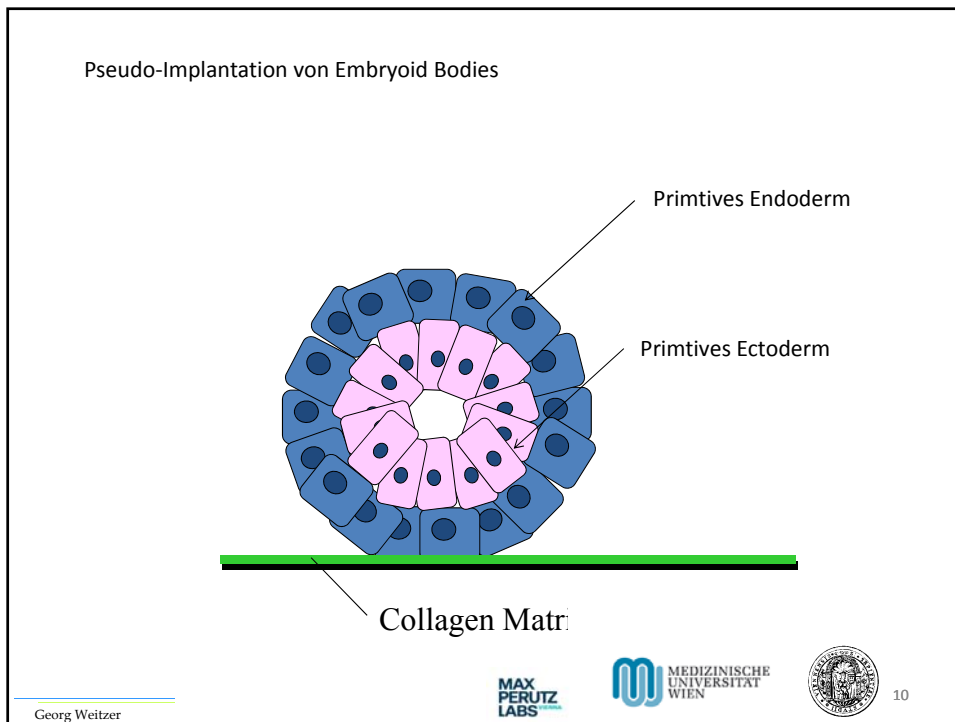
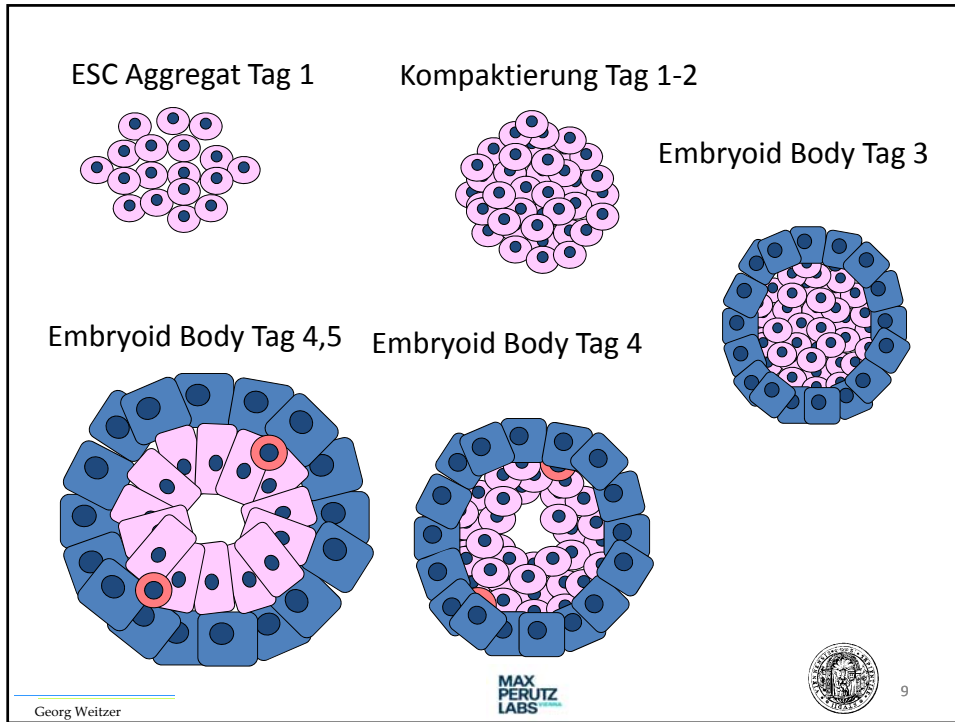
*In vitro*

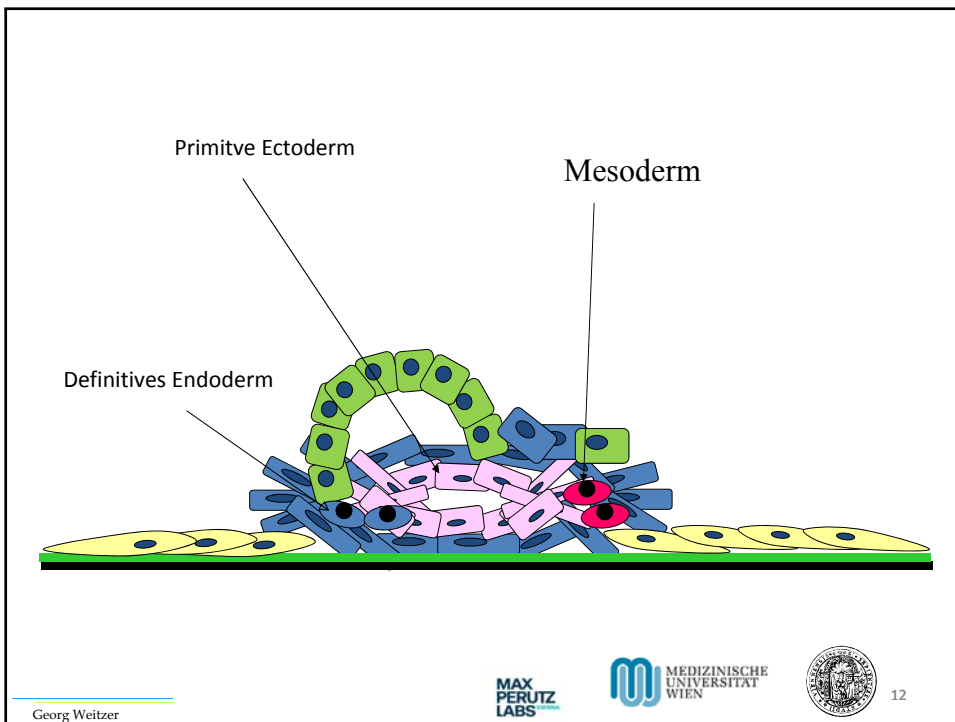
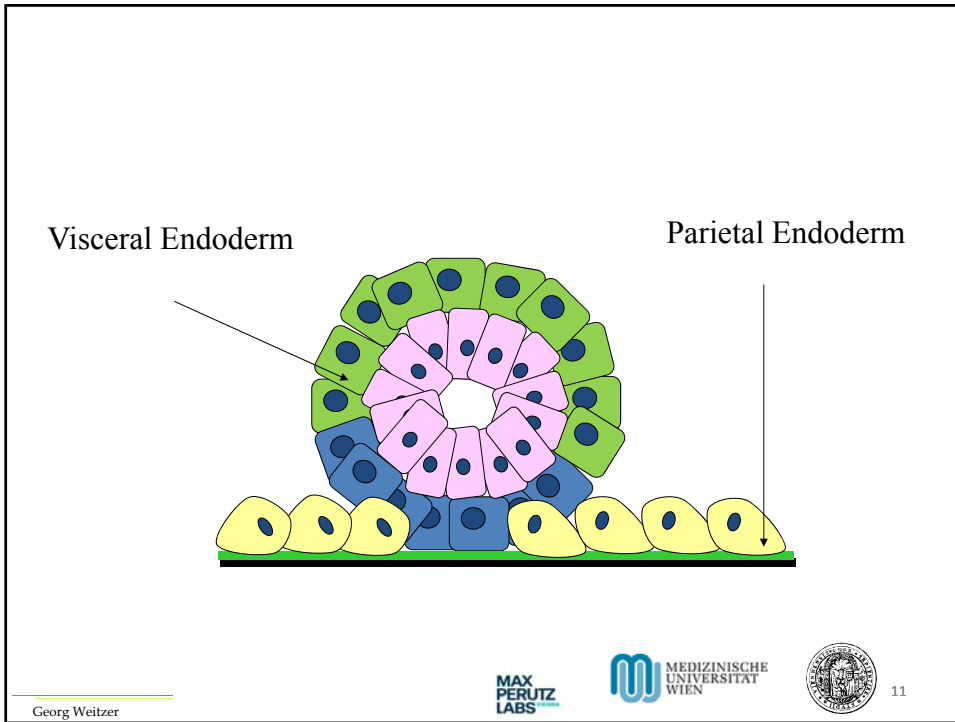
Durch Aggregation von wildtyp und genetisch veränderten embryonalen Stammzellen und spontaner autonomer aber regulierbarer Differenzierung dieser Zellen.



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







**Egg cylinder stage embryo**

Trophectoderm 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

13

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

Ohne Beeinflussung ..... entstehen alle Zelltypen.

ES cells

TROPHECTODERM

ENDODERM

ECTODERM

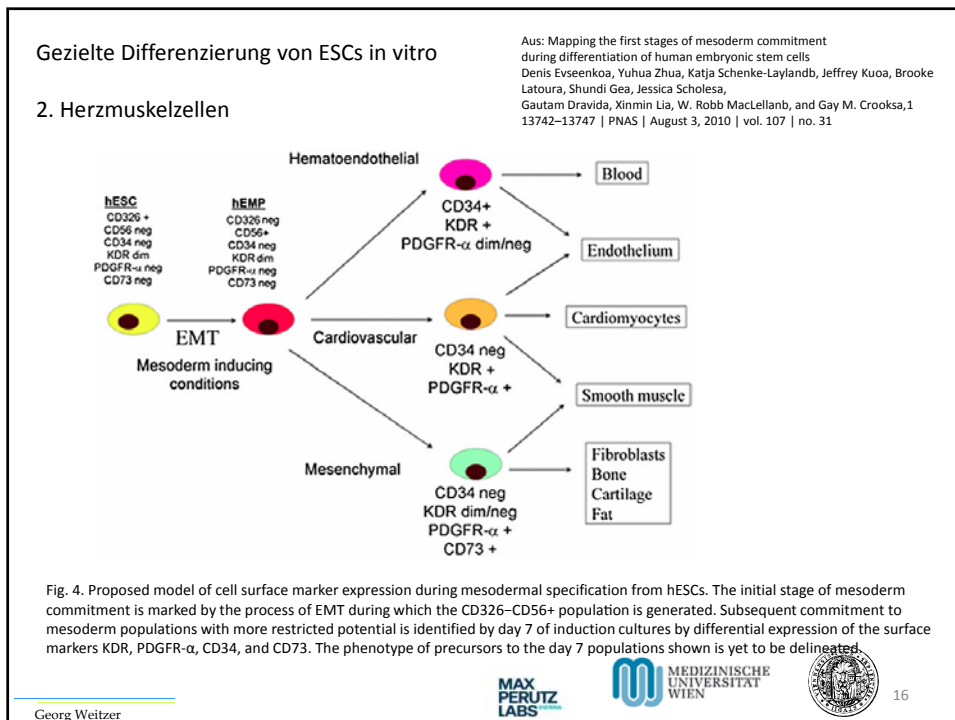
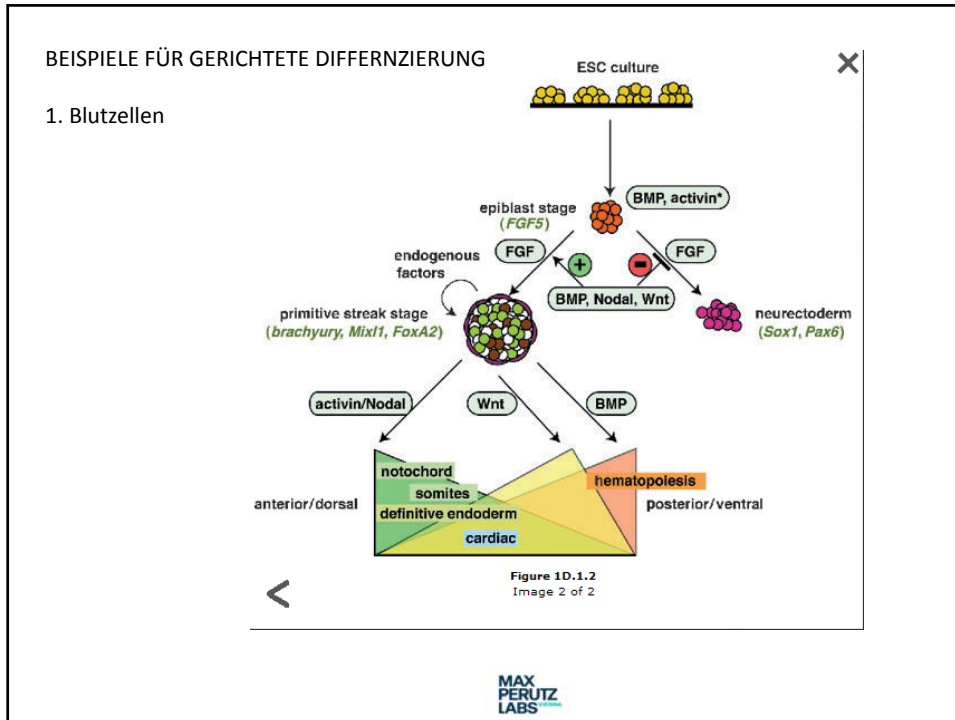
HSCs

MESODERM

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

MAX PERUTZ LABS

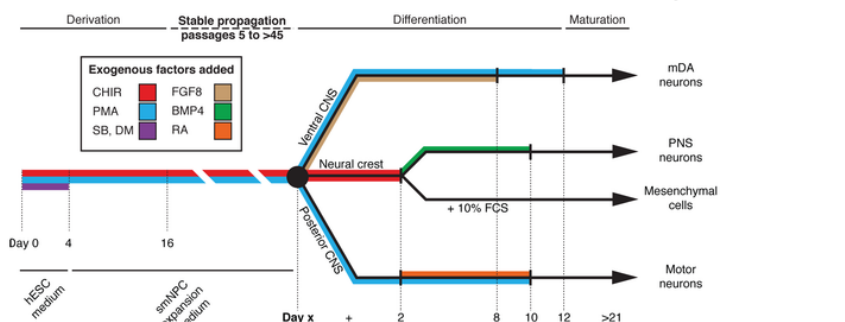




## Gezielte Differenzierung von ESCs in vitro

## 3. Motorneuronen

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>

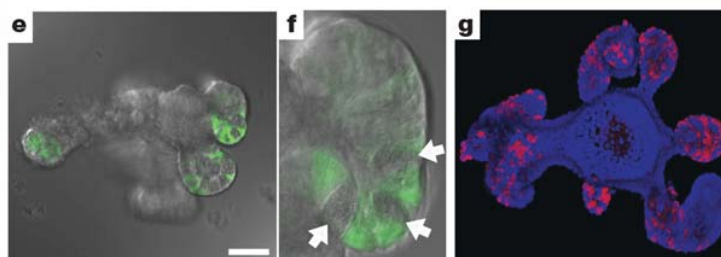
Georg Weitzer

MAX  
PERUTZ  
LABSMEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN

17

1. Mini Darm (Erstes Organoid) - 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>1</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>hi</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 Hans Clevers Lab

Georg Weitzer

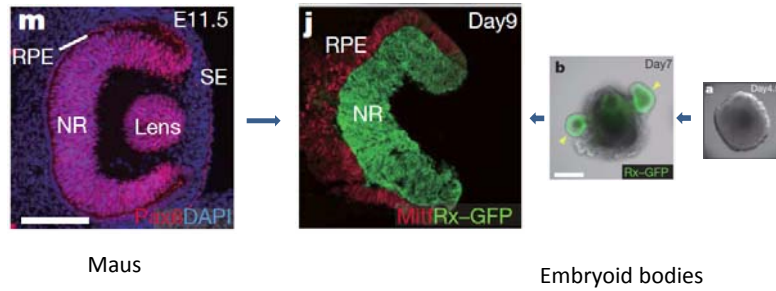
MAX  
PERUTZ  
LABSMEDIZINISCHE  
UNIVERSITÄT  
WIEN

18

## 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

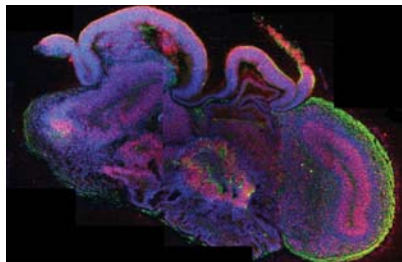
7 APRIL 2011 | VOL 472 | NATURE | 51

Georg Weitzer



19

## 3. Hirn



### 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



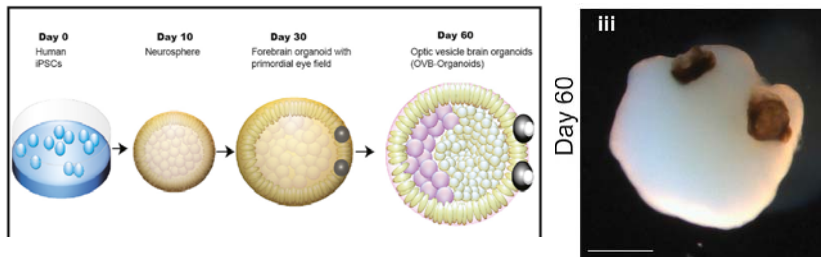
20

## Cell Stem Cell

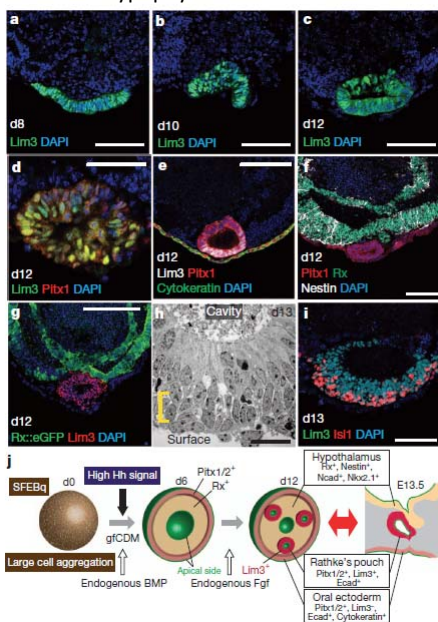
### Human brain organoids assemble functionally integrated bilateral optic vesicles

Elke Gabriel,<sup>1</sup> Walid Albanna,<sup>2,3</sup> Giovanni Pasquini,<sup>4</sup> Anand Ramani,<sup>1</sup> Natasa Josipovic,<sup>5,12</sup> Aruljothi Mariappan,<sup>1</sup> Friedrich Schinzel,<sup>1</sup> Celeste M. Karch,<sup>6</sup> Guobin Bao,<sup>7</sup> Marco Gottardo,<sup>1</sup> Ata Alp Suren,<sup>1</sup> Jürgen Hescheler,<sup>2</sup> Kerstin Nagel-Wolfrum,<sup>8</sup> Veronica Persico,<sup>9</sup> Silvio O. Rizzoli,<sup>7</sup> Janine Altmüller,<sup>10,12</sup> Maria Giovanna Riparbelli,<sup>9</sup> Giuliano Callaini,<sup>9</sup> Olivier Goureau,<sup>11</sup> Argyris Papanotis,<sup>2</sup> Volker Busskamp,<sup>4</sup> Toni Schneider,<sup>2</sup> and Jay Gopalakrishnan<sup>1,13,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Human Genetics, University Hospital, Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf, Germany



#### 4. Adenohypophyse



Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture  
 Hidetaka Suga, Taisuke Kadoshima, Maki Minaguchi, Masatoshi Ohgushi, Mika Soen,  
 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

MAX PERUTZ LABS  
 MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

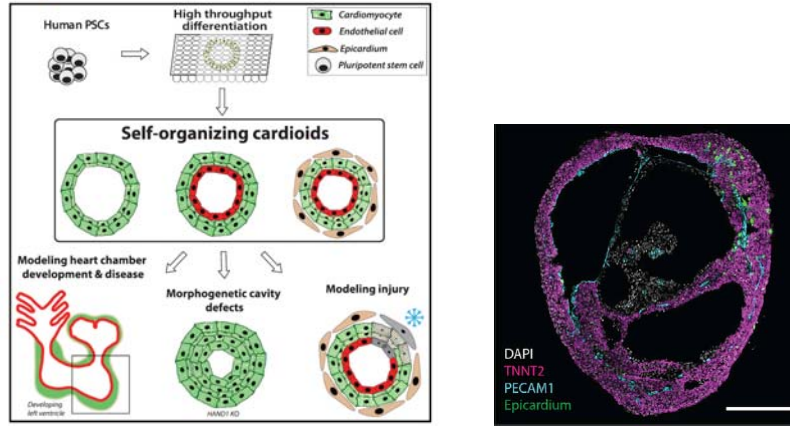


22

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

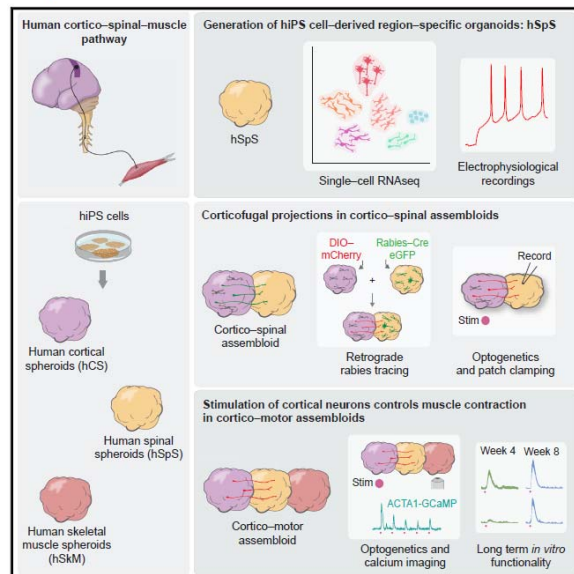
Hofbauer P, Jahnel SM, Papai N, Giesshammer M, Deyett A, Schmidt C, Penc M, Tavernini K, Grdseloff N, Meledeth C, Ginistrelli LC, Clortecka C, Šalic S, Novatchkova M, **Mendjan S**. Cell. 2021 Jun 10;184(12):3299-3317.e22. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.034. Epub 2021 May 20. PMID: 34019794

Graphical abstract



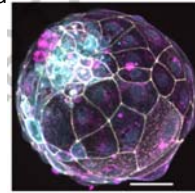
6. Assembloide

Graphical Abstract



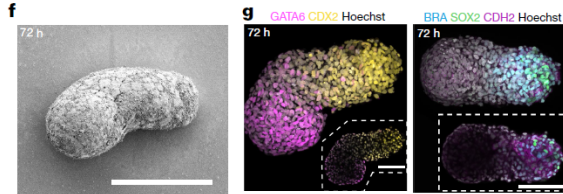
7. Gut zu kennen aber Keine Themen dieser Lehrveranstaltung sind

Blastoide  
 Gastruloide  
 Embryoids. Synthetische Embryonen und EiTiX Embryoids



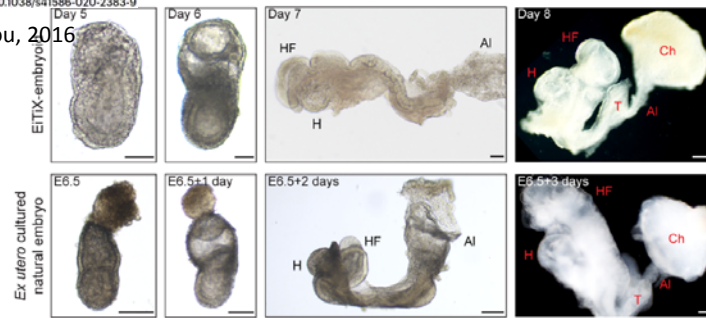
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>

Rivron, 2018



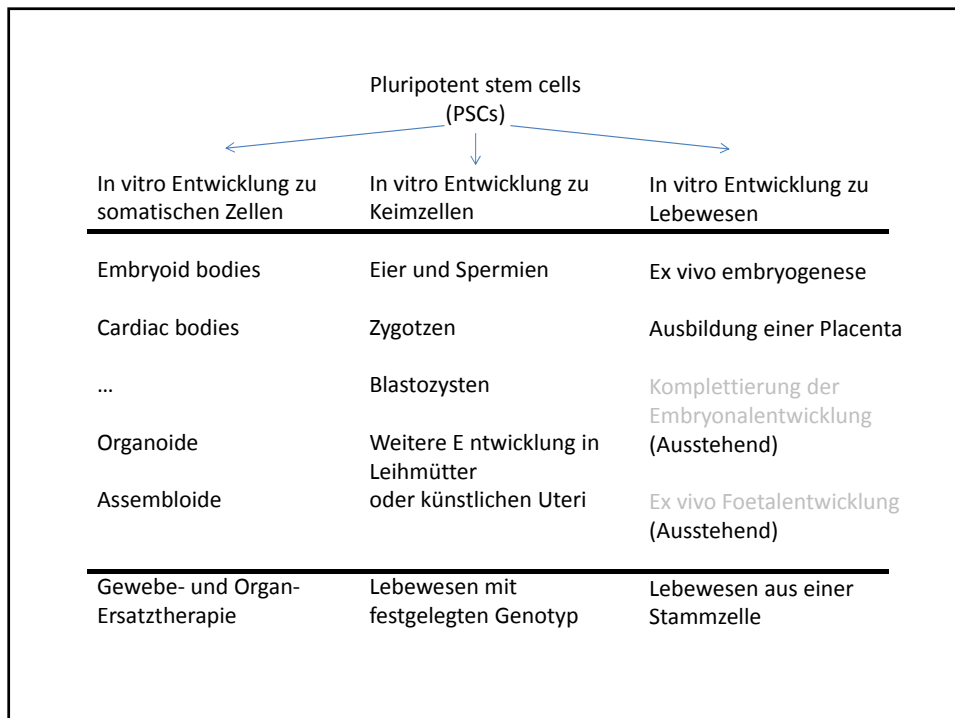
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2383-9>

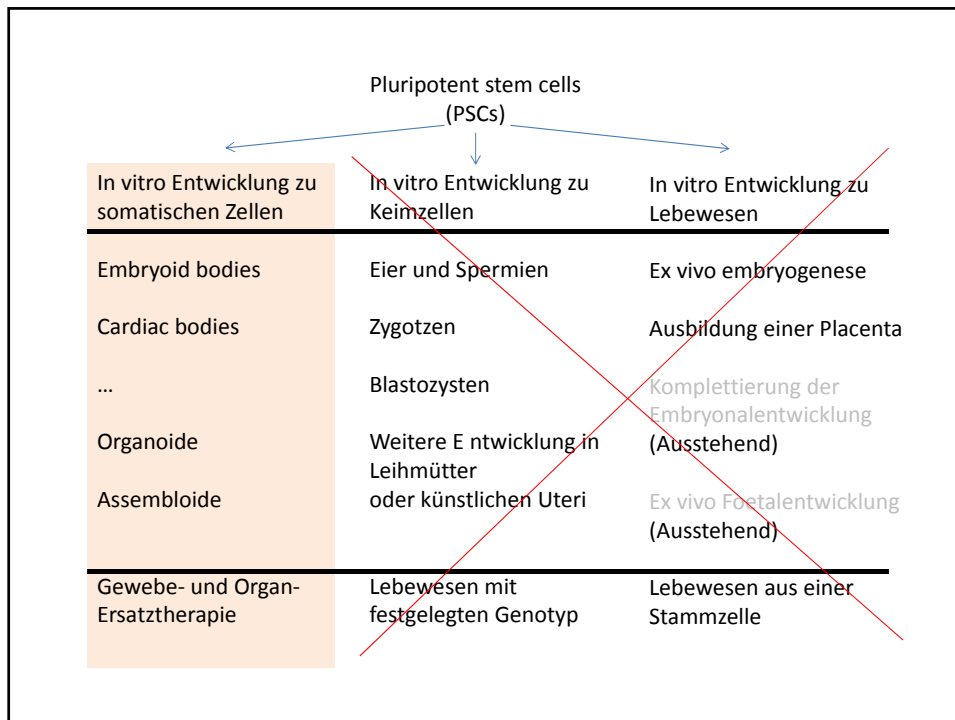
Brivanlou, 2016



Zernicka-Götz und Hanna, August 2022

<https://doi.org/10.1101/2022.08.01.502371>





## 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?

Zelltherapie funktioniert bei:

Knochenmarksstammzellen-Austausch bei Patienten mit Leukämie.

Eigene Knochenmarksstammzellen werden durch hohe tödlichen Dosen an Strahlung vernichtet und durch allogene gesunde Knochenmarksstammzellen ersetzt. Danach ist allerdings lebenslange Immunsuppression notwendig.

Alternative: Eigene Knochenmarksstammzellen genetisch reparieren, expandieren und nach Strahlenbehandlung den Patienten wieder einpflanzen. (geht derzeit nur bei der Maus)

doi:10.1038/nature10821 2012

## Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells

Mason A. Israel<sup>1,2</sup>, Shauna H. Yuan<sup>1,2</sup>, Cedric Bardy<sup>4</sup>, Sol M. Reyna<sup>1,2</sup>, Yangling Mu<sup>4</sup>, Cheryl Herrera<sup>1</sup>, Michael P. Hefferan<sup>5</sup>, Sebastiaan Van Gorp<sup>6</sup>, Kristopher L. Nazer<sup>7</sup>, Francesca S. Boscolo<sup>8</sup>, Christian T. Carson<sup>9</sup>, Louise C. Laurent<sup>9</sup>, Martin Marsala<sup>5,10</sup>, Fred H. Gage<sup>4</sup>, Anne M. Remes<sup>1</sup>, Edward H. Koo<sup>3</sup> & Lawrence S. B. Goldstein<sup>1,2</sup>

Our understanding of Alzheimer's disease pathogenesis is currently limited by difficulties in obtaining live neurons from patients and the inability to model the sporadic form of the disease. It may be possible to overcome these challenges by reprogramming primary cells from patients into induced pluripotent stem cells (iPSCs). Here we reprogrammed primary fibroblasts from two patients with familial Alzheimer's disease, both caused by a duplication of the amyloid  $\beta$  precursor protein gene<sup>1</sup> (APP; termed APP<sup>FD</sup>), two with sporadic Alzheimer's disease (termed sAD1, sAD2) and two non-demented control individuals into iPSC lines. Neurons from differentiated cultures were purified with fluorescence-activated cell sorting and characterized. Purified cultures contained more than 90% neurons, clustered with fetal brain messenger RNA samples by microarray criteria, and could form functional synaptic contacts. Virtually all cells exhibited normal electrophysiological activity. Relative to controls, iPSC-derived, purified neurons from the two APP<sup>FD</sup> patients and patient sAD2 exhibited significantly higher levels of the pathological markers amyloid  $\beta$  (1–40), phospho-tau (Thr 231) and active glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (aGSK-3 $\beta$ ). Neurons from APP<sup>FD</sup> and sAD2 patients also accumulated large RAB5-positive early endosomes compared to controls. Treatment of purified neurons with  $\beta$ -secretase inhibitors, but not  $\gamma$ -secretase inhibitors, caused significant reductions in phospho-Tau (Thr 231) and aGSK-3 $\beta$  levels. These results suggest a direct relationship between APP proteolytic processing, but not amyloid  $\beta$ , in GSK-3 $\beta$  activation and tau phosphorylation in human neurons. Additionally, we observed that neurons with the genome of one sAD patient exhibited the phenotypes seen in familial Alzheimer's disease samples. More generally, we demonstrate that iPSC technology can be used to observe phenotypes relevant to Alzheimer's disease, even though it can take decades for overt disease to manifest in patients.

Herstellung von iPSCs von Alzheimer Patienten und gesunden Menschen.

Herstellung von Neuronen aus den iPSCs, die die gleichen (genetischen) Defekte haben, wie die Patienten und Vergleich mit denen der gesunden Menschen.

Analyse der molekularen Ursachen der Erkrankung nun möglich.

Anwendung der iPSCs

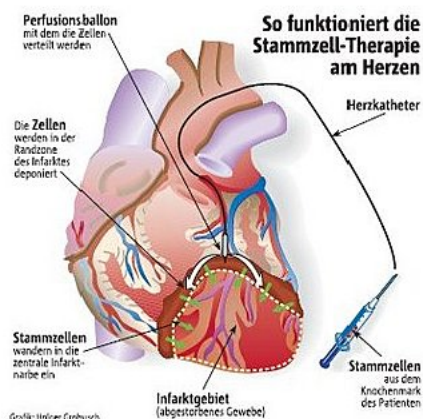
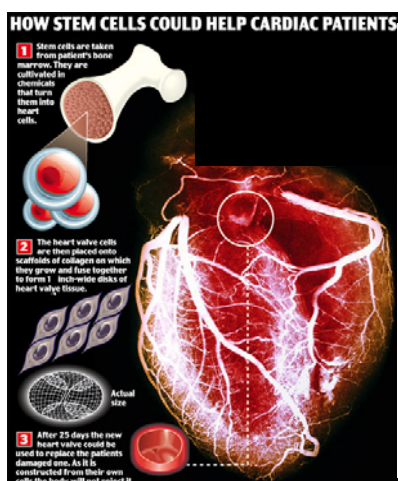


## Warum wird man voraussichtlich mit den bis heute hergestellten geklonten ESCs und iPSCs keine Therapie durchführen können?

- Das epigenetische Gedächtnis der iPSCs kann nicht richtig gelöscht werden.
- Gefahr der Tumorbildung durch virale Vektoren und Proto-Onkogene in den Zellen.
- Derzeitige Unmöglichkeit reine somatische Zellen eines Typs herzustellen.

## Heilung von Krankheiten?

Heilungsversuche von Herzkrankheiten mittels **Knochenmark**-Stammzellen.

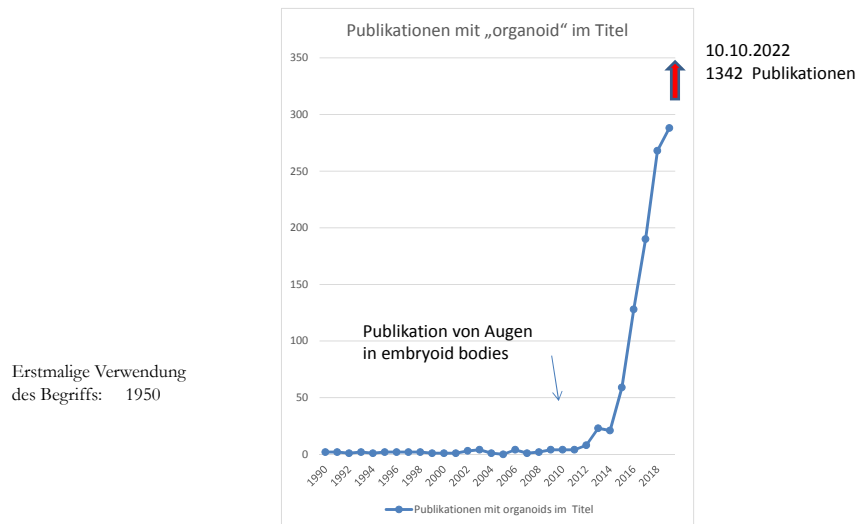


Nach 19 Jahre noch immer kein Erfolg !





### Neue Hoffnung : Organoide



### Thema diese Seminars:

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

Fragen:

Welche Arbeiten über Organoide wurden zwischen 2017 und 2022 publiziert?

Was sind die wesentlichen Fortschritte, die erzielt wurden?

Ist eine medizinische Anwendung von Organoiden als ATMPs vorstellbar?

**Einfacher:**

**Kann man mit Organoiden Menschen therapieren und heilen?**

## 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 Gewebs-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.

## Advanced therapy medical products (ATMPs) Advanced therapy (bio-) medical / -cinal products (ATMPs)

- **Arzneimittel für neuartige Therapien** (auch **ATMPs** für *Advanced Therapy Medicinal Products*) ist der Überbegriff dreier [Arzneimittel](#)-Produktklassen, den [somatischen Zelltherapeutika](#), den [Gentherapeutika](#) und den biotechnologisch bearbeiteten Gewebezubereitungen [auch [Tissue-Engineering-Produkte \(TEP\)](#)].<sup>[1]</sup> Diese Arzneimittel enthalten oder bestehen meistens aus lebenden [Zellen](#) oder [Gewebe](#) und zeichnen sich daher durch eine hohe Komplexität aus. Die verwendeten Zellen werden oft einem Patienten entnommen, im Labor bearbeitet (zum Beispiel vermehrt oder gentechnisch verändert), und anschließend demselben Patienten wieder verabreicht.
- ATMPs sind aufgrund dessen häufig ein Beispiel für „[Personalisierte Medizin](#)“.  
(<https://de.wikipedia.org> am 24.9.2018)

## Was ist ein Advanced therapy (bio-) medical products (ATMPs)?

From Wikipedia, the free encyclopedia and <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview>

- **Advanced Therapy Medicinal Products**, or **ATMPs**, are advanced therapeutic [drugs](#) that are based on [cell therapy](#) or [gene therapy](#) (sometimes in combination with a [medical device](#)).
- **Advanced therapy medicinal products (ATMPs) are medicines for human use that are based on genes, tissues or cells.**
- The criteria to which a drug must conform to be classified as an ATMP, are defined in Article 17 of Regulation (EC) No 1394/2007 by the [European Commission](#).

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

Organoid: 18980 (21.9.2022 Einträge in der Datenbank PUBMED (16432 am 11.10.2021 & 12065 am 11.9.2019. )

*Advanced therapy medicinal products* (ATMPs) 23,817 Einträge (10.10.2022)

Suchbegriff combination: atmp OR "atmps" 391 Einträge (365; 11.10.2021 & 208; 11.9.2019)

- zu wenig, weil zu Komplex - deshalb zB

"medicinal product" 1415 Einträge (10.10.2022) (1240 ; 11.10.2021& 895; 11.9.2019)

"medicinal product" AND organoid 2

organoid AND "medical product" 1

→ Suche nach "organoids" in der Grundlagenforschung notwendig!

organoid[ti] 1342 Einträge (10.10.2022) (1027 ; 11.10.2021 & 537; 12.9.2019)

→ organoid[ti] AND <organ type>