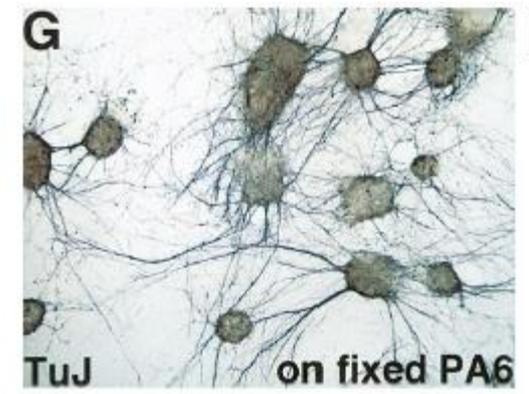
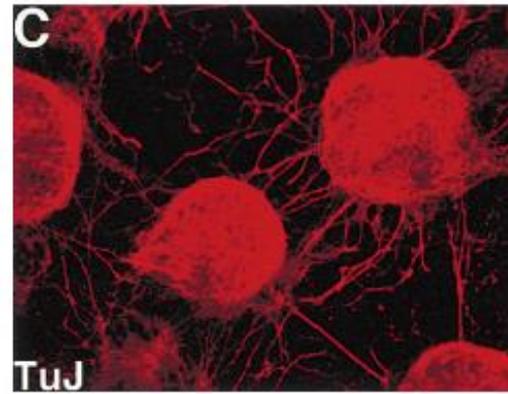
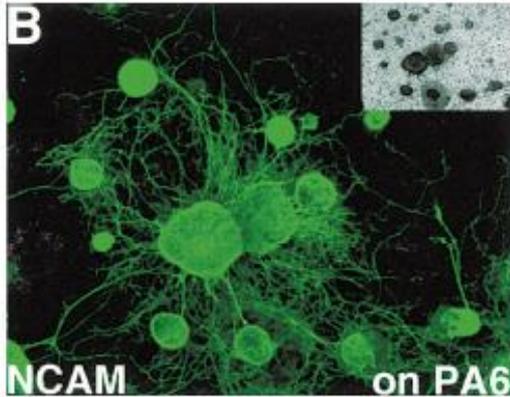




Stammzellen- Stammzellforschung- Stammzellproduktion

Fachbereich 2 Informatik und Ingenieurwissenschaften

Stammzellen



Überblick und Einführung in die Problematik

Embryonale Stammzellen- Gewinnung Stammzellproduktion und deren Kultivierung

Fachbereich 2 Informatik und Ingenieurwissenschaften

Arten von Stammzellen

- embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
- embryonale (fetale) „Keim“-Stammzellen
(EG-Zellen, von „*embryonic germ cells*“)
- adulte Stammzellen (adSC)
z. B. hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark

verschiedene Stammzellen werden nach ihrer Herkunft benannt

- ES-Zellen werden aus frühen Embryonen (Blastozyste) gewonnen
- EG-Zellen werden aus primordialen Keimzellen aus Embryonen/Foeten isoliert „*embryonic germ cells*“
- „Adulte“ Stammzellen werden aus verschiedenen Organen (Knochenmark, Gehirn, Blut, Leber, Retina etc) gewonnen

Arten von Stammzellen

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

...entstehen durch die Rückprogrammierung von Körperzellen.

Sie besitzen die wichtigsten Eigenschaften embryonaler Stammzellen - und sind ethisch unbedenklich.

Pluripotent werden Zellen genannt, die sich zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren, aber keinen gesamten Organismus bilden können.

Induzierte pluripotente Stammzellen

Im Gegensatz zur Zygote, zu embryonalen und zu adulten Stammzellen, die alle natürlichen Ursprungs sind, handelt es sich bei den

induzierten pluripotenten bzw. reprogrammierten Stammzellen um künstlich hergestellte Stammzellen.

adulte somatische, d.h. ausdifferenzierte Körperzellen wie z.B. Hautzellen mit bestimmten Faktoren werden so behandelt, dass sie sich in Zellen verwandeln, die größte Ähnlichkeit mit pluripotenten embryonalen Stammzellen haben.

Gegenwärtig können die reprogrammierten Zellen die embryonalen Stammzellen allerdings **noch nicht ersetzen**, da man über die Prozesse, die bei der Reprogrammierung ablaufen, noch zu wenig weiß und sie noch nicht genügend kontrollieren kann.

Aus diesem Grund ist man weiterhin auf embryonale Stammzellen, die gleichsam als **Goldstandard** gelten, angewiesen.

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

2007 - Durchbruch in der Stammzellforschung?
Körperzellen wurden so umprogrammiert, dass sie
Eigenschaften von embryonalen Stammzellen aufweisen

- vier bestimmte Steuerungsgene wurden in die Zellen aus Haut und Bindegewebe eingeschleust
- aus den dabei entstandenen Stammzellen wurden erfolgreich Nerven- und Muskelzellen gezüchtet
- Methode ethisch unbedenklich, da dabei kein Embryo hergestellt und verbraucht wird
- genauer Vergleich mit embryonalen Stammzellen noch ausstehend
- es handelt sich um erste viel versprechende Forschungsergebnisse

Arten von Stammzellen

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

- somatische Zellen oder adulte Stammzellen werden können durch Manipulation der Expression von
 - Sox-2,
 - OCT-4,
 - c-Myc und
 - Klf4
- In pluripotente Zellen mit embryonalen Stammzelleigenschaften umgewandelt werden: induzierte pluripotente SZ (Tanaka & Yamanaka, Cell 2007)

https://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/stammzellforschung-forscher-reprogrammieren-koerperzellen-ohne-krebs-auszuloesen-a-535481.html?sara_ref=re-so-app-sh

Arten von Stammzellen

- embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
- embryonale (fetale) „Keim“-Stammzellen (EG-Zellen, von *embryonic germ cells*)
- adulte Stammzellen (iPSC)
z. B. hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark

Protein-Induzierte pluripotente Stammzellen (iPIS)

verschiedene Stammzellen werden nach ihrer Herkunft benannt

- ES-Zellen werden aus frühen Embryonen (Blastozyste) gewonnen
- EG-Zellen werden aus primordialen Keimzellen aus Embryonen/Foeten isoliert „*embryonic germ cells*“
- „Adulte“ Stammzellen werden aus verschiedenen Organen (Knochenmark, Gehirn, Blut, Leber, Retina etc) gewonnen

Protein-induzierte pluripotente Stammzellen (piPS)

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins

Hongyan Zhou, Shili Wu, Jin Young Joo, Saiyong Zhu, Dong Wook Han, Tongxiang Lin, Sunia Trauger, Geoffery Bien, Susan Yao, Yong Zhu, Gary Siuzdak, Hans R. Schöler, Lingxun Duan, and Sheng Ding*

*Correspondence: sding@scripps.edu

DOI 10.1016/j.stem.2009.05.014

Arten von Stammzellen

- embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
- embryonale (fetale) „Keim“-Stammzellen (EG-Zellen, von *„embryonic germ cells“*)
- adulte Stammzellen (aSC)
z. B. hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmark

verschiedene Stammzellen werden nach ihrer Herkunft benannt

- ES-Zellen werden aus frühen Embryonen (Blastozyste) gewonnen
- EG-Zellen werden aus primordialen Keimzellen aus Embryonen/Foeten isoliert *„embryonic germ cells“*
- „Adulte“ Stammzellen werden aus verschiedenen Organen (Knochenmark, Gehirn, Blut, Leber, Retina etc) gewonnen

STAP-Zellen - Stammzellen aus dem Säurebad



stimulus-triggered acquisition of pluripotency

- STAP-Zellen sind pluripotente Stammzellen, die mit Hilfe einer milden Zitronensäurelösung aus differenzierten Gewebezellen erzeugt werden
- im Gegensatz zu anderen pluripotenten Zellen können STAP-Zellen auch zum Aufbau der Plazenta beitragen
- STAP-Zellen wurden bislang nur in Mäusen erzeugt

STAP-Zellen - Stammzellen aus dem Säurebad



stimulus-triggered acquisition of pluripotency

Obokata et al., *Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency*, Nature 2014, vol. 505, pp. 641-7

- Embryonale Stammzellen sind ethisch heikel, und
- die "Dolly-Methode" ist mit erheblichem Aufwand verbunden.
- Die iPS-Zellen des Nobelpreisträgers Shinya Yamanaka waren da ein gewaltiger Fortschritt.



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24990753/>

- Haruko Obokata, eine japanische Stammzellforscherin, reichte Zitronensäure, um die begehrten pluripotenten Stammzellen zu erzeugen.
- Andere Forscher haben aber Probleme, die Methode zu reproduzieren.

<https://www.drze.de/de/forschung-publicationen/im-blickpunkt/stammzellen/module/reprogrammierung-von-zellen>

STAP-Zellen - Stammzellen aus dem Säurebad



stimulus-triggered acquisition of pluripotency

Zellen einer neugeborenen Maus wurden für kurze Zeit in einem milden **Bad aus Zitronensäure** geschwenkt, gewaschen und schließlich in Petrischalen ausgesät.

25 % der Zellen überlebten die Prozedur,

und 30 % davon verwandelten sich innerhalb von wenigen Tagen in pluripotente Stammzellen¹.



Spektakuläre Zahlen, wenn man sie mit iPS-Zellen vergleicht:

Die Konversionsrate beträgt hier meist nur 1 %, und der Prozess kann Wochen oder Monate dauern - und dass nach jahrelanger Verfeinerung der Methode.

<https://www.tagesspiegel.de/wissen/obokata-manipulierte-und-plagiierte-3554209.html>

https://www.wissenschau.de/stammzellen/stap_pluripotente_stammzellen.php

Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency

Haruko Obokata^{1,2,3}, Teruhiko Wakayama³†, Yoshiki Sasai⁴, Koji Kojima¹, Martin P. Vacanti^{1,5}, Hitoshi Niwa⁶, Masayuki Yamato⁷ & Charles A. Vacanti¹

Here we report a unique cellular reprogramming phenomenon, called stimulus-triggered acquisition of pluripotency (STAP), which requires neither nuclear transfer nor the introduction of transcription factors. In STAP, strong external stimuli such as a transient low-pH stressor reprogrammed mammalian somatic cells, resulting in the generation of pluripotent cells. Through real-time imaging of STAP cells derived from purified lymphocytes, as well as gene rearrangement analysis, we found that committed somatic cells give rise to STAP cells by reprogramming rather than selection. STAP cells showed a substantial decrease in DNA methylation in the regulatory regions of pluripotency marker genes. Blastocyst injection showed that STAP cells efficiently contribute to chimaeric embryos and to offspring via germline transmission. We also demonstrate the derivation of robustly expandable pluripotent cell lines from STAP cells. Thus, our findings indicate that epigenetic fate determination of mammalian cells can be markedly converted in a context-dependent manner by strong environmental cues.

In the canalization view of Waddington's epigenetic landscape, fates of somatic cells are progressively determined as cellular differentiation proceeds, like going downhill. It is generally believed that reversal of differentiated status requires artificial physical or genetic manipulation of nuclear function such as nuclear transfer^{1,2} or the introduction of multiple transcription factors³. Here we investigated the question of whether somatic cells can undergo nuclear reprogramming simply in response to external triggers without direct nuclear manipulation. This type of situation is known to occur in plants—drastic environmental changes can convert mature somatic cells (for example, dissociated carrot cells) into immature blastema cells, from which a whole plant structure, including stalks and roots, develops in the presence of auxins⁴. A challenging question is whether animal somatic cells have a similar potential that emerges under special conditions. Over the past decade, the presence of pluripotent cells (or closely relevant cell types) in adult tissues has been a matter of debate, for which conflicting conclusions have been reported by various groups^{5–11}. However, no study so far has proven that such pluripotent cells can arise from differentiated somatic cells.

Haematopoietic cells positive for CD45 (leukocyte common antigen) are typical lineage-committed somatic cells that never express pluripotency-related markers such as Oct4 unless they are reprogrammed^{12,13}. We therefore addressed the question of whether splenic CD45⁺ cells could acquire pluripotency by drastic changes in their external environment such as those caused by simple chemical perturbations.

Low pH triggers fate conversion in somatic cells

CD45⁺ cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) from the lymphocyte fraction of postnatal spleens (1-week old) of C57BL/6 mice carrying an *Oct4-gfp* transgene¹⁴, and were exposed to various types of strong, transient, physical and chemical stimuli (described below). We examined these cells for activation of the *Oct4* promoter after culture for several days in suspension using DMEM/F12 medium supplemented with leukaemia inhibitory factor (LIF) and B27

(hereafter called LIF+B27 medium). Among the various perturbations, we were particularly interested in low-pH perturbations for two reasons. First, as shown below, low-pH treatment turned out to be most effective for the induction of *Oct4*. Second, classical experimental embryology has shown that a transient low-pH treatment under 'sublethal' conditions can alter the differentiation status of tissues. Spontaneous neural conversion from salamander animal caps by soaking the tissues in citrate-based acidic medium below pH 6.0 has been demonstrated previously^{15–17}.

Without exposure to the stimuli, none of the cells sorted with CD45 expressed *Oct4-GFP* regardless of the culture period in LIF+B27 medium. In contrast, a 30-min treatment with low-pH medium (25-min incubation followed by 5-min centrifugation; Fig. 1a; the most effective range was pH 5.4–5.8; Extended Data Fig. 1a) caused the emergence of substantial numbers of spherical clusters that expressed *Oct4-GFP* in day-7 culture (Fig. 1b). Substantial numbers of GFP⁺ cells appeared in all cases performed with neonatal splenic cells ($n = 30$ experiments). The emergence of *Oct4-GFP*⁺ cells at the expense of CD45⁺ cells was also observed by flow cytometry (Fig. 1c, top, and Extended Data Fig. 1b, c). We next fractionated CD45⁺ cells into populations positive and negative for CD90 (T cells), CD19 (B cells) and CD34 (haematopoietic progenitors¹⁸), and subjected them to low-pH treatment. Cells of these fractions, including T and B cells, generated *Oct4-GFP*⁺ cells at an efficacy comparable to unfractionated CD45⁺ cells (25–50% of surviving cells on day 7), except for CD34⁺ haematopoietic progenitors¹⁸, which rarely produced *Oct4-GFP*⁺ cells (<2%; Extended Data Fig. 1d).

Among maintenance media for pluripotent cells²⁰, the appearance of *Oct4-GFP*⁺ cells was most efficient in LIF+B27 medium, and did not occur in mouse epiblast-derived stem-cell (EpiSC) medium^{21,22} (Extended Data Fig. 1e). The presence or absence of LIF during days 0–2 did not substantially affect the frequency of *Oct4-GFP*⁺ cell generation on day 7 (Extended Data Fig. 1f), whereas the addition of LIF during days 4–7 was not sufficient, indicating that LIF dependency started during days 2–4.

¹Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. ²Laboratory for Cellular Reprogramming, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan. ³Laboratory for Genomic Reprogramming, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan. ⁴Laboratory for Organogenesis and Neurogenesis, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan. ⁵Department of Pathology, Irwin Army Community Hospital, Fort Riley, Kansas 66442, USA. ⁶Laboratory for Pluripotent Stem Cell Studies, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan. ⁷Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Tokyo 162-8666, Japan. †Present address: Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi, Yamanashi 400-8510, Japan.

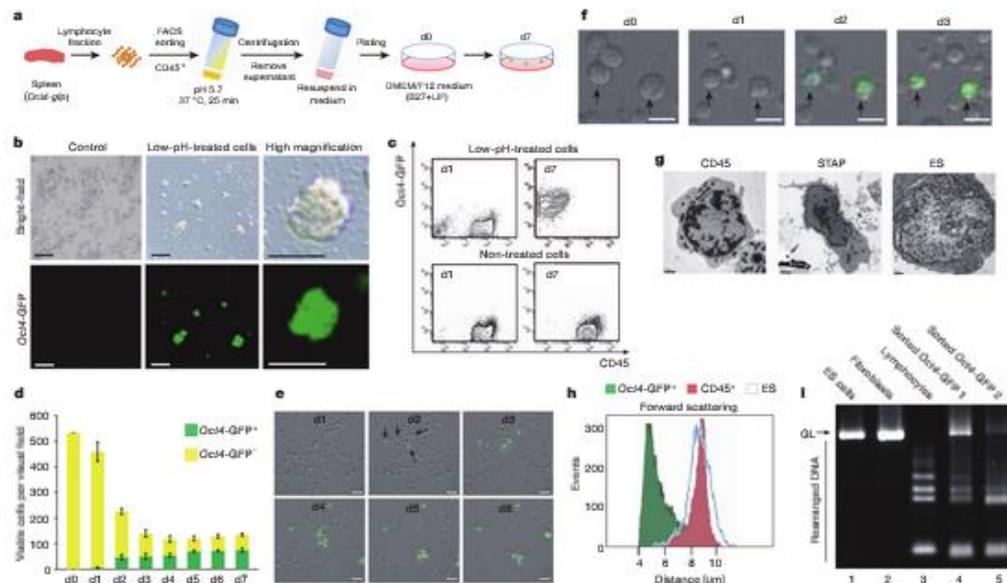


Figure 1 | Stimulus-triggered conversion of lymphocytes into Oct4-GFP⁺ cells. **a**, Schematic of low-pH treatment. **b**, Oct4-GFP⁺ cell clusters appeared in culture of low-pH-treated CD45⁺ cells (middle; high magnification, right) on day 7 (d7) but not in culture of control CD45⁺ cells (left). Top: bright-field view; bottom, GFP signals. Scale bar, 100 μ m. **c**, FACS analysis. The x axis shows CD45 epifluorescence level; y axis shows Oct4-GFP level. Non-treated, cultured in the same medium but not treated with low-pH. **d**, GFP⁺ (green) and GFP⁻ (yellow) cell populations (average cell numbers per visual field; ×10 objective lens). $n = 25$; error bars show average \pm s.d. **e**, Snapshots of live imaging of culture of low-pH-treated CD45⁺ cells (*Oct4-gfp*). Arrows indicate cells that started expressing Oct4-GFP. Scale bar, 50 μ m. **f**, Cell size reduction in

low-pH-treated CD45⁺ cells on day 1 before turning on Oct4-GFP without cell division on day 2. In this live imaging, cells were plated at a half density for easier viewing of individual cells. Scale bar, 10 μ m. **g**, Electron microscope analysis. Scale bar, 1 μ m. **h**, Forward scattering analysis of Oct4-GFP⁺ CD45⁺ cells (red) and Oct4-GFP⁻ CD45⁺ cells (green) on day 7. Blue line, ES cells. **i**, Genomic PCR analysis of [D] recombination at the *Tcrb* gene. GL is the size of the non-rearranged germline type, whereas the smaller ladders correspond to the alternative rearrangements of] exons. Negative controls, lanes 1, 2; positive controls, lane 3; FACS-sorted Oct4-GFP⁺ cells (two independent preparations on day 7), lanes 4, 5.

Most of the surviving cells on day 1 were still CD45⁺ and Oct4-GFP⁻. On day 3, the total cell numbers were reduced to between one-third to one-half of the day 0 population (Fig. 1d; see Extended Data Fig. 1g, h for apoptosis analysis), and a substantial number of total surviving cells became Oct4-GFP⁺ (Fig. 1d), albeit with relatively weak signal intensity. On day 7, a significant number of Oct4-GFP⁺ CD45⁺ cells (one-half to two-thirds of total surviving cells) constituted a distinct population from the Oct4-GFP⁻ CD45⁺ cells (Fig. 1c, top, day 7, and Fig. 1d). No obvious generation of Oct4-GFP⁺ CD45⁻ populations was seen in non-treated CD45⁺ cells cultured similarly but without low-pH treatment (Fig. 1c, bottom).

Low-pH-treated CD45⁺ cells, but not untreated cells, gradually turned on GFP signals over the first few days (Fig. 1e, Supplementary Videos 1 and 2 and Extended Data Fig. 2a), whereas CD45 immunoreactivity became gradually reduced in the cells that demonstrated Oct4-GFP expression (Fig. 1f and Extended Data Fig. 2b). By day 5, the Oct4-GFP⁺ cells attached together and formed clusters by accretion. These GFP⁺ clusters (but not GFP⁻ cells) were quite mobile and often showed cell processes on moving (Supplementary Video 1).

The Oct4-GFP⁺ cells demonstrated a characteristic small cell size with little cytoplasm and also showed a distinct fine structure of the nucleus compared with that of parental CD45⁺ lymphocytes (Fig. 1g). The Oct4-GFP⁺ cells on day 7 were smaller than non-treated CD45⁺ cells (Fig. 1g, h and Extended Data Fig. 2c) and embryonic stem (ES) cells (Fig. 1h), both of which are generally considered to be small in

size. The diameter of low-pH-treated CD45⁺ cells became reduced during the first 2 days, even before they started Oct4-GFP expression (Fig. 1f), whereas the onset of GFP expression was not accompanied by cell divisions. Consistent with this, no substantial 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) uptake was observed in the Oct4-GFP⁺ cells after the stressor (Extended Data Fig. 2d).

The lack of substantial proliferation argues against the possibility that CD45⁺ cells, contaminating as a very minor population in the FACS-sorted CD45⁺ cells, quickly grew and formed a substantial Oct4-GFP⁺ population over the first few days after the low-pH treatment. In addition, genomic rearrangements of *Tcrb* (T-cell receptor gene) were observed in Oct4-GFP⁺ cells derived from FACS-purified CD45⁺ cells and CD90⁺ CD45⁺ T cells (Fig. 1i, lanes 4, 5, and Extended Data Fig. 2e–g), indicating at least some contribution from lineage-committed T cells. Thus, Oct4-GFP⁺ cells were generated *de novo* from low-pH-treated CD45⁺ haematopoietic cells by reprogramming, rather than by simple selection of stress-enduring cells²³.

Low-pH-induced Oct4⁺ cells have pluripotency

On day 7, the Oct4-GFP⁺ spheres expressed pluripotency-related marker proteins²² (Oct4, SSEA1, Nanog and E-cadherin; Fig. 2a) and marker genes (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Ecat1* (also called *Khd3*), *Esg1* (*Dppa5a*), *Dax1* (*Nr0b1*) and *Rex1* (*Zfp42*); Fig. 2b and Extended Data Fig. 3a) in a manner comparable to those seen in ES cells²⁴. Moderate levels of expression of these pluripotency marker genes were observed on day 3

Stammzellen Begriffe & Eigenschaften

„Self-renewal“

Stammzellnische

Plastizität

Stammzelle

Stammzellen teilen sich auf zwei Arten:

- Bei der **symmetrischen Teilung** entstehen zwei Stammzellen, die mit der Mutterzelle identisch sind.
- Bei der **asymmetrischen Teilung** entsteht nur eine Stammzelle – die zweite Zelle ist bereits auf dem Weg zur Gewebezelle.

Die symmetrische Teilung macht Stammzellen quasi unsterblich: Sie erzeugt immer wieder neue Stammzellen, in fast unbegrenzter Zahl.

Die asymmetrische Teilung ermöglicht den Aufbau und die Reparatur von Organen, indem sie neue Gewebezellen oder Stammzellen mit verminderten Fähigkeiten produziert.

Stammzelle

- undifferenzierte Zellen, welche in lebenden Organismen die Fähigkeit besitzen,
 - sich einerseits selbst zu erneuern, und sich andererseits in
 - unterschiedliche differenzierte Zelltypen zu entwickeln.

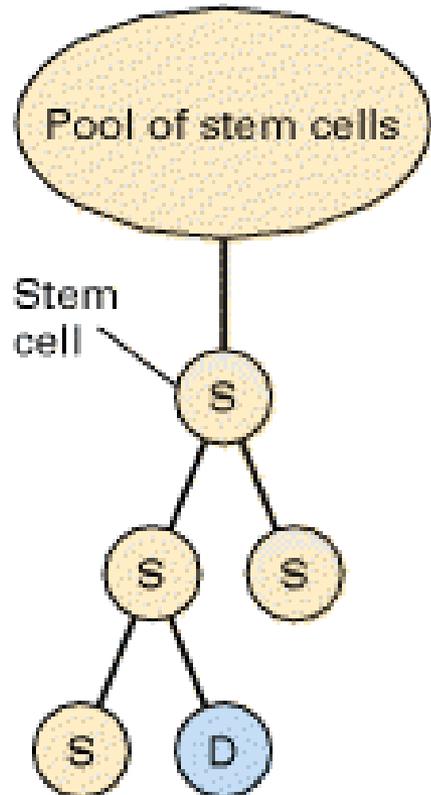
- Selbsterneuerung und Differenzierung wird durch
 - asymmetrische Zellteilungen gewährleistet
 - Dabei entstehen zwei Tochterzellen,
 - von denen eine Stammzellcharakteristika behält,
 - während die andere Tochterzelle in verschiedene Gewebetypen ausdifferenzieren kann (Blau et al., 2001; Ho und Wagner, 2007).

Durch die Kontinuität dieses Prozesses sind Stammzellen in der Lage, ganze Gewebe zu regenerieren.

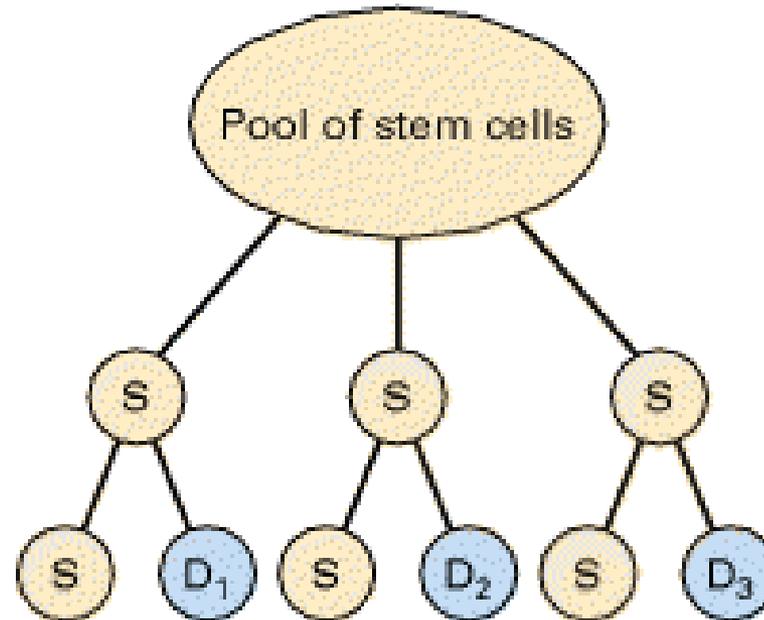
Unipotent stem cells
produce a **single type**
of **differentiated cell**

whereas pluripotent
stem cells may
produce **two or more**
types of differentiated
cells

Unipotent stem cells



Pluripotent stem cells



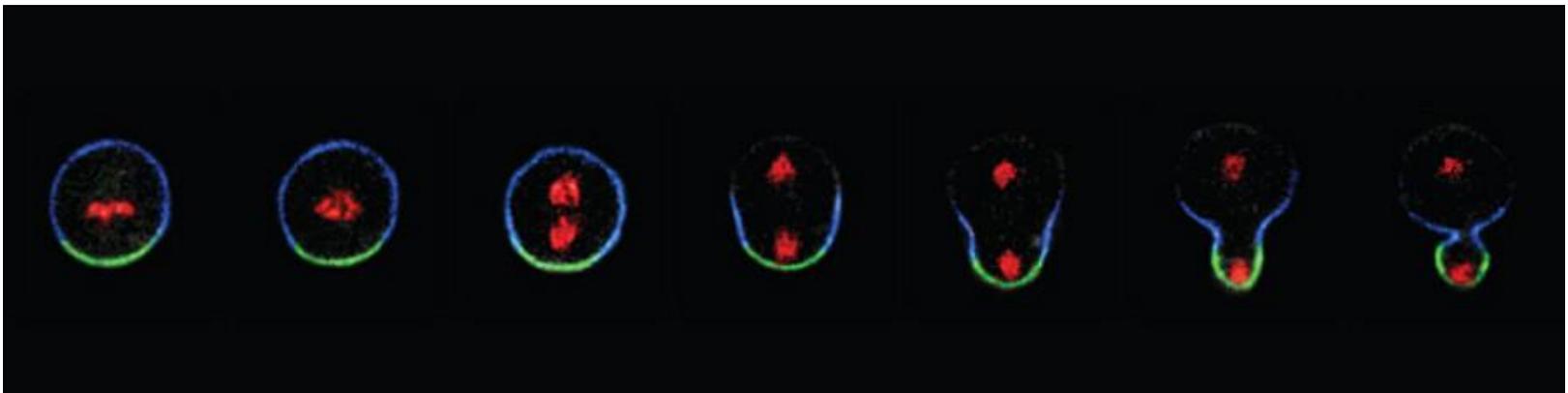
The production of differentiated cells (D) from stem cells (S).
(Quelle: Lodish online).

asymmetrische Zellteilung

BIOZENTRUM

Universität Basel
The Center for Molecular Life Sciences

- ❖ die mitotische Teilung von Stammzellen, aus der sowohl klonale Replikate der Mutterstammzelle als auch differenzierte Tochterzellen hervorgehen.
- ❖ dient dem Erhalt undifferenzierter Stammzellen
- ❖ bei gleichzeitiger Bildung differenzierender Vorläuferzellen (Progenitor-Zellen, PG cells).



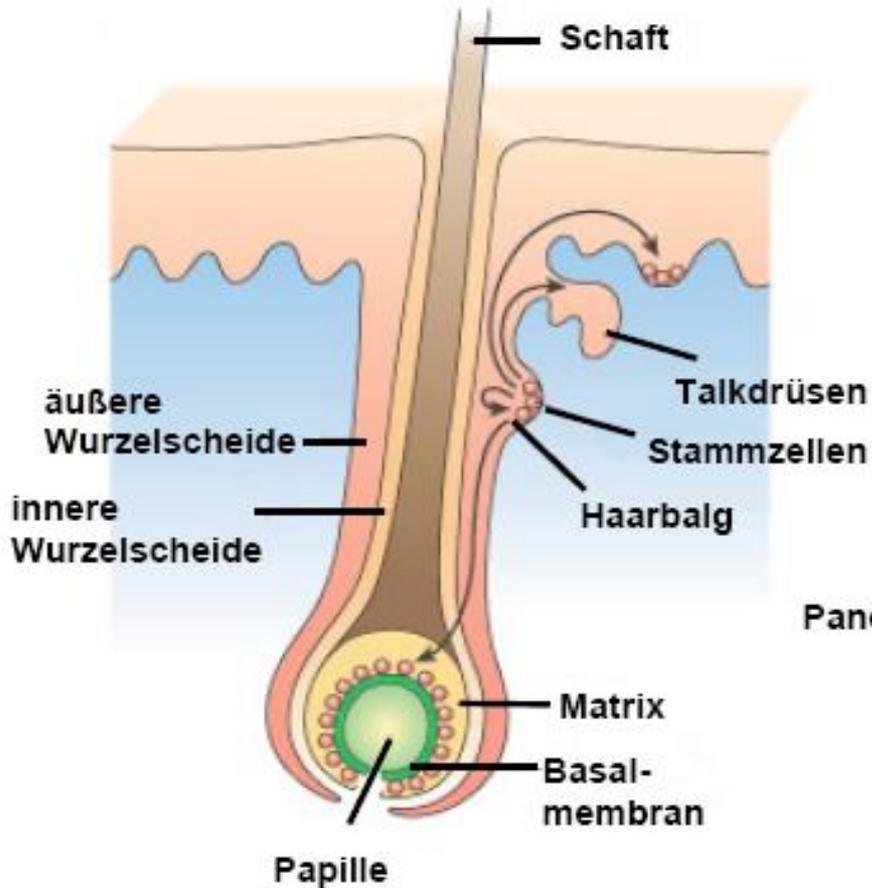
asymmetrische Zellteilung

- ❖ gilt als Teilungsprinzip der Embryogenese, kommt jedoch auch bei adulten Stammzellen im regenerativen Gewebe vor.
- ❖ Beispiele adulter Stammzellen mit asymmetrischer Zellteilung sind:
 - ❖ Basalzellen verschiedener Epithelien (z.B. Haut, Darmepithel)
 - ❖ Satellitenzellen der Muskulatur
 - ❖ Neuroblasten des Nervengewebes
 - ❖ hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks
 - ❖ Spermatogonien

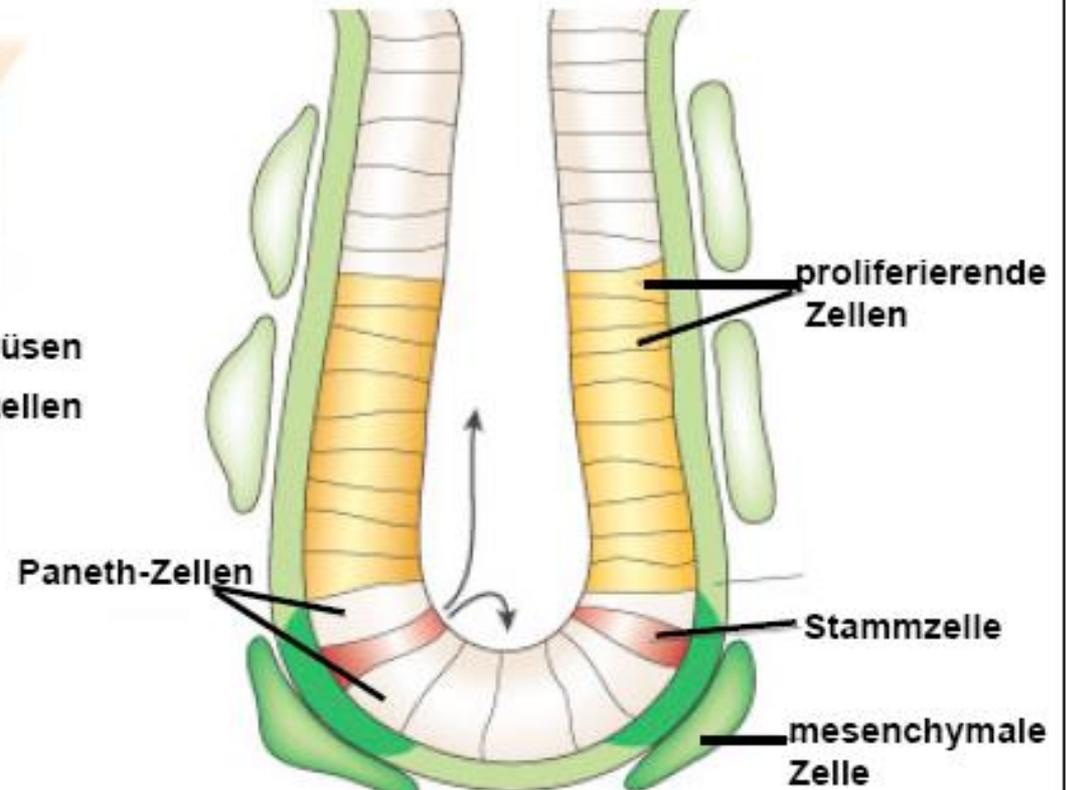
Adulte Stammzellen

Epidermale Stammzellen

Haarfollikel



Darm-Krypte



Darmstammzellen haben ein System gefunden, das ohne asymmetrische Teilung auskommt und trotzdem die Stammzellpopulation stabil hält

Quelle: MolMed-Erlangen

asymmetrische Zellteilung

Verschiedene Protein-Konzentration schon vor der Teilung

- bei der Teilung von Neuroblasten (Vorläufer von Nervenzellen) bei Drosophila-Fliegen werden
 - Proteine wie **Par-6**, Bazooka und aPKC auf der einen Seite konzentriert,
 - die Proteine Miranda, Prospero, Pon und Numb hingegen auf der anderen Seite.
 - Dadurch tritt der Effekt ein, dass sich beispielsweise **Numb** nur in einer der beiden entstehenden Zellen konzentriert

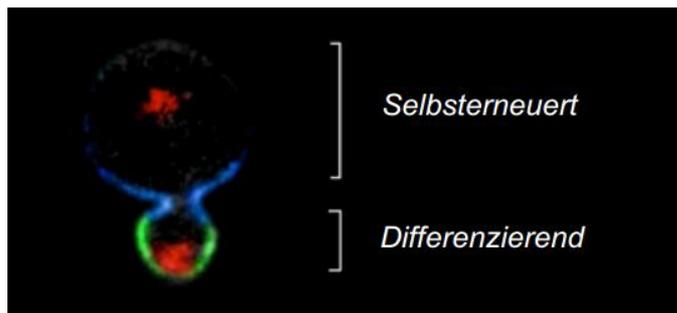
Molekulare Pathologie (IMP) in Wien

asymmetrische Zellteilung

Verschiedene Protein-Konzentration schon vor der Teilung



- ein Komplex aus Par-Proteinen spielen die entscheidende Rolle.
 - Diese phosphorylieren das so genannte Lgl-Protein (Bestandteil des Cytoskeletts)
 - Inaktivierung des Proteins des Lgl-Proteins
 - Numb kann nicht auf die andere Seite der Zelle gelangen
 - kein vesikulärer Transport von Numb mehr möglich



wahrscheinliche Mechanismus:
Das Numb-Protein wird offenbar in kleinen Bläschen (Vesikel) durch die Zelle transportiert. Wird Lgl inaktiviert, funktioniert das nicht.

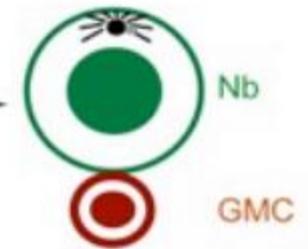
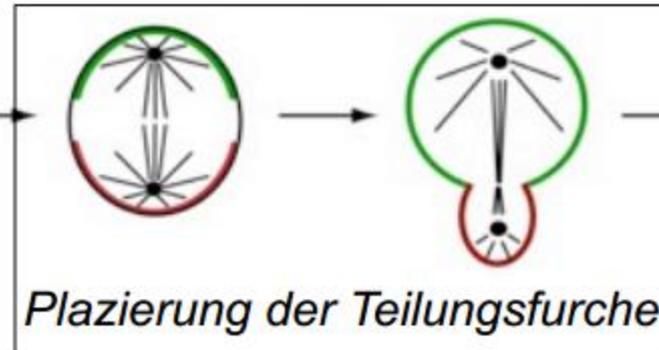
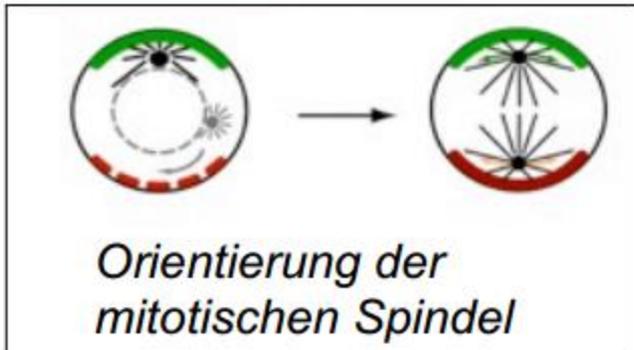
Prophase - Prometaphase

Metaphase

Anaphase

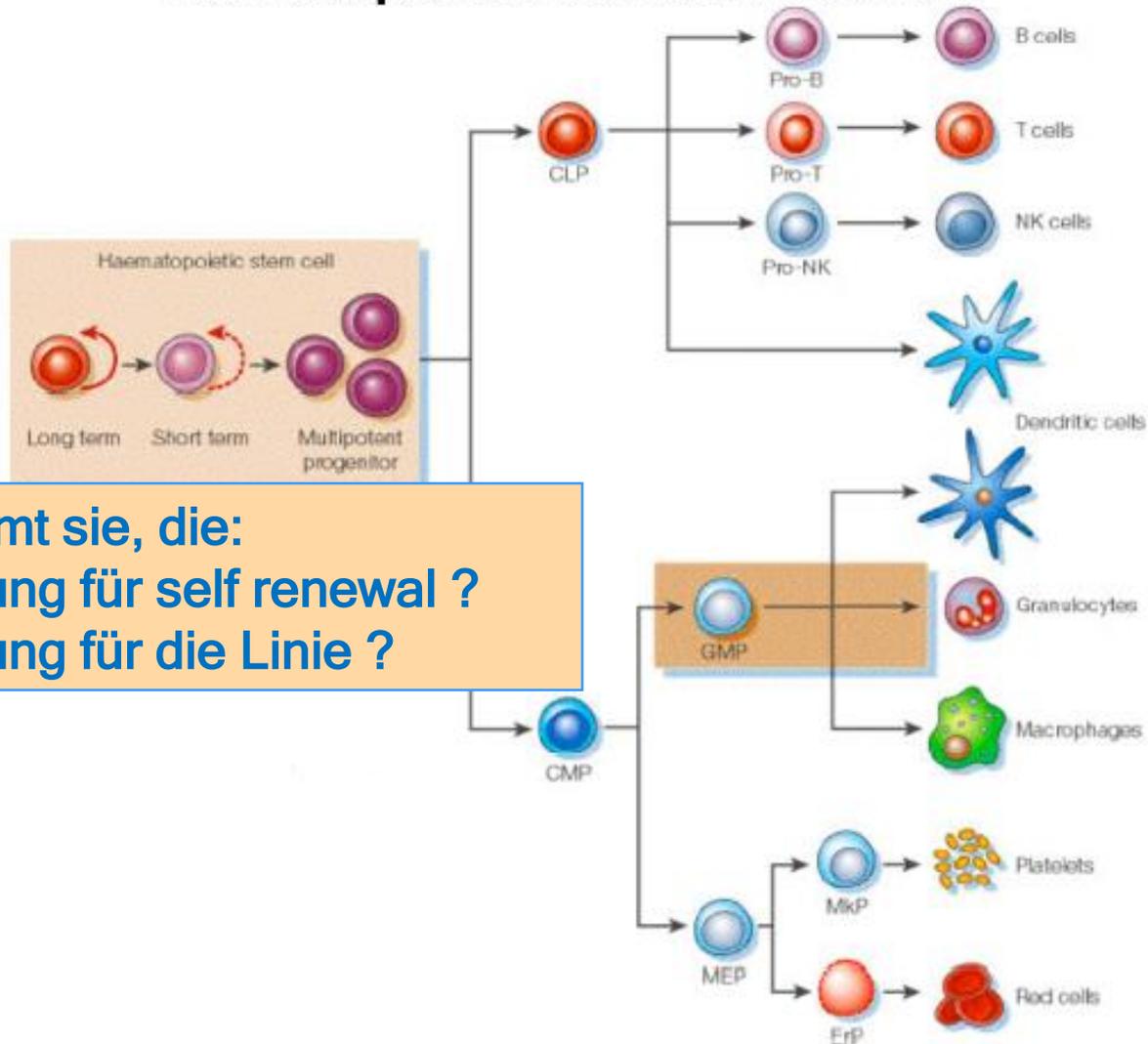
Telophase

Interphase



Adulte Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen

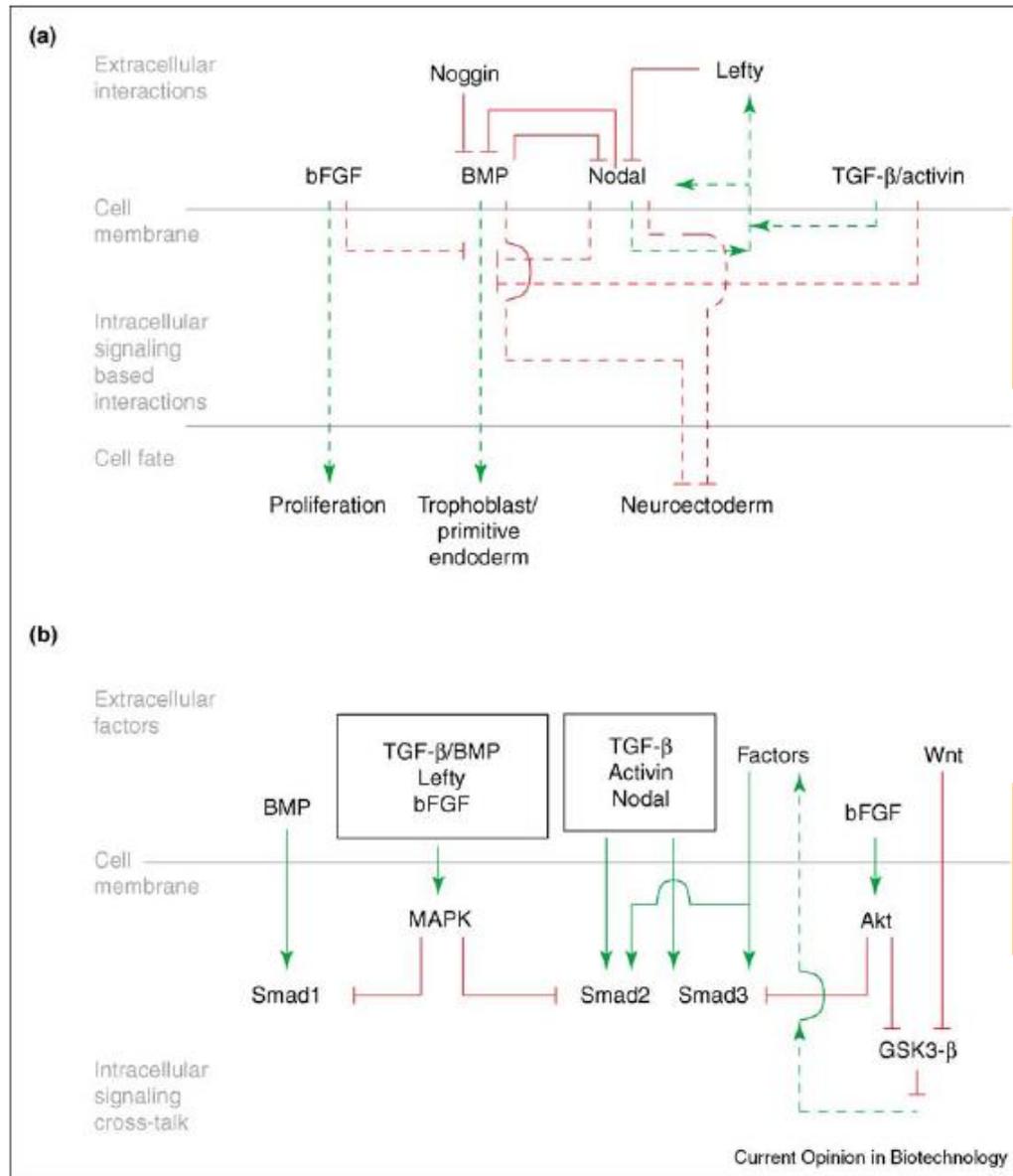


Was bestimmt sie, die:

- Entscheidung für self renewal ?
- Entscheidung für die Linie ?

Bild: Quelle Internet

self renewal



extrazelluläre
Faktoren

intrazelluläre
Faktoren

Molecular interactions regulating hESC self-renewal. **(a)** Extracellular factors regulating hESC self-renewal and their interactions. Red lines indicate negative regulation; green arrows show positive regulation. Solid lines denote extracellular interactions; dashed lines indicate intracellular interactions or indirect effects. **(b)** Cross-talk between intracellular signaling pathways regulating hESC self-renewal. Red lines indicate negative regulation; green arrows show positive regulation. Solid lines denote direct interactions; dashed lines indicate indirect effects.

Identifikation von Stammzellen in einem Gemisch verschiedener Zelltypen, wie es in jedem Gewebe vorkommt

Auswahl an »Schicksalsfaktoren« von Stammzellen, die die Selbsterneuerung anregen

Faktor (Abkürzung)	Funktion
Transkriptionsfaktoren	
Oct4 /Klf4, Myc	POU domain transcription factor
Sox2	SRY-related HMG-box protein-2
Nanog	homeodomain transcription factor
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
ID	inhibitor of differentiation
Wachstumsfaktoren	
TGF- β	transforming growth factor β
FGF4	fibroblast growth factor 4
BMP4	bone morphogenetic protein 4
Andere	
LIF	leukaemia inhibitory factor (Zytokin)
Notch	Transmembran-Oberflächenrezeptor
Wnt	Signalmolekül für den Frizzled Rezeptor

„maintenance“ and „lineage decision“

Table 3

Effect of different factors on the regulation of human embryonic stem cell self-renewal.

Factor	Effects	Ref.
BMP	BMP promotes differentiation to trophoblast	[23*]
	BMP promotes differentiation to primitive endoderm	[24*]
	Noggin promotes self-renewal by antagonizing BMP	[7,10**]
	Presence of noggin leads to the upregulation of neuronal markers <i>Therefore, BMP prevents differentiation to neuroectoderm</i>	[24*] (See update)
Nodal	Nodal prevents differentiation to neuroectoderm	[28]
	Activation of Smad2/3 by nodal leads to expression of nodal and the nodal antagonists lefty-A and lefty-B	[27**]
	Nodal binds to and inhibits BMP	[29]
Activin A	Activin A can maintain hESC undifferentiated state in the presence of FGF	[11]
	Inhibition of BMP signaling is necessary to maintain hESC undifferentiated state <i>Therefore, activin A inhibits the effect of BMP signaling</i>	[9**,10**]
TGF- β	TGF- β can maintain undifferentiated hESC state in the presence of FGF	[6,11]
	Inhibition of BMP signaling is necessary to maintain hESC cell undifferentiated state <i>Therefore, TGF-β inhibits the effect of BMP signalling</i>	[9**,10**]
bFGF	High concentrations of bFGF can replace noggin to maintain the undifferentiated hESC state <i>Therefore, BMP signaling is antagonized by bFGF</i>	[9**]

Statements in italics are inferences deduced from the references cited.

- die symmetrische Teilung der Stammzellen bringt immer neue Stammzellen hervor
- die asymmetrische Teilung erzeugt eine Stammzelle und eine Gewebezelle
- alle Zellen des Körpers entstehen aus Stammzellen
- embryonale Stammzellen können alle, adulte nur noch bestimmte Gewebe hervorbringen
- Stammzellen haben in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche Eigenschaften
- Auf Blutstammzellen geht die Vorstellung zurück, dass die asymmetrische Teilung ein wesentliches Merkmal der Stammzellen ist. Das Verhalten vieler Stammzellen lässt sich jedoch mit der asymmetrischen Teilung nicht erklären!!

Stammzellen

Begriffe & Eigenschaften

Self-renewal

Stammzellnische

Plastizität

- Die große Mehrheit der adulten Stammzellen befindet sich
 - **geschützt in speziellen Mikroumgebungen**
 - Die umgebenden Zellen sezernieren und organisieren eine **Vielfalt von extrazellulärer Matrix und anderen Faktoren, welche zum Stammzellerhalt beitragen**

Mikroumgebung wird
als Stammzellnische
bezeichnet

- erstmals von Schofield im Jahre 1978 postuliert
 - Innerhalb einer Stammzellnische wird durch verschiedene
 - zellintrinsische und
 - zellextrinsische Mechanismen
 - das Gleichgewicht zwischen
 - Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen gesteuert.
- Dient dem Schutz vor
 - differenzierenden und apoptoseinduzierenden Stimuli,
 - Verhinderung einer übermäßige Stammzellproliferation, welche zur Krebsentstehung beitragen kann, verhindert (Moore und Lemischka, 2006).

Komponenten der Stammzellnische

- Dreidimensionale Struktur mit ihren physiologischen Gegebenheiten
- Verhältnis von SZ zu Nachbarzellen
- vorhandene Proteine :
 - Oberflächenproteine
 - Matrixproteine
 - sezernierte, lösliche Faktoren

Scadden, D.;
Nature Insight, 2006

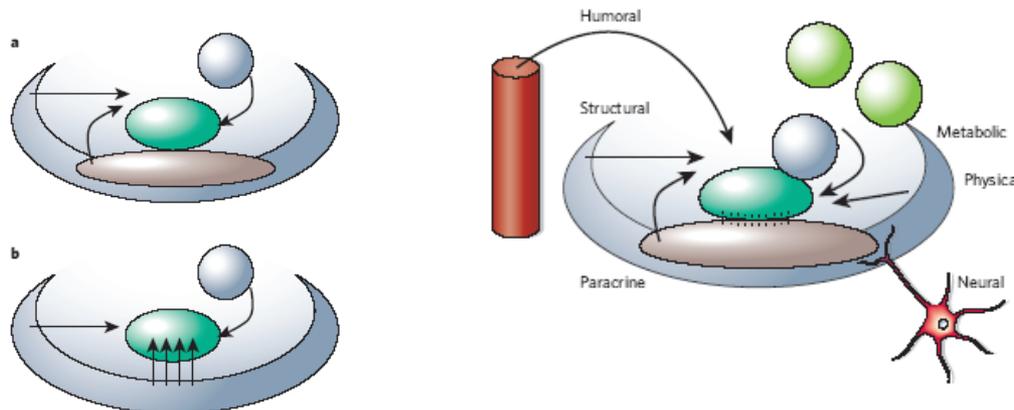


Figure 3 | Inputs feeding back on stem-cell function in the niche. Elements of the local environment that participate in regulating the system of a stem cell in its tissue state are depicted. These include the constraints of the architectural space, physical engagement of the cell membrane with tethering molecules on neighbouring cells or surfaces, signalling interactions at the interface of stem cells and niche or descendent cells, paracrine and endocrine signals from local or distant sources, neural input and metabolic products of tissue activity.

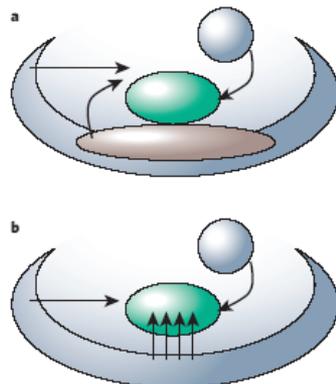


Figure 1 | Refining elements necessary for an adult stem-cell niche. a, Early studies provided evidence that heterogeneous cell types created a three-dimensional structure in which stem cells reside. b, Recent data raises the possibility that a regulatory microenvironment might include stem cells simply resident on the basement membrane with homologous cell-cell interactions. Stem cells are shown in deep green and more mature offspring are represented by a lighter shade.

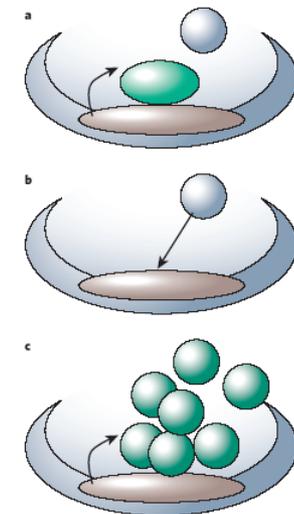
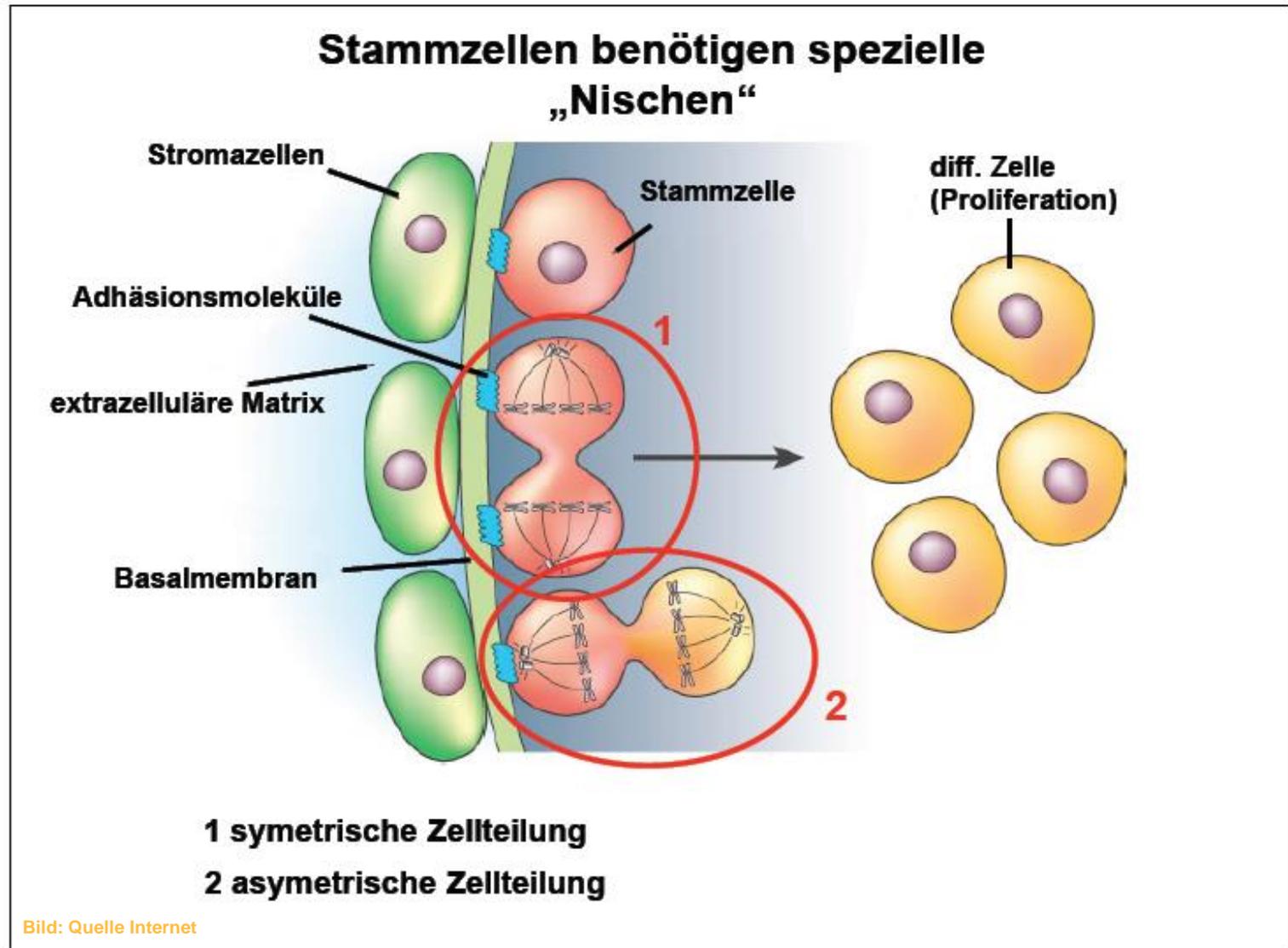


Figure 4 | Potential niche contribution to dysplastic cell growth. a, Normal interactions and occupancy of the niche tightly controls stem-cell number. b, Vacancy in the niche might result in ectopic occupancy by another cell type. c, Niche signals might impose proliferative or de-differentiative signals, contributing to a disordered state of tissue organization and control.

Symmetrische/asymmetrische Teilung - Nische



Zusammenfassung

SC durchlaufen symmetrische oder asymmetrische Zellteilungen:

symmetrische Zellteilung → Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften

asymmetrische Zellteilung → Tochterzellen

- a. mit Stammzeleigenschaften,
- b. mit größerer Ausdifferenzierung

Über das Schicksal der Zellen entscheidet das biologische Milieu (SZ-Nische)

Stammzellen Begriffe & Eigenschaften

„Self-renewal“

Stammzellnische

Plastizität

Stammzellplastizität

Die Fähigkeit, sich - unabhängig von der eigenen Herkunft - zu ganz unterschiedlichen Gewbezelltypen entwickeln zu können

Tabelle 1			
Totipotenz, Pluripotenz und Multipotenz von Stammzellen			
	Zelle	Vorkommen	Eigenschaft
Totipotenz	Embryonen (Zygote)	Zygote (Blastomere) bis 8-Zell-Stadium	Differenzierung in jede Körperzelle möglich (Bildung eines kompletten, selbstständig lebensfähigen Organismus)
Pluripotenz	Embryonale Stammzelle (ES) Embryonale Keimzellen (EG) Embryonale Karzinomzellen (EC)	Blastozyste embryonale Gonaden Teratokarzinom	Differenzierung in zahlreiche Zelltypen (Fähigkeit, jedes Gewebe inklusive der Keimbahn zu bilden, aber keine komplette Organismuserstehung möglich)
Multipotenz	Gewebespezifische Stammzelle	Hämatopoetische SZ Muskel-SZ Leber-SZ Neuronale SZ	Fähigkeit, eine begrenzte Zahl anderer Gewebe zu bilden (Transdifferenzierung in jeweils andere Gewebetypen?)

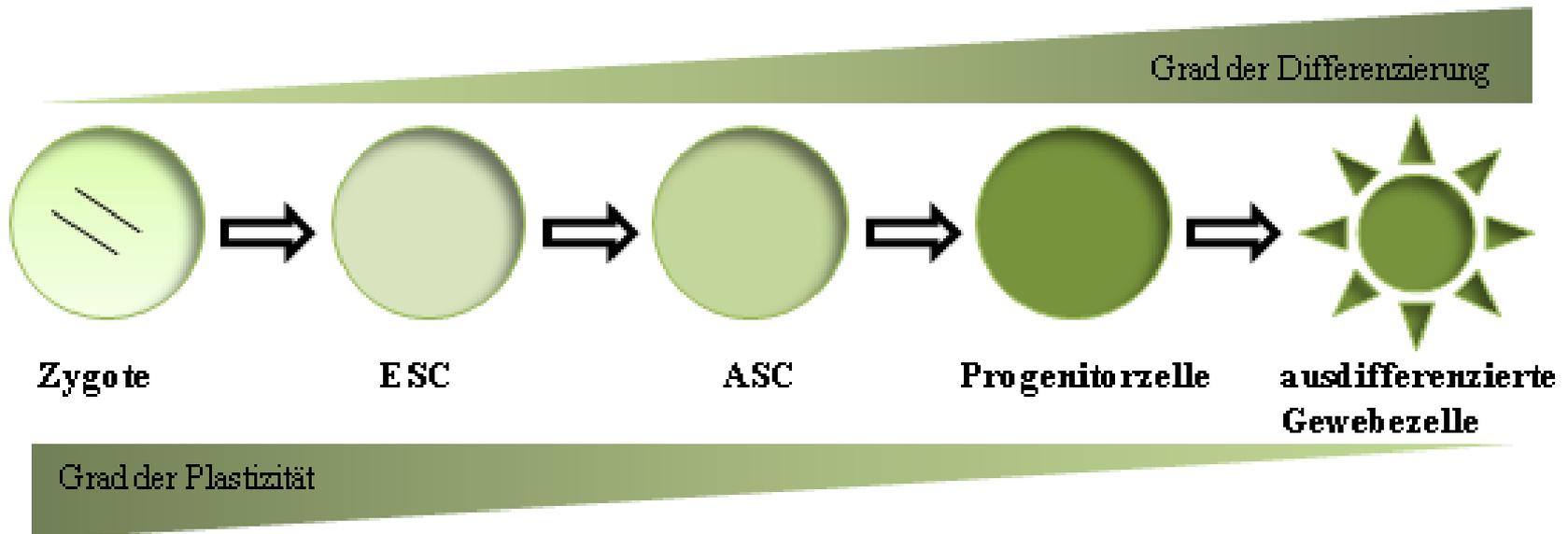
SZ, Stammzelle

Tabelle 3

Übersicht humaner pluripotenter Stammzellen (modifiziert nach 11)

	Embryonale Stammzellen	Embryonale primordiale Keimzellen	Embryonale Karzinomzellen
Herkunft	Blastozyste (Herstellung aus „innerer Zellmasse“ disaggregierter Blastozysten)	Primordiale Keimzellen (embryonale Gonaden)	Teratokarzinom (testikuläre Tumoren)
Karyotyp	euploid	euploid	heteroploid
Telomerase-Expression	+	+	+
In-Vitro-Differenzierung	+	+	+
Chimäre Formationen	Soma und Keimbahn	Soma und Keimbahn	Soma
MHC-Klasse-1-Expression	gering	gering	zunehmend
Teratogenität	vorhanden	vorhanden	vorhanden
Ethische Bedenken	Embryonenverbrauch	Feten nach Abort	Karzinomzellen

Stammzellplastizität



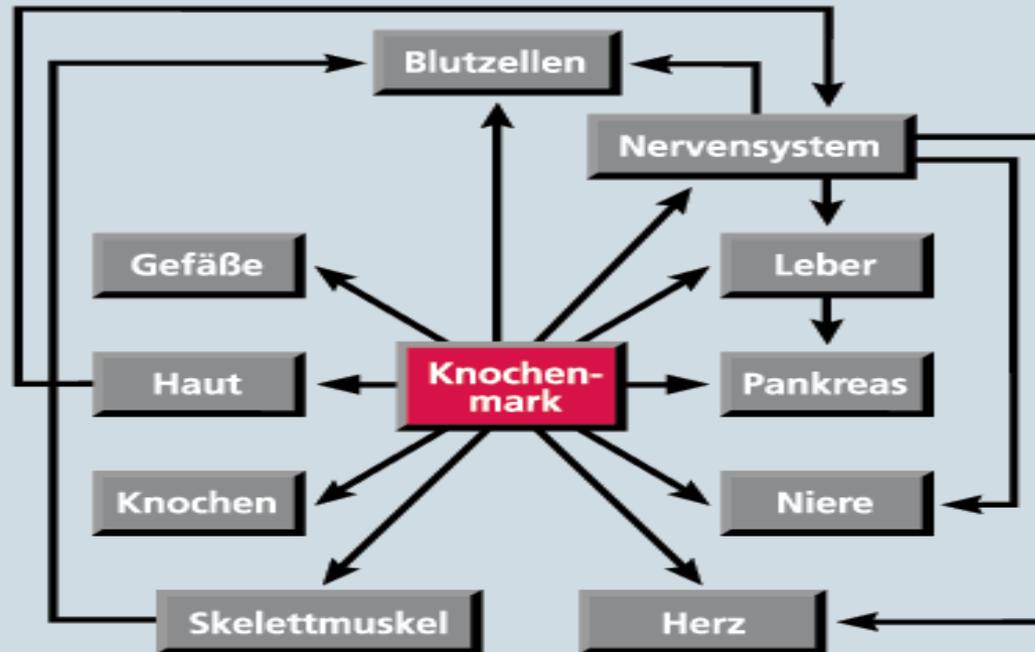
Abnahme der Stammzellplastizität

Dargestellt ist die absteigende Plastizität / Differenzierbarkeit von der diploiden Zygote über embryonale (ESC) und adulte Stammzellen (ASC) zu Progenitorzellen sowie gewebeständigen, ausdifferenzierten Zellen. Nach neuesten Erkenntnissen ist dieser Prozess umkehrbar

Stammzellplastizität

→ Die Fähigkeit, sich - unabhängig von der eigenen Herkunft - zu ganz unterschiedlichen Gewebetypen entwickeln zu können

Grafik 1



Nach traditionellem Verständnis können adulte Stammzellen nicht in andere Gewebetypen ausreifen. Überraschend waren Ergebnisse seit 1998, die zeigten, dass aus Knochenmarkstammzellen auch andere Zellen zu Blutzellen differenzieren können. Darüber hinaus wurde im Tiermodell gezeigt, dass aus Neuronen oder Muskelzellen Blutzellen und aus Hautzellen Nervenzellen entstehen und sich nach der Transplantation beim Menschen aus hämatopoetischen Zellen Hepatozyten, Hautzellen und epitheliale Zellen des Gastrointestinaltraktes entwickeln können.

Textkasten 1

Offene Fragen bei der Verwendung adulter Stammzellen

- Auftreten von Stammzellplastizität adulter Zellen ist selten (Funktionsanalysen sind daher wertvoll)
- Stammzellplastizität ist möglicherweise nicht für alle Organe und Differenzierungsrichtungen haltbar (Genmarkierungsstudien sind hier wichtig)
- Bei Verwendung größerer Zellmengen ist nicht bewiesen, dass eine Ursprungszelle mehrere Gewebetypen ersetzen kann
- Optimierte Expansionsmöglichkeiten liegen nicht für alle adulten Stammzellen vor
- Bei Kultur adulter Stammzellen können „Kulturartefakte“ entstehen

Forderungen zur Definition „plastischer“ Stammzellen

- Die Ausgangszellpopulation muss eindeutig identifiziert sein, da bereits wenige „kontaminierende Zellen“ zu veränderten Ergebnissen führen können. Weiter sollten adulte Stammzellen ohne vorherige Zellkultur verwendet werden, um Veränderungen durch die Kultur zu verhindern.
- Die transdifferenzierte Zellpopulation muss eine stabile und quantitativ relevante Zellpopulation im fremden Gewebe darstellen und nicht nur als zufälliges, seltenes Phänomen auftreten.
- Die transdifferenzierte, stabile Zellpopulation muss zu nachgewiesener Funktionalität des neuen Gewebetyps beitragen; also beispielsweise nicht nur Markerproteine des spezifischen Gewebes, wie beispielsweise des Pankreas exprimieren, sondern tatsächlich auch Insulin produzieren.

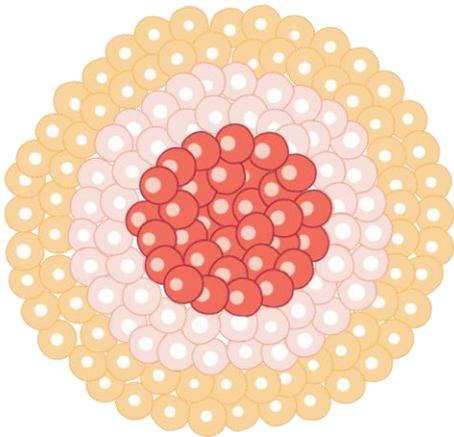
(modifiziert nach 2)

Regenerative Medizin Personalisierte Medizin

<https://www.the3rs.uni-tuebingen.de/in-vitro-modelle-und-tierversuchsalternativen/>

Sphäroide und Organoide

Sphäroide

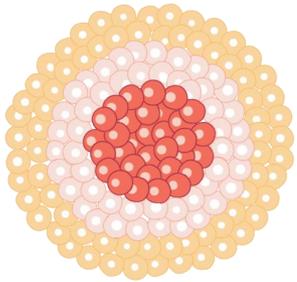


sind einfache 3D-Zellaggregate, die entstehen, wenn Zellen während der Kultur im Labor räumlich stark begrenzt werden und in Folge dessen aneinanderhaften.

Über einen längeren Zeitraum betrachtet lässt sich beobachten, dass die Zellen im Sphäroid miteinander interagieren, sich mit ihrer eigenen gewebespezifischen extrazellulären Matrix umgeben und fortan auch mit den darin enthaltenen Biomolekülen wechselwirken.

Diese natürliche Mikroumgebung liefert den Zellen u. a. wichtige Signalmoleküle, Wachstumsfaktoren und biologische Reize, die für die Selbstorganisation der Zellen wichtig sind.

Sphäroide und Organoide



Durch die kugelförmige Anordnung bildet sich im Zellaggregat ein metabolischer Gradient aus, bei dem die Konzentration an Nährstoffen, Sauerstoff, aber auch diversen Stoffwechselprodukten der Zellen variiert.

In der äußersten Schicht teilen sich die Zellen und werden über das sie umgebende Nährmedium gut versorgt.

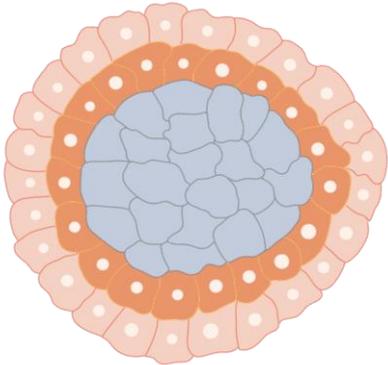
Die Zellen der inneren Schicht befinden sich aufgrund der veränderten Konzentrationen in einem ruhenden Zustand, während die Zellen im Kern des Sphäroids über die Zeit absterben und so einen nekrotischen Kern bilden.

Sphäroide verhalten sich durch die 3D-Anordnung mehr wie ein natürliches Gewebe, als Zellen in einer herkömmlichen Zellkulturschale es tun.

Durch die sich ausbildenden Schichten sowie die Konzentrationsgradienten darin ähneln die Zellaggregate soliden Tumoren und werden deshalb häufig in der Krebs- und Wirkstoffforschung als *In-vitro*-Modell verwendet.

Sphäroide und Organoide

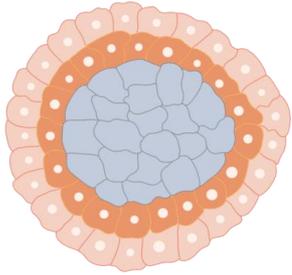
Organoide



entstehen, wenn Zellen sich im dreidimensionalen Raum selbst organisieren und dabei im Gegensatz zu einfachen Sphäroiden komplexe, organähnliche Strukturen ausbilden.

Die Gewebestrukturen eignen sich für viele wissenschaftliche Untersuchungen deutlich besser als zweidimensionale Zellkulturen oder auch Sphäroidkulturen, da sie aufgrund ihrer Beschaffenheit, Zusammensetzung und Funktionalität dem natürlichen Organ im Körper ähneln.

Durch die Verwendung menschlicher (Stamm)Zellen sind sie Tierversuchen hinsichtlich ihrer Aussagekraft oft weit überlegen und stellen dadurch einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung von Medikamenten, der Entwicklung von Krankheitsmodellen und für die Krebsforschung dar.



Sphäroide und Organoide

Organoide

Organoide können aus pluripotenten Stammzellen oder Organvorläuferzellen generiert werden, die dafür i. d. R. in ihre jeweilige gewebespezifische extrazelluläre Matrix eingebettet werden, die den Zellen u. a. wichtige Signalmoleküle, Wachstumsfaktoren und biologische Reize liefert, die für die Selbstorganisation der Zellen in die dreidimensionalen organähnlichen Gewebestrukturen wichtig sind.

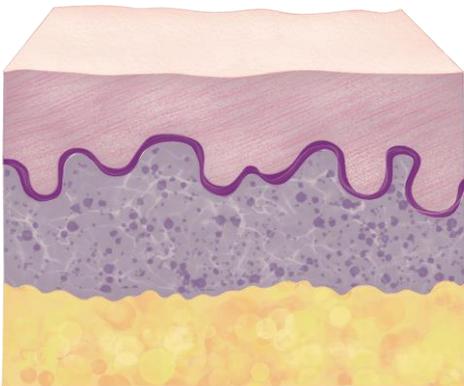
Gewebemodelle

Um bspw. den Einfluss neuer Substanzen im Verbraucherschutz, die Auswirkungen von UV-Strahlung oder den Einfluss neuer Wirkstoffe in der präklinischen biomedizinischen Forschung auf bestimmte Organe oder Gewebe untersuchen zu können, werden im Labor verschiedenste 3D-Gewebemodelle entwickelt.

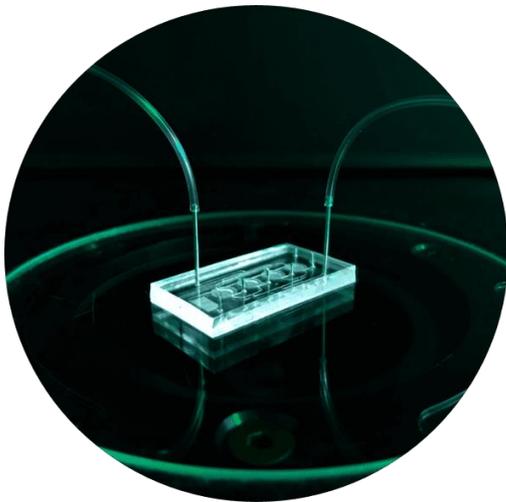
Durch die Verwendung menschlicher Zellen sind sie ethisch weit weniger kritisch als Tierversuche und darüber hinaus aufgrund der besseren Übertragbarkeit oft aussagekräftiger.

Der Aufbau dieser humanen Gewebemodelle spiegelt sowohl in Bezug auf die Architektur als auch auf die zum Aufbau verwendeten gewebespezifischen Zellen und Biomoleküle wider und ermöglicht es darüber hinaus, auch die jeweiligen Funktionalitäten der einzelnen Schichten nachzustellen.

Neben den oben genannten Anwendungen können die *In-vitro*-Modelle auch dafür verwendet werden, die molekularen Vorgänge während einer Infektion zu untersuchen oder spezielle krankhafte Veränderungen der Gewebe zu verstehen.



Organ-on-Chip-Systeme und Multi-Organ-Chips

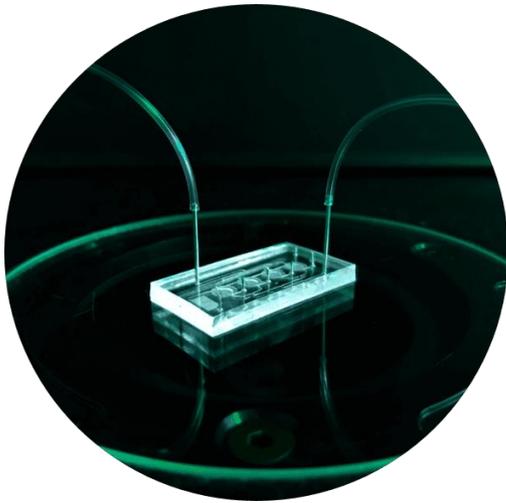


werden kleine dreidimensionale Polymer-Chips verstanden, die von winzigen Kanälen und Kammern im Mikrometermaßstab durchzogen werden und in denen gewebespezifische Zellen, Sphäroide oder Organoide unter mikrophysiologischen Bedingungen kultiviert werden können.

Das bedeutet, die Zellen werden wie im natürlichen menschlichen Gewebe in eine spezifische extrazelluläre Matrix eingebettet und so in die kleinen Kammern der Chips integriert.

Mithilfe spezieller Membranen werden die Blutgefäße im Chip nachgebaut, in denen das Nährmedium als Blutersatz fließen kann.

Organ-on-Chip-Systeme und Multi-Organ-Chips

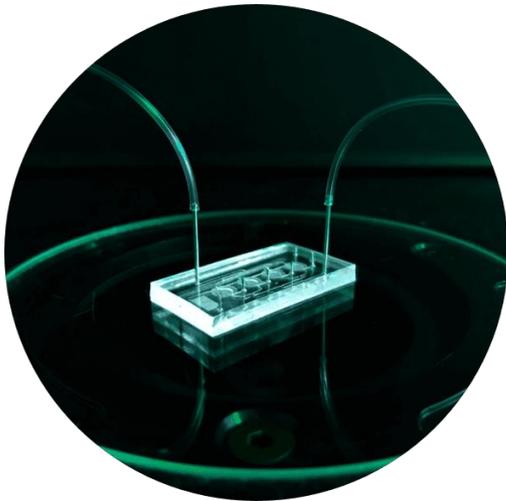


Auf diese Weise werden die Zellen analog zum menschlichen Körper dynamisch mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, Stoffwechselprodukte abführt und die Zellen fluidmechanischen Reizen ausgesetzt.

Da die Chips so die natürliche, dreidimensionale Mikroumgebung der Zellen im Gewebe nachbilden, verhalten sich die enthaltenen Zellen und Gewebe ganz ähnlich, wie sie es auch im menschlichen Körper tun würden.

Auf diese Weise können anhand des Zellverhaltens bspw. die Wirkung neuer Arzneimittel oder der Einfluss externer Reize auf die Zellen untersucht werden.

Organ-on-Chip-Systeme und Multi-Organ-Chips



Organ-on-Chip-Systeme kombinieren folglich die Alleinstellungsmerkmale klassischer *In-vitro*-Modelle (menschliche Zellen und Gene) und der Tiermodelle (komplexe 3D-Gewebe und Blutkreislauf).

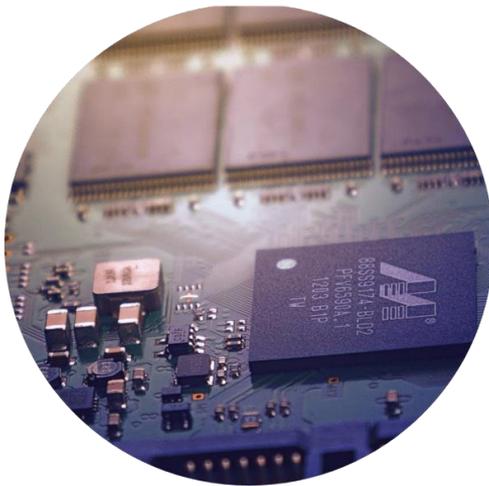
Mit diesen mikrophysiologischen *In-vitro*-Testsystemen können verschiedenste medizinische, biologische, pharmakologische und toxikologische Fragestellungen beantwortet werden, ohne dabei auf Versuchstiere zurückgreifen zu müssen.

In-silico-Modelle

werden hochkomplexe mathematische Computersimulationen verstanden, die auf einer großen Menge bereits verfügbarer Tierversuchs- und Labordaten basieren und mit deren Hilfe die Auswirkungen spezifischer Substanzen auf den menschlichen Organismus vorhergesagt werden können.

Solche Modelle kommen bspw. bei der Entwicklung neuer Medikamente zum Einsatz, um die Wechselwirkung einer Substanz mit den organspezifischen Zellen zu ermitteln und potenziell gefährliche Wirkstoffe bereits im Vorfeld identifizieren zu können.

Auf diese Weise kann bereits frühzeitig vorhergesagt werden, wie und von welchen Organen ein neuer Wirkstoff vom Körper aufgenommen und verstoffwechselt wird.



In-silico-Modelle

Auch für die Untersuchung von Krankheiten und deren zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden In-silico-Modelle entwickelt, die dabei helfen, komplexe Zusammenhänge verstehen zu können. So ist es auch möglich, potenzielle Ansatzpunkte für neue Therapien zu identifizieren oder den Versuchsplan von klinischen Studien zu optimieren.

Auch in der Fort- und Weiterbildung können Computersimulationen Tierversuche ersetzen, indem sie z. B. Studierenden den Aufbau des Körpers von Menschen und Tieren virtuell erleben und untersuchen lassen, ohne dabei auf Frösche oder Rinderaugen zurückgreifen zu müssen.

