

## 2. Teil: (Zusammenfassung der 4. DSt.)

### Organoide

#### 1. Was sind Organoid?

- 1.1. Was ist ein Embryoid Body?
- 1.2. Woraus stellt man Organoid her?
- 1.3. Welche Organoid gibt es bereits?
- 1.4. Von Organoiden zu Entstehung ganzer Lebewesen



#### 2. Wie entstehen Organoid?

#### 3. Was wird man einmal mit Organoiden machen können? Hauptsächlich

Grundlagenforschung

#### 4. Derzeitige Einschränkungen in der Organoidforschung

14 Tage Regelung



Quellenverweis: Texte und Ideen teilweise von

<https://www.eurostemcell.org/de/organoide-was-sind-organoide-und-wie-helfen-sie-der-regenerativen-medicin>  
übernommen und modifiziert.

### 3. Teil Die Herstellung von Lebewesen

### 5. Doppelstunde ESF II 2020

(Über die Möglichkeit Lebewesen aus einer diploiden Zelle herzustellen.)

1. Die Herstellung von Lebewesen aus einer lebenden diploiden Zelle.  
Es geht hier nicht um die Herstellung von Leben an sich!  
Es geht um die Herstellung von autonom vermehrungsfähigen komplexen Organismen ,  
ohne Zeugung durch Eltern.
2. Primäre Keimzellen (Primordial germ cells (PGCs))
3. Der weibliche Reproduktionszyklus in vivo und ex vivo
4. Der männliche Reproduktionszyklus in vivo und ex vivo
5. Herstellung von Zygoten
6. Ethische und juristische Überlegungen zur Herstellung von Lebewesen.

Im Teil 2 Organoid wurde bereits besprochen:

1. Herstellung von Blastozysten aus Stammzellen
2. Herstellung von Plazenten aus Stammzellen
3. Autonome Morphogenese

Ausgangspunkt dieser Unternehmungen:

Reproduktionsforschung und assistierende Reproduktionsmedizin bis hin zur In vitro Fertilisation (IVF) als Resultat von circa 100 Jahren Gameten- und Befruchtungs- und Embryonenforschung an Tieren und dem Menschen.

Intension: Erfüllung des Kinderwunsches

Sehnsucht nach langem Leben und Unsterblichkeit

Die Überwindung des Todes als Motiv für die Forschung.

1. Herstellung von Lebewesen aus einer lebenden diploiden oder haploiden Zelle.

Es geht hier nicht um die Herstellung von Leben an sich!

1.1. Diploide (2n) Zellen (ESCs + iPSCs + ntESCs = PSCs) (X= derzeit unüberwindliche Barrieren)

1. PSCs → Embryo Bodies (EBs) → Organoide → Gastruloide → Organogenese (X)
2. PSCs → ESCs + Trophektoder → Blastozysten → Implantation → Gastrulation (X)
3. PSCs → ESCs + Trophektoder → Blastozysten + Placentoide (künstl. Plazenten) (X) (Homunkulus / Retortenbaby)
4. PSCs → EBs → Primordial Germ cells (PGCs) Meiose notwendig!
5. PGCs → Gonadiode → Ovaroide / Testiculoide (X) → Oocyten/Spermie ... Nischenbedingungen unbekannt!

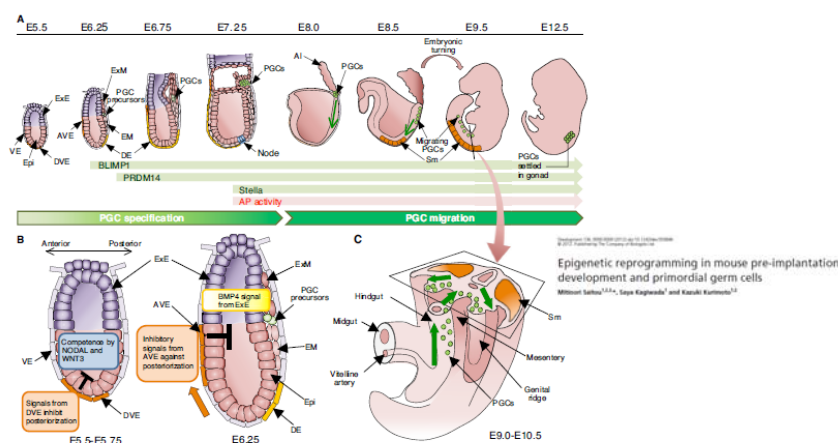
1.2.. Haploide (1n) Zellen

1. Partenogenetische PSCs → 1n ESCs<sup>1</sup> → PGCs/Keimzellen. <sup>1</sup>Martin Leeb bzw. Ulrich Elling, 2011; hpESC (2016)
2. Androgenic PGC-like ahESCs aus Spermien und entkernten Oocyten (2012) Alle sind 19+X und nicht 19+Y!  
→ Bi-parental mice und auch gleich Bi-maternal mice (2018)

Vorgeschichte:

Der Ursprung der Gameten (Keimzellen) sind die Primordial Germ Cells. Primordial Germ Cells entstehen in der Maus am Tag 6.5 - 7.25 (Mensch: 3-4 Woche) im kaudalen primitiven extraembryonalen Ektoderm und wandern dann in dem Mesonephros (Urnieren) Region ein. [Pronethros (Vorniere) - Mesonephros (Urnieren) - Metanethros (eigentliche Niere)]

2. Was sind Keimzellen (Primordial Germ cells) und wie entstehen diese?

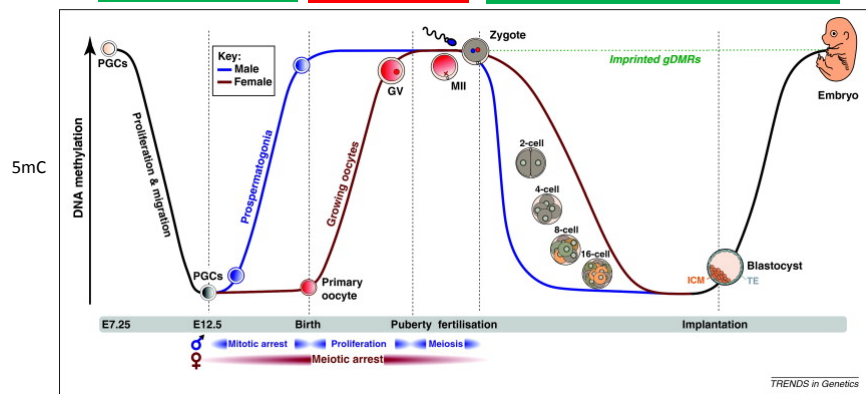


2.1. Die Primordial germ cells (PGCs) entwickeln sich bei weiblichen und männlichen Organismen unterschiedlich.

Gametenentwicklung  
während der  
Foetalentwicklung

Geburt bis  
Geschlechtsreife

Embryogenese



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952511001582>

Georg Weitzer



5

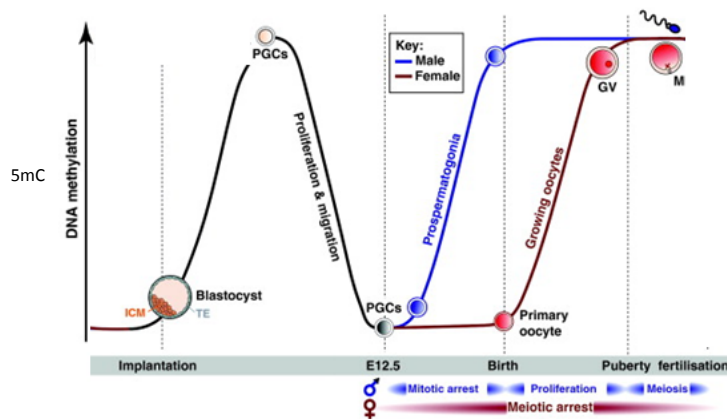
Figure 1. DNA methylation changes during developmental epigenetic reprogramming. Primordial germ cells (PGCs) emerge in embryos at E7.5 and, concomitant with their proliferation and migration towards the genital ridge, DNA methylation is globally erased (black line). Following sex-determination, new DNA-methylation landscapes are established in germ-cell precursors in an asymmetrical fashion in male and female embryos. In the male embryo (blue line), *de novo* methylation takes place before meiosis in mitotically arrested cells (G1-phase; prospermatogonia) and is completed before birth. In the female embryo (red line), primary oocytes enter meiosis and arrest in prophase-I (diplotene stage); DNA methylation is established after birth during the follicular/oocyte growth phase. At puberty, under specific endocrine triggers, fully-grown germinal vesicle (GV) oocytes resume the first meiotic division. After extrusion of the first polar body, oocytes arrest in metaphase of the second meiotic division (MII oocytes) and meiosis is completed only upon fertilisation. Following fertilisation, a new wave of DNA demethylation takes place that is distinct on the parental genomes. In the zygote, DNA methylation of the paternal genome is rapidly erased by an active mechanism (blue line). Demethylation of the maternal genome is slower (red line) and is dependent on DNA replication (passive demethylation). These post-fertilisation demethylation events do not include imprinted gDMRs (green dotted line), resulting in parental-allele-specific methylation of these elements in early embryos and consequent parental-allele-specific expression of associated imprinted genes. Concomitant with blastocyst implantation and cell-lineage determination, new methylation landscapes become established, associated with cellular differentiation.

Georg Weitzer



6

2.2. Es sind zwei unterschiedliche Wellen von DNA Methylierung notwendig, um aus ESCs Keimzellen herzustellen.

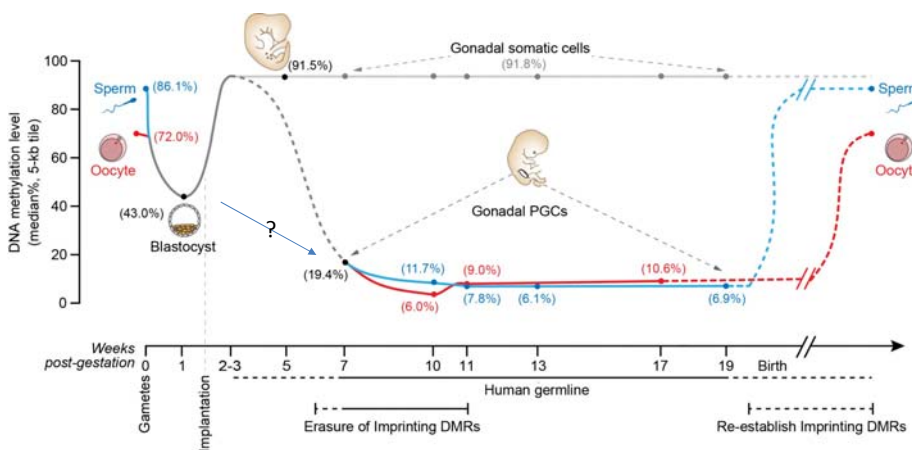


Georg Weitzer



7

2.3. DNA Methylierung während eines ganzen Reproduktionszyklus



<http://biopic.pku.edu.cn/english/content.aspx?id=260> nicht mehr verfügbar 11.11.2020

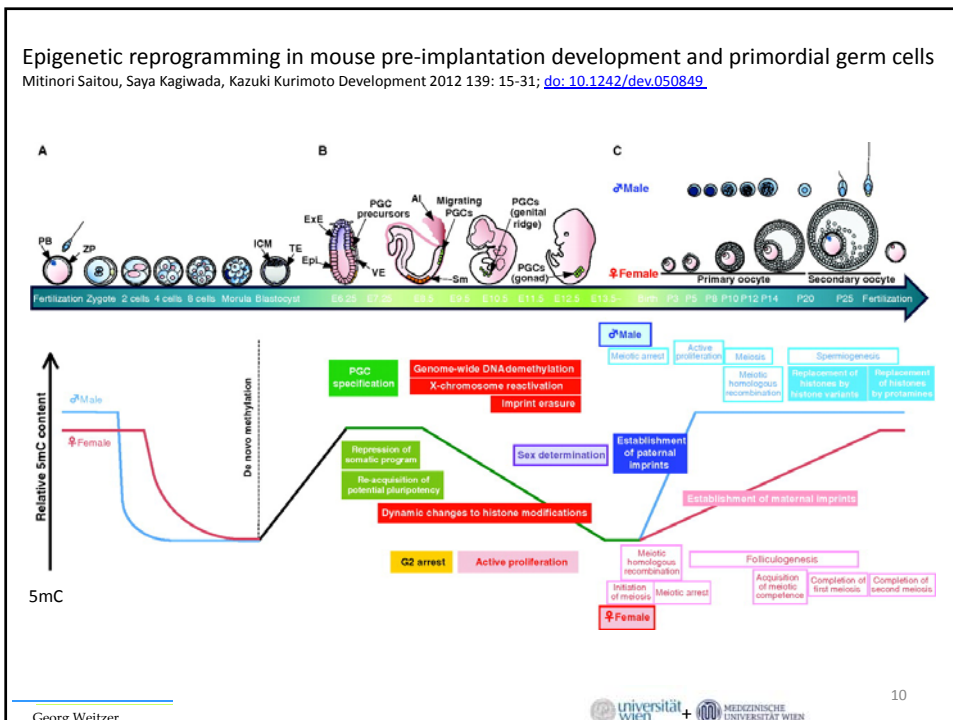
Kann man diese Prozesse auch gesteuert in vitro ablaufen lassen?

Georg Weitzer



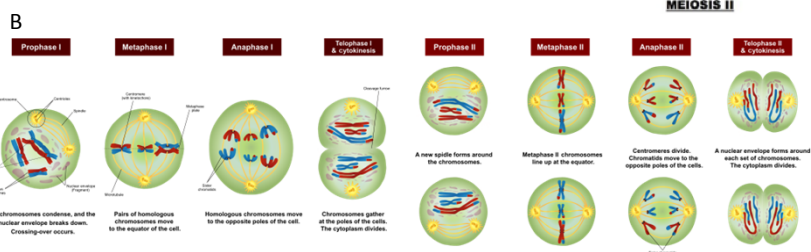
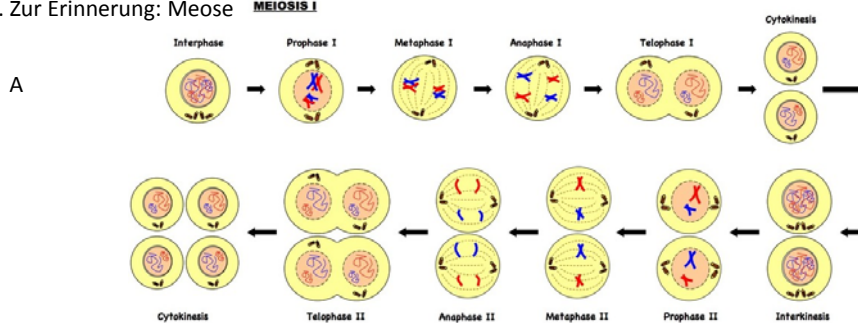
8

The epigenetic genome-wide reprogramming cycle involves two phases of DNA erasure in the mouse (from [[91],[161],[162]]). (1) A first wave of DNA demethylation takes place in the male (blue curve) or female (red curve) primordial germ cells (PGC) of the F1 individuals; this occurs throughout the genome, including the imprinted genes (embryonic day (E10.5-13.5). (2) Then, the genome of the gametes undergoes de novo methylation, with maternal methylation marks established at a later stage (ovulation) than paternal marks (E14). (3) A second wave of DNA demethylation takes place after fertilization in the F2 zygote (E0.5), with a more rapid demethylation in the paternal than the maternal genome. However, the paternal and maternal imprinted genes maintain their methylation pattern throughout this preimplantation reprogramming (dotted curves), allowing the inheritance of parent-specific monoallelic expression in somatic tissues of the F2 individual. (4) Finally, genome-wide remethylation occurs in both parental genomes at about the time of implantation (E3.5). Altogether the very early embryonic development corresponds to an epigenomic reprogramming step, during which the new epigenetic marks are more prone to being impacted by the environment. This explains why the environment experienced during early development has a greater impact on the adult phenotype than that experienced later in life [163]. Moreover, the timing of the two global DNA demethylation and remethylation waves differs between male and female genomes, possibly explaining why they may be differently impacted by a stress applied during these stages [91,164].



**Fig. 1. A schematic of mouse pre-implantation and germ cell development.** (Top) A schematic of pre-implantation and germ-cell development in mice. (A) Pre-implantation development stages; (B) post-implantation embryonic development, following blastocyst implantation at around E4.5; and (C) postnatal germ cell development and maturation. Primordial germ cell (PGC) precursors (E6.25) and PGCs are shown as green circles in embryos from E6.25 to E12.5. (Bottom) Key genetic and epigenetic events are shown that are associated with pre-implantation and germ cell development, together with relative levels of 5-methylcytosine (5mC) at different developmental stages. Al, allantois; Epi, epiblast; ExE, extra-embryonic ectoderm; ICM, inner cell mass; PB, polar body; PGCs, primordial germ cells; Sm, somite; TE, trophoctoderm; VE, visceral endoderm; ZP, zona pelucida.

2.4. Zur Erinnerung: Meiose **MEIOSIS I**



<https://en.wikipedia.org/wiki/Meiosis>

**In vitro Reproduktion von Säugetieren inklusive Homo sapiens**

Somatische Zelle → Keimbahnstammzellen (Primordial Germ Cells (PGCs) →  
 → Oozyten und Spermien → in vitro Fertilisation (iVF) → künstlicher Uterus  
 und Plazenta → Embryonal und Fötalentwicklung → Neugeborenes Lebewesen.

Herstellung von Oozyten und Spermien-artige Zellen ex vivo dauerte Jahrzehnte!

3. Der weibliche Reproduktionszyklus in vivo → ex vivo

4. Der männliche Reproduktionszyklus in vivo → ex vivo

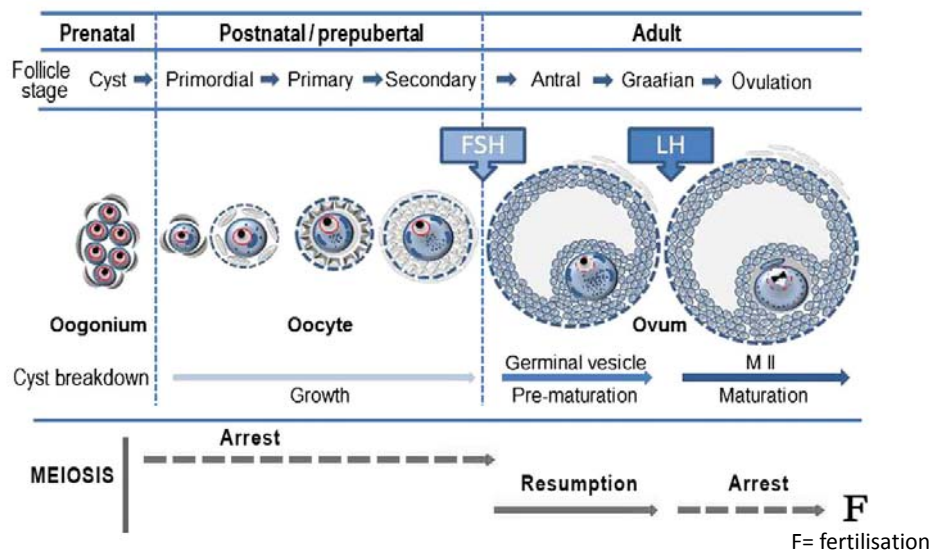
Verbleibende Hürden:

PCG/Oozyten sowie Spermien Nische derzeit nicht rekonstruierbar

Hormonale Regulation nicht durchschaubar

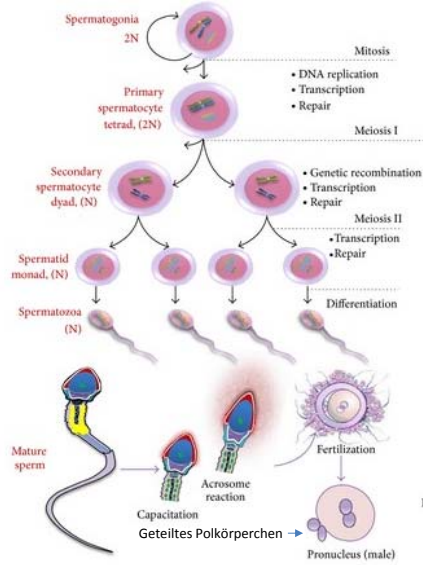
→ Zeitlicher Rahmen der Entwicklungsschritte ex vivo nicht konsistent ( nicht der Natur entsprechend)

3. Der weibliche Reproduktionszyklus: Entstehung der MII Oozyten in vivo



<https://embryologistmedia.weebly.com/patients/what-is-a-mature-egg-reasons-why-you-may-not-obtain-mature-eggs-in-your-art-cycle>

4. Männliche Gameten Entwicklung in vivo:



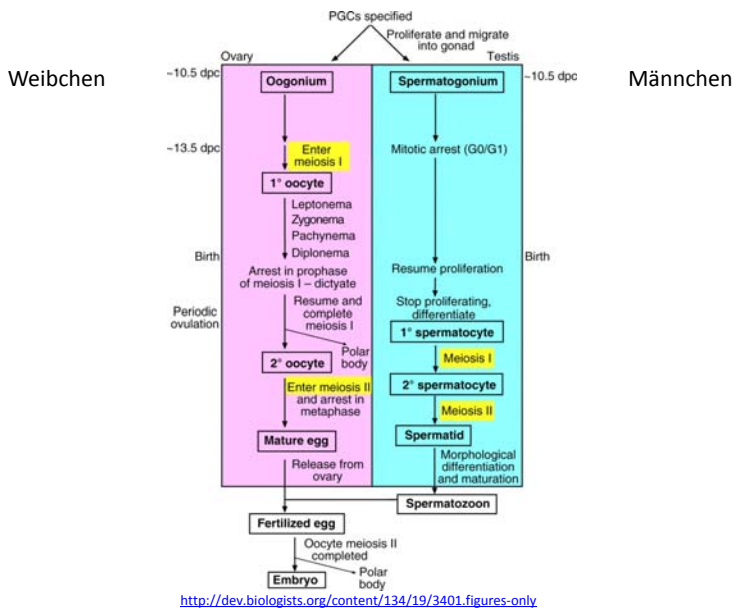
[https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-showing-the-cellular-genetic-and-chromatin-changes-during\\_fig1\\_259450365](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-showing-the-cellular-genetic-and-chromatin-changes-during_fig1_259450365)

Georg Weitzer



15

Vergleich der Meiose in Keimzellen beider Geschlechter:



<http://dev.biologists.org/content/134/19/3401.figures-only>

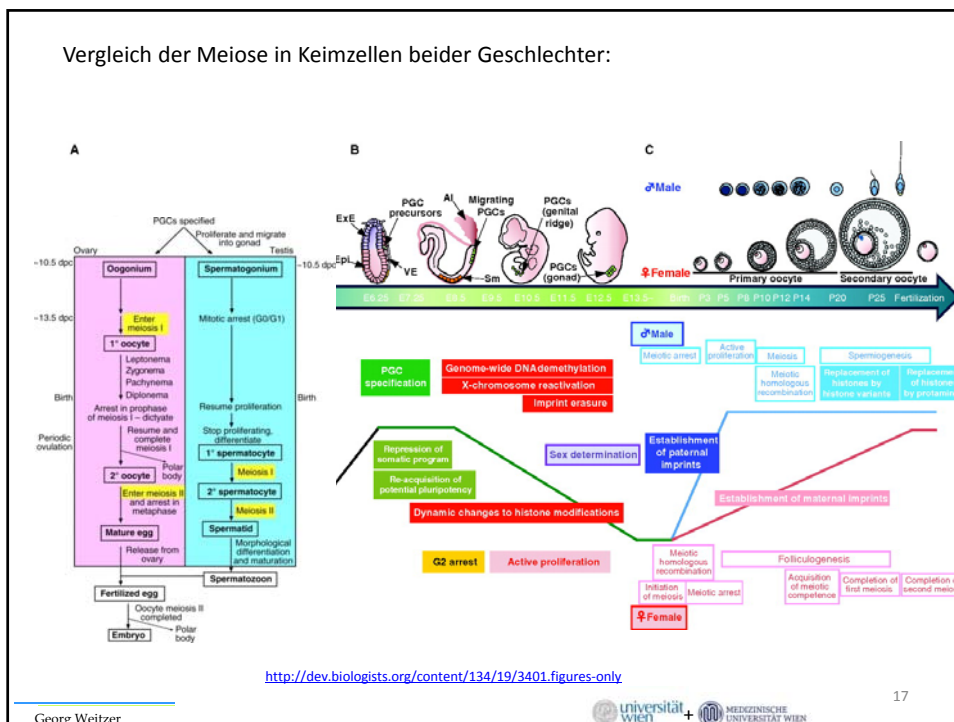
Georg Weitzer



16



Vergleich der Meiose in Keimzellen beider Geschlechter:



In vitro Reproduktion von Säugetieren inklusive Homo sapiens

Somatische Zelle → Keimbahnstammzellen (Primordial Germ Cells (PGCs)) →

→ Oozyten und Spermien → in vitro Fertilisation (iVF) → künstlicher Uterus

und Plazenta → Embryonal und Fötalentwicklung → Neugeborenes Lebewesen.

Notwendige Voraussetzungen:

- 5. Herstellung von Gameten bzw. Zygoten aus diploiden Zellen
  - gefolgt von Einnisten des Blastocysten in einem künstlichen Uterus oder einer Leihmutter.

3b. Der weibliche Reproduktionszyklus ex vivo

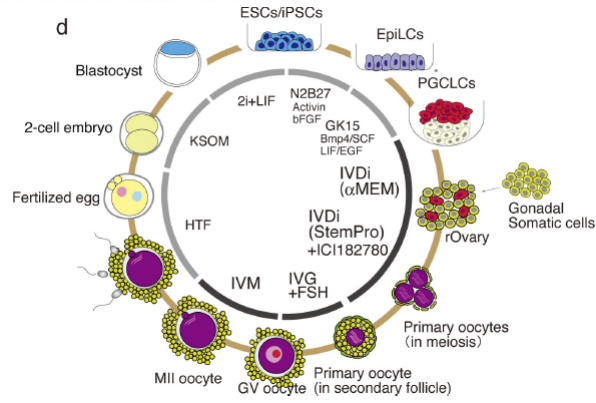
LETTER

doi:10.1038/nature20104

2016

Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line

Orin Hikkabe<sup>1\*</sup>, Nobuhiko Hamazaki<sup>1</sup>, Go Nagamatsu<sup>1</sup>, Yuyei Obata<sup>2</sup>, Yuji Hirao<sup>3</sup>, Norio Hamada<sup>1,4</sup>, So Shimamoto<sup>2</sup>, Takuya Imamura<sup>1</sup>, Kinichi Nakashima<sup>1</sup>, Mitsunori Saitou<sup>1,2,3,5</sup> & Katsuhiko Hayashi<sup>1,5\*</sup>



Georg Weitzer



19