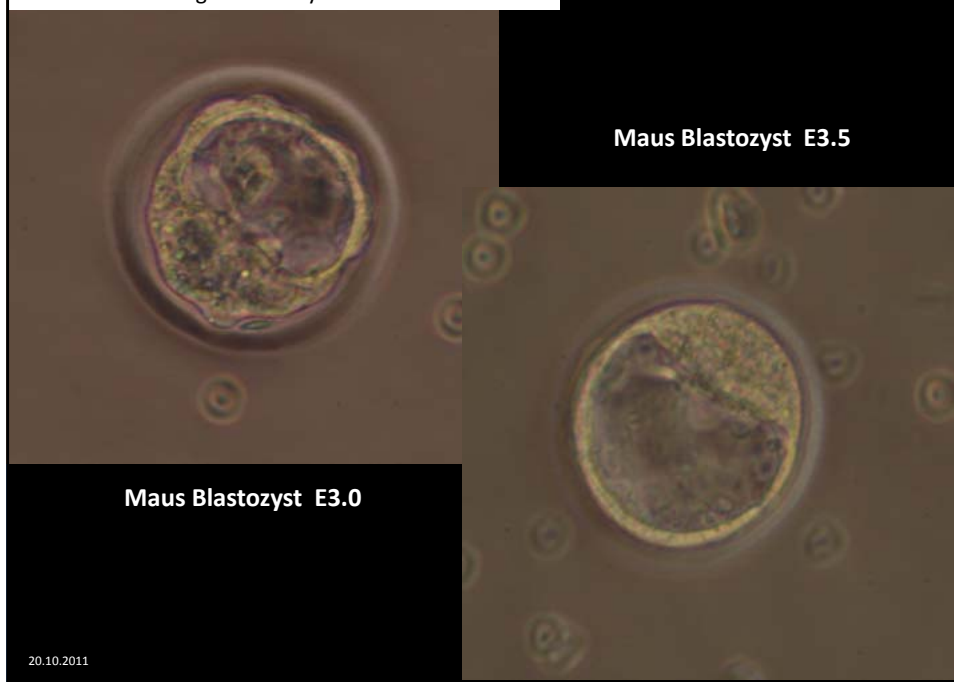


2. Herstellung von embryonalen Stammzellen

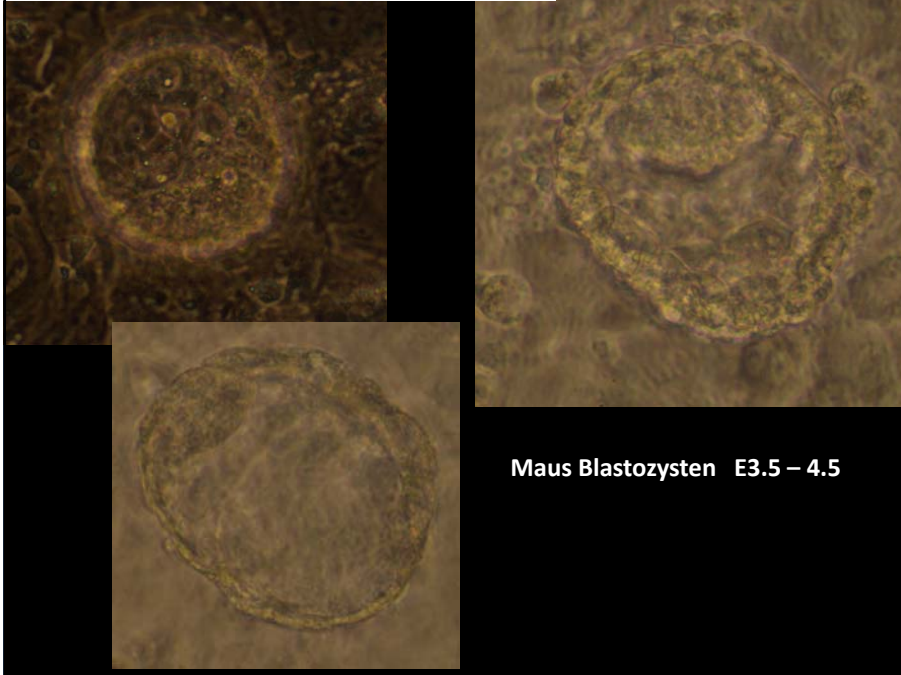
- 2.1. Die Entstehung von embryonalen Stammzellen im Laufe der Ontogenese - Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria (Placentales) am Beispiel der Maus
- 2.2. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien
 - 2.2.1. Isolierung von Blastozysten aus trächtigen Mäuseweibchen
 - 2.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“
 - 2.2.3. Isolierung von Eiern aus Frauen, Herstellung humanen Blastozysten und Kulture von hESCs
- 2.3. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)
- 2.4. Pluripotenzbeweise
- 2.5. Herstellen von geklonten Embryonen für die Isolierung von ESCs

Georg Weitzer

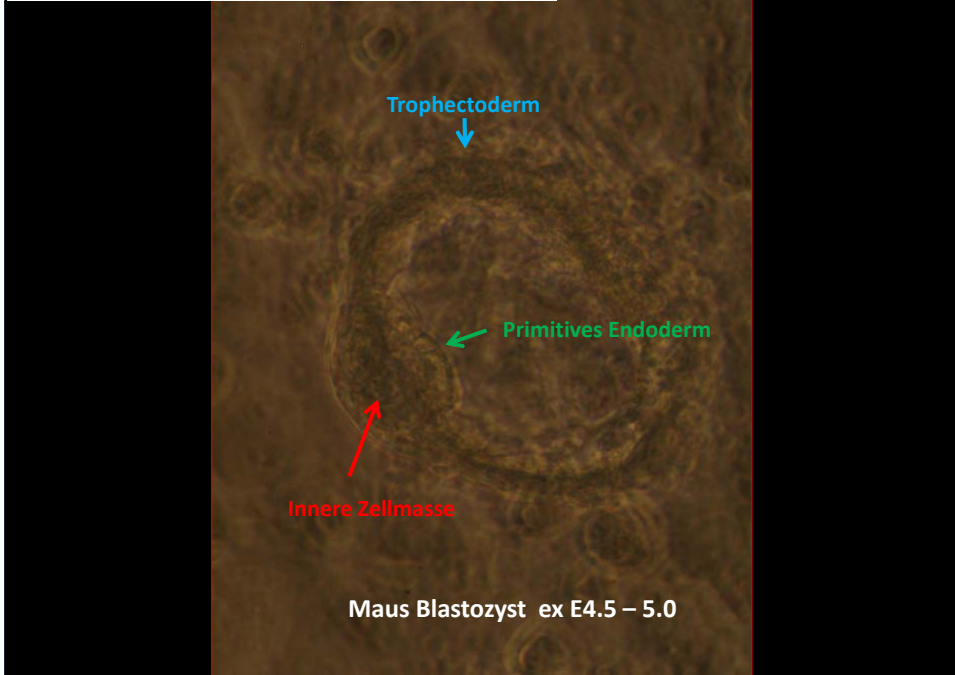
2.2. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien



2.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“



2.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“



2.2.2. Kultivierung der Blastozysten und später der ESC Linien auf „feeder cells“

1. Mitotisch inaktivierte SNL76/7 Fibroblasten (mit 10mg/ml Mitomycin C 2 Std behandelt)

S = STO fibroblasten S = SIM (= Sandos Inbred Mice) Mäusestamm; TO = Thioguanine/Ouabain-resistent

N = Neomycin Resistent

L = sezernieren Leukämie Inhibition Faktor (LIF) (erste FCs waren Teratocarcinomzellen)

2. DMEM Medium mit viel (4,5g/l) Glucose, 0,11g/l Pyruvat, GPS und 0,1 mM β-Mecaptoethanol

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

Ca-, Mg-, K-, Na-Salze, alle Aminosäuren und Vitamine

3. GPS = 2mM (292mg/l) Glutamin + 30mg/l Penicillin + 50mg/l Streptomycin

4. 15% fötales Rinderserum (FBS)

Insulin, Transferrin, Albumin,, Hormone (Testosteron, ...) Enzyme, Bone morphogenetic protein (s)

kaum reproduzierbar und ethisch bedenkliche Gewinnung

Ethisch problematisch

Alternative zu FBS N2B27 + 2i + LIF Medium (Entwicklung dauerte ca. 20 Jahre)

50% DMEM

N2 (Insulin, Transferrin, Progesteron, Putrescine, Se (Selenit))

B27 Proteinmischungen (geheim: Katalase, SOD, Hormone, ..., Quelle unbekannt)

3mM CHIR99021 + 2mM PD03259010

10⁶ U/ml LIF

Ethisch problematisch

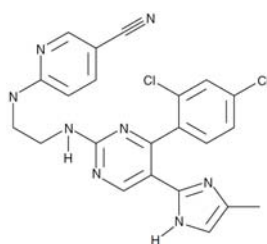
Zweck: Erhaltung des Selbsterneuerungs- und differenzierungspotenzials der ESCs.



5

Georg Weitzer

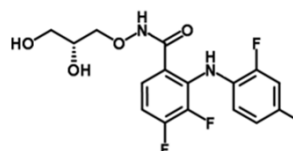
Komponenten des 2i Mediums:



CHIR99021 (CAS 252917-06-9)

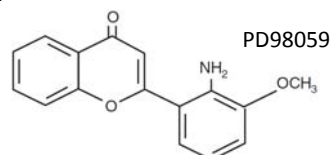
A **Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β) Inhibitor** mimicking Wnt signaling by activating the translocation of β-catenin into the nucleus of cells.

PD03259010



A **Mitogen-activated-Protein Kinase (MEK) inhibitor** which prevents phosphorylation and nuclear localisation of Extracellular-Signal-Related-Kinases (ERK1/2), thus inhibiting differentiation promoting signals such as FGF4.

Oder:



PD98059

Wnt signaling ON

+

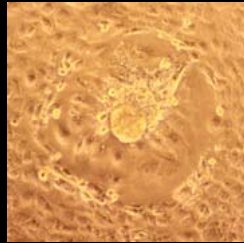
ERK1/2 signaling OFF



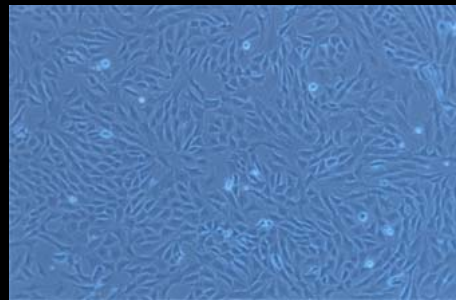
6

Georg Weitzer

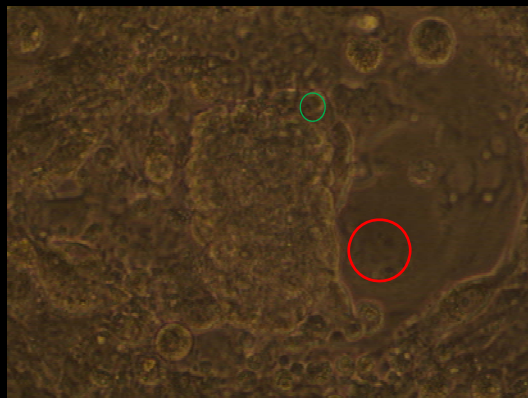
Auf Fibroblasten angewachsener Blastozyst



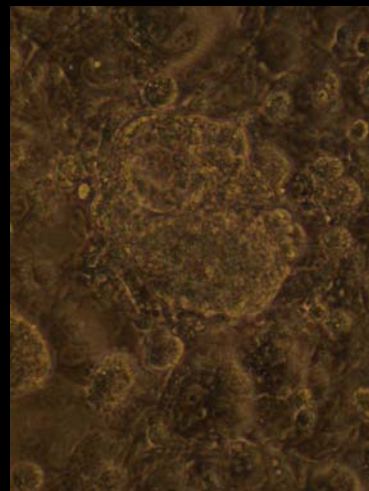
Ex E8-9



Isolierte trophektodermale Zellen



Auf Feeder Zellen explantierte
Maus Blastozysten ex E6 und ex E9



E3.5 Blastozyst

Ex vivo Expansion bis zu ersten Passage (6 bis 9 Tage)

Konfluenz der ersten Passage (nach 8 bis 14 Tagen)

Kolonie mit ca. 200 ESCs, von Fibroblasten umgeben.

F

Subklonieren, um monoklonale Zelllinien zu erhalten (2 bis 3 Wochen)

Stammzellen mit sehr großem Kern/Zytoplasma-Verhältnis, prominenten Nucleoli und hohem mitotischen Index.

Georg Weitzer

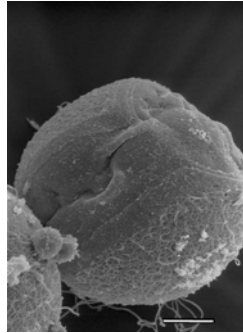
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

9

2. Herstellung von embryonalen Stammzellen

- 2.1. Die Entstehung von embryonalen Stammzellen im Laufe der Ontogenese - Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria (Placentales) am Beispiel der Maus
- 2.2. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien
 - 2.2.1. Isolierung von Blastozysten aus trächtigen Mäuseweibchen
 - 2.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“
 - 2.2.3. Isolierung von Eiern aus Frauen, Herstellung humanen Blastozysten und Kulture von hESCs
- 2.3. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)
- 2.4. Pluripotenzbeweise
- 2.5. Herstellen von geklonten Embryonen für die Isolierung von ESCs

2.2.3. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF



doi: [10.1007/s10815-007-9131-z](https://doi.org/10.1007/s10815-007-9131-z)



Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



11

2.2.3. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF

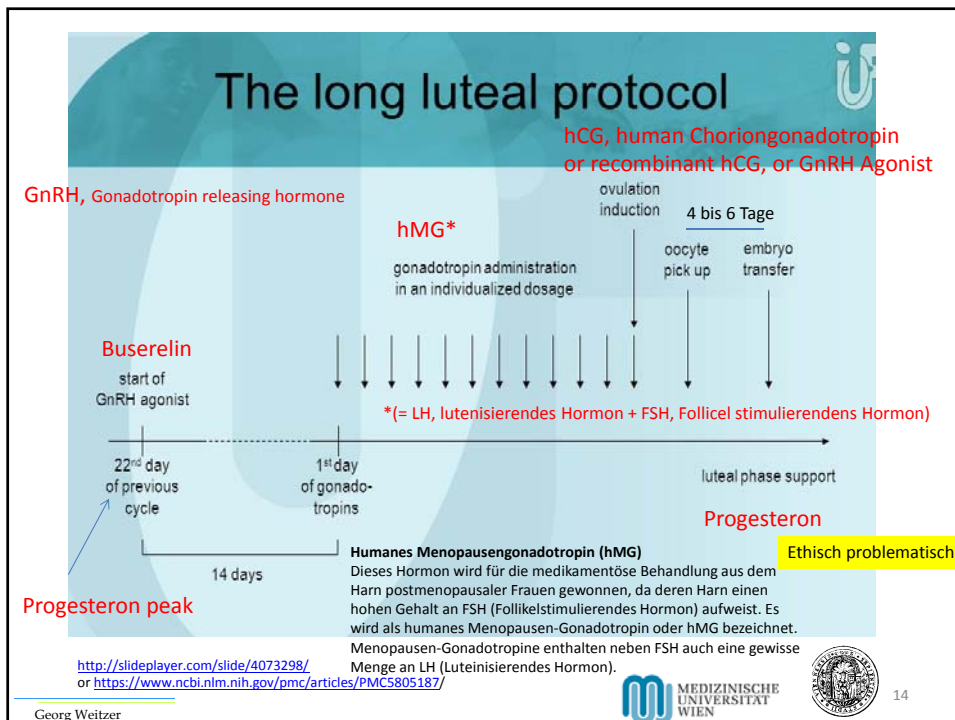
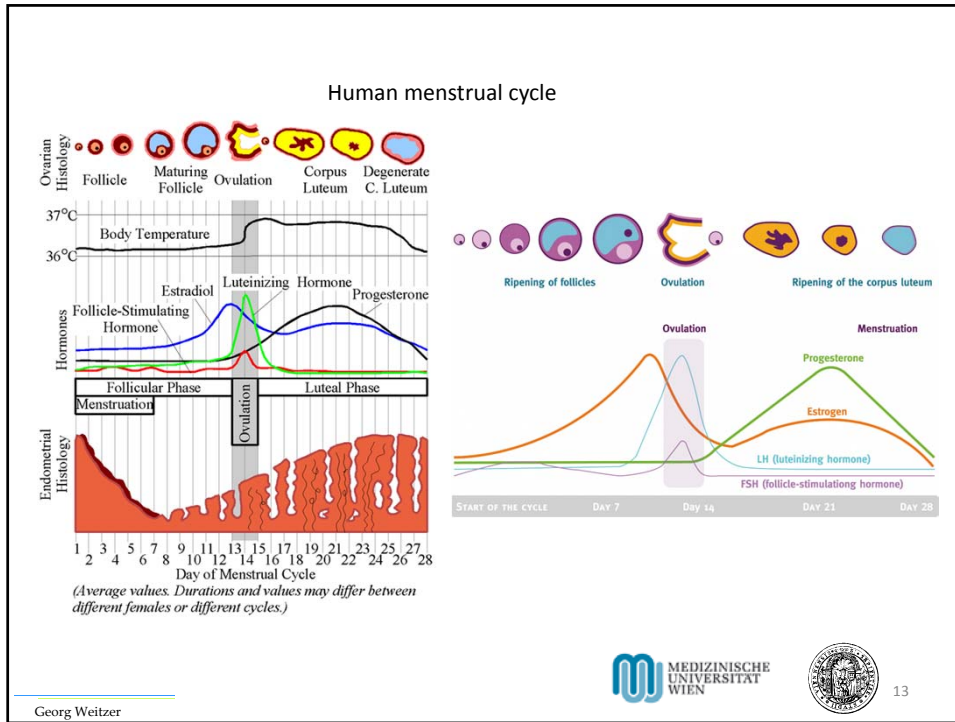
Wie bekommt man Oozyten und Blastozysten von *H. sapiens*?

Voraussetzungen:

Detaillierte Kenntnis des Ablaufs der Meiose bei Frauen und Männern, sowie der Reifung der Oozyten und des Menstruationszyklus.

Procedere:

- Superovulation
- Isolation mittels Ultraschall-überwachte transvaginale Katheterisierung
- *Ex vivo* Befruchtung
- Kultur der Zygote bis zum Blastozystenstadium *ex vivo*
- Transdermale Implantation des(r) Blastozysten oder *in vitro* Kultur der ICM bis zur Etablierung von ESC-Linien.

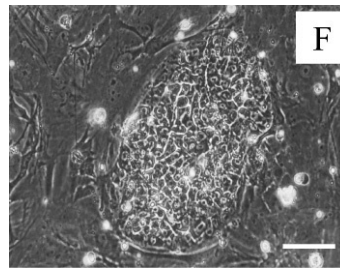
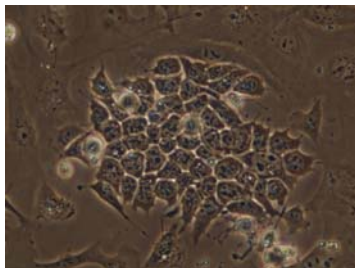


2. Herstellung von embryonalen Stammzellen

- 2.1. Die Entstehung von embryonalen Stammzellen im Laufe der Ontogenese - Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria (Placentales) am Beispiel der Maus
- 2.2. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien
- 2.3. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)
- 2.4. Pluripotenzbeweise
- 2.5. Herstellen von geklonten Embryonen für die Isolierung von ESCs

Georg Weitzer

2.3. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)



mESCs: Kultur wie Blastozystenkultur: LIF (STAT3) Bmp2/4 und Wnt (β -Catenin) essentiell.

hESC: Kultur wie mESC aber nicht LIF (STAT3) und Bmp2/4 entscheidend, sondern

FGF2, Activin/ Nodal, Noggin (a Bmp and TGF β antagonist), TGF β - und Wnt-signaling.

STAT = Signal transducer and activator of transcription

Georg Weitzer

2.3.1. Signalübertragungswege oder die Molekulare Grundlage der Selbsterneuerung von (embryonalen) Stammzellen

2.3.1.1. LIF Signalübertragung

2.3.1.2. Bmp2/4 // Tgf- β Signalübertragung

2.3.1.3. FGF Signalübertragung

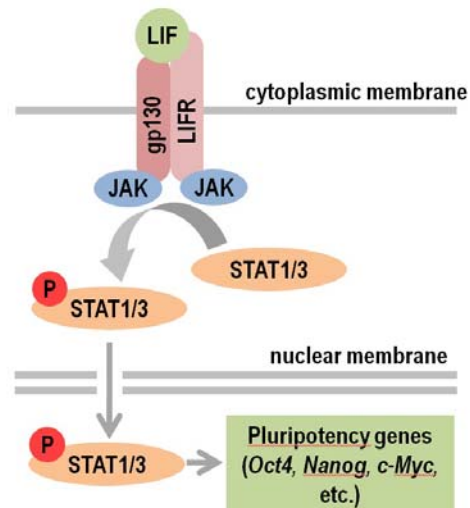
2.3.1.4. Wnt Signalübertragung

2.3.2. Unterschiede zwischen Mensch und Maus

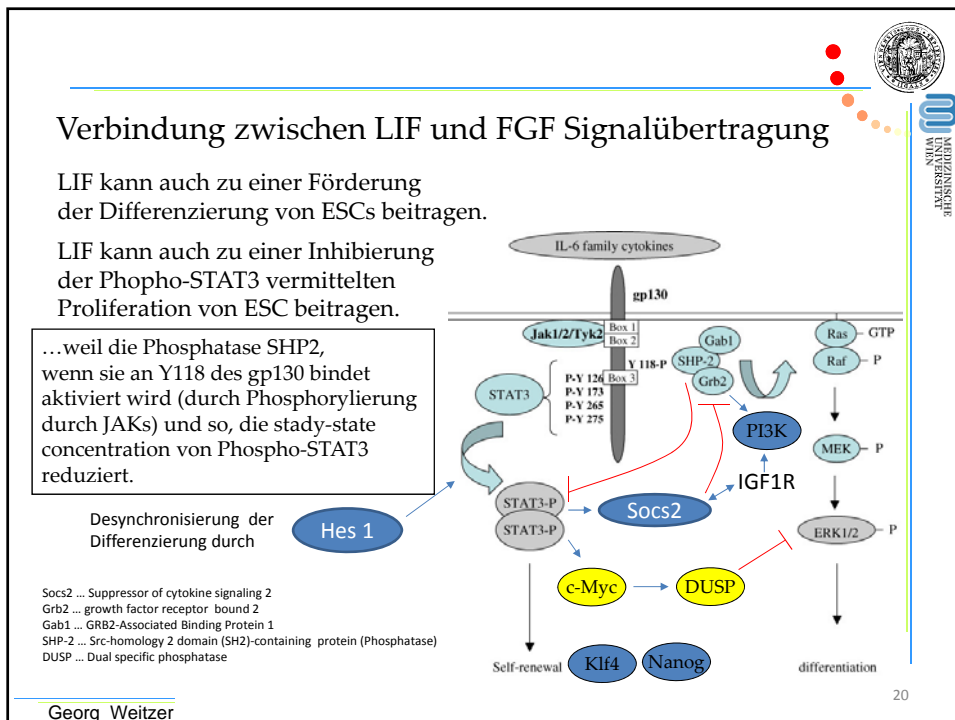
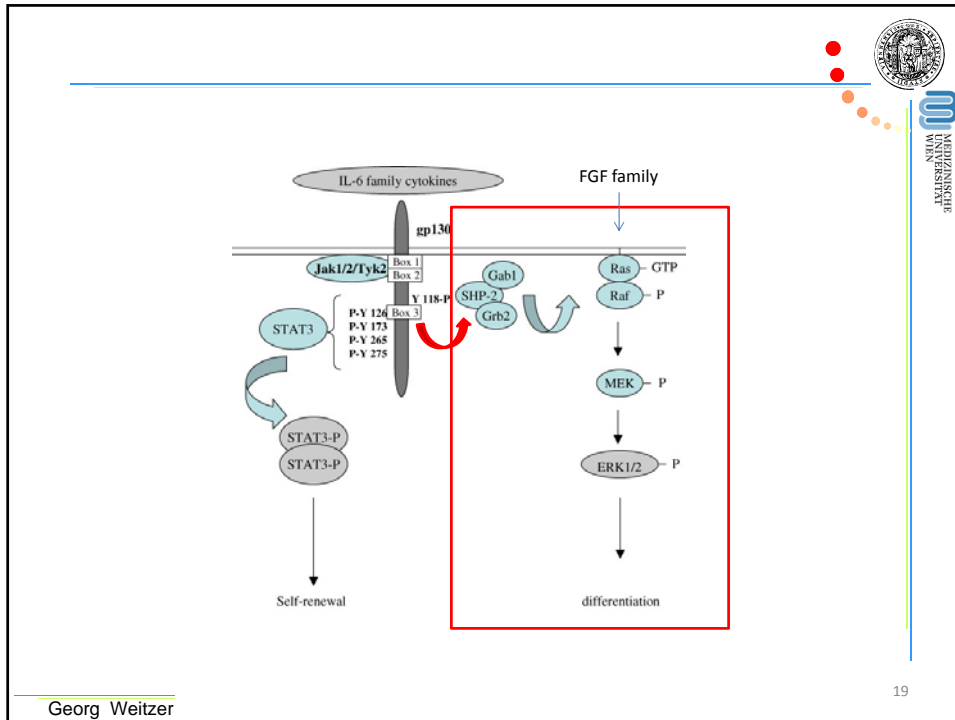
Georg Weitzer

2.3.1.1. LIF Signalübertragung

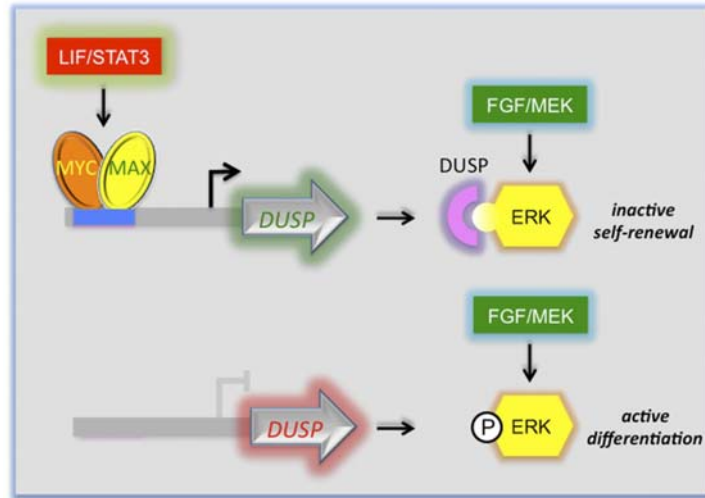
Maus ESCs:


<http://www.biodiscoveryjournal.co.uk/Archive/A9.htm>

Georg Weitzer



A model for ERK regulation by MYC/MAX complexes in murine pluripotent cells.

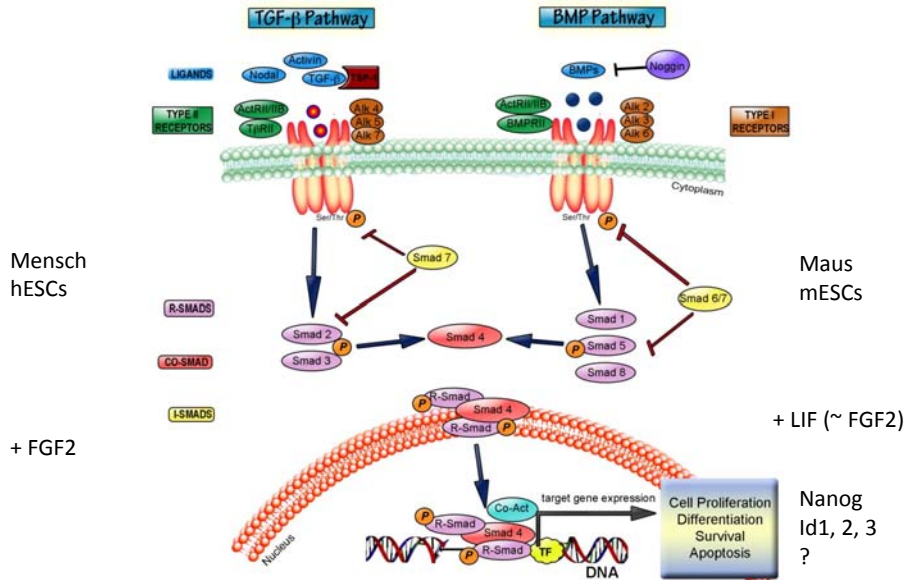


James Chappell et al. Genes Dev. 2013;27:725-733



Copyright © 2013 by Cold Spring Harbor Laboratory Press

2.3.1.2. Bmp2/4 // Tgf-β Signalübertragung



<https://www.intechopen.com/books/trends-in-cell-signaling-pathways-in-neuronal-fate-decision/role-of-tgf-signaling-in-neurogenic-regions-after-brain-injury>



22

Georg Weitzer