

B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

1.1. Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria (Placentales) am Beispiel der Maus

- Die Entstehung von Stammzellen im Laufe der Ontogenese

Prägastrulationsentwicklung der Zygote

Ursprung der embryonalen Stammzellen

A: E0 (Zygote)
 B: 2-Zellen
 C: 4-Zellen
 D: 8-Zellen
 E: Morula (m: E2.5, h: E3.5)
 F: Blastocyst (m: E3.0, h: E4.5)
 G: Hatched Blastocyst (m: E4.5, h: E6.0)
 H: Implantation
 I: E 6.5 (Embryo with germ layers: ex, bc, ps, ve, e)

3,5 Tage (E3,5)
 32 Zellen
 64 - 128 Zellen

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

3

Ursprung der somatischen Stammzellen? → Prägastrulationsentwicklung der Zygote(schematisch)

Fertilized egg E0.0
 2-cell E1.5 (20-38 h)
 3-cell
 4-cell E2.0 (38-50 h)
 8-cell E2.5 (50-62 h)

Zygotic transcription

compacted 8-cell E2.5
 16-cell/morula E3.0 (62/74 h)
 blastocyst/32 to 64-cell E3.5
 hatched blastocyst 256-cell E4.5

Embryonic
 Polar TE
 ICM
Abembryonic
 Blastocoel
 Mural TE
 Epiblast
 PrE

Compaction
Trophectoderm formation
Primitive endoderm formation

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

4

Peri-implantationsentwicklung des Blastozysten:

Entstehung des extra-embryonalen primitiven Endoderms und dessen Derivate, des visceralen und parietalen Endoderms.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

5

Lokalisation der Zellen bis zum Egg-zylinder (m) / embryonic disc (h) stage:

Downloaded from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/> on November 4, 2016

preimplantation						peri-	postimplantation >	
E0.5	E1.5	E2.0	E2.5	E3.0	E3.5	E4.5	E5.0	E5.5
zygote	2-cell	4-cell	8-16-cell	16-32-cell	early blastocyst	late blastocyst	peri-implantation	egg cylinder
		early bias	wave 1	wave 2	mosaic	sorted	rosette	lumen

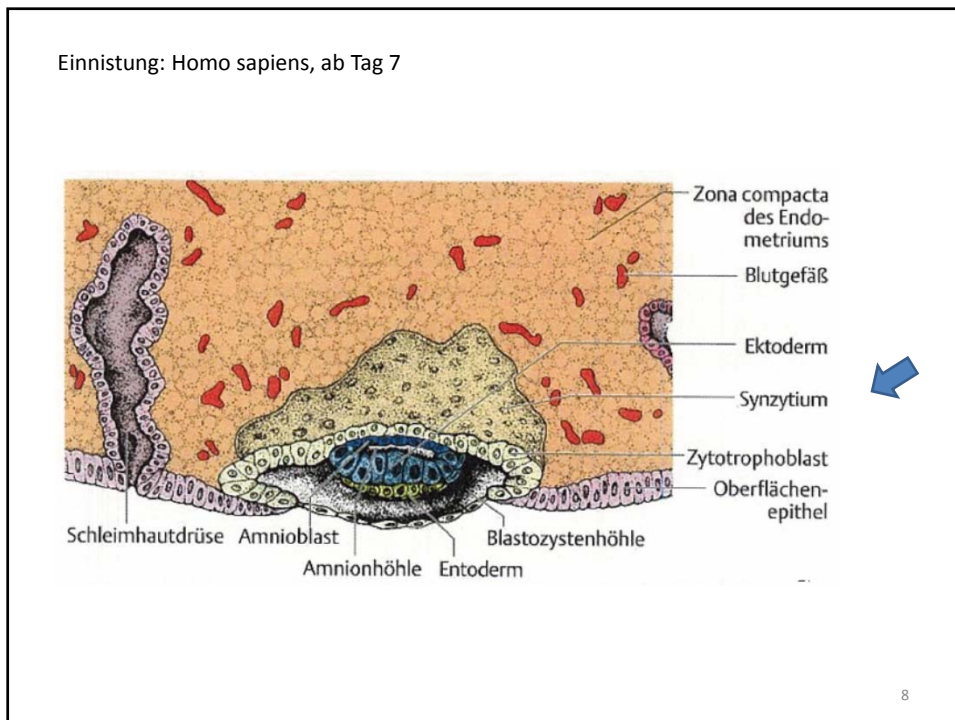
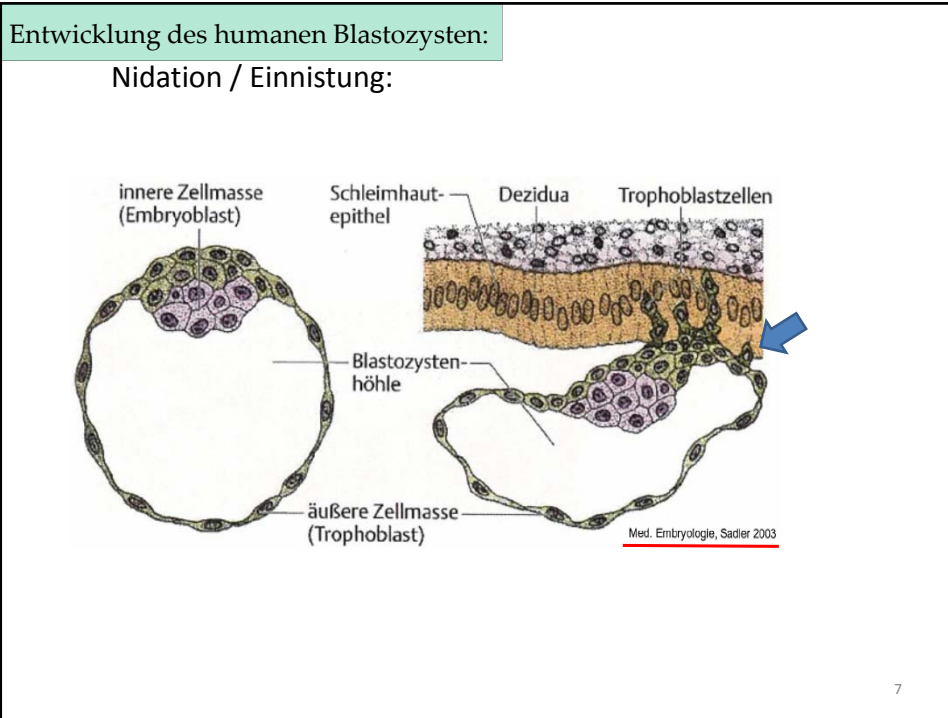
■ EPI
 ■ TE/ExE
 ■ PE/VE
 ✖ apoptosis
 basement membrane
 cell division
 cell movement

Figure 1. Overview of early mouse development. Embryonic and extraembryonic cells are specified in the preimplantation embryo by two cell fate decisions. In the first cell fate decision, waves of cell divisions create inside and outside cells. Outside cells give rise to extraembryonic trophoblast (TE), while inside cells form the pluripotent inner cell mass (ICM). In the second cell fate decision, cells of the ICM are segregated into the extraembryonic PE and the pluripotent epiblast (EPI) that will later give rise to all tissues of the body. These fate decisions are influenced but not determined by heterogeneity between individual cells within the embryo that is established by the 4-cell stage (shown by different shading of cells). At E4.5, the embryo initiates implantation and over the next 24 h invades the maternal tissues, rapidly proliferates and transforms into an egg cylinder. This new form serves as a foundation for EPI patterning, laying down the body axis and establishment of the germ layers. ExE, extraembryonic ectoderm; PE, primitive endoderm; VE, visceral endoderm.

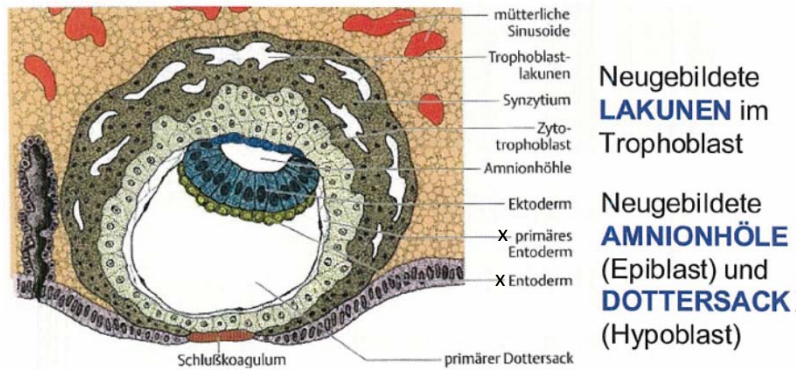
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

6



Einnistung: Homo sapiens, ca. Tag 9



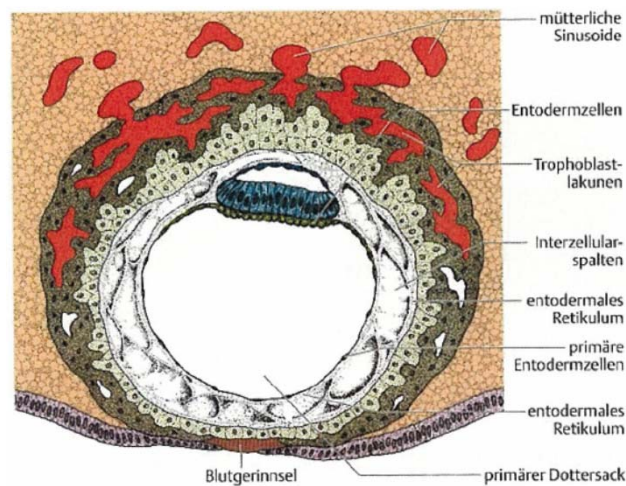
Neugebildete **LAKUNEN** im Trophoblast

Neugebildete **AMNIONHÖLE** (Epiblast) und **DOTTERSACK** (Hypoblast)

x = extraembryonales Endoderm

9

Homo sapiens, ca. Tag 12



Dann folgt die Gastrulation. →

10

Gastrulation → Wo liegt der Ursprung von somatischen Stammzellen?

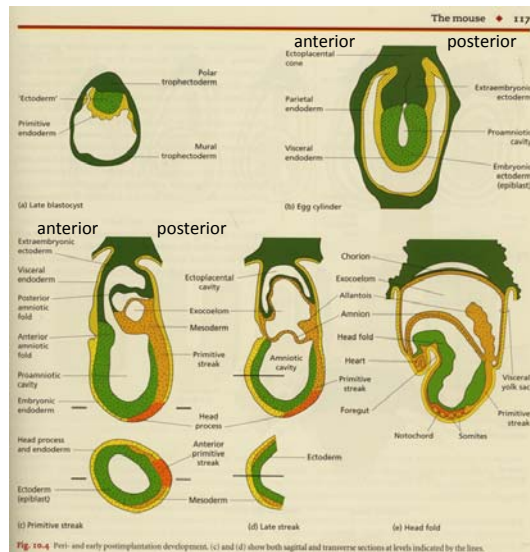


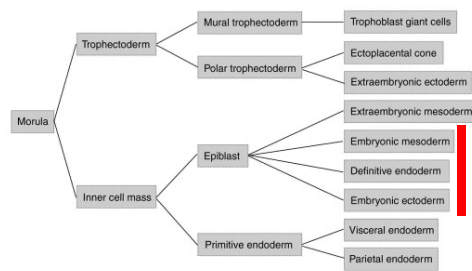
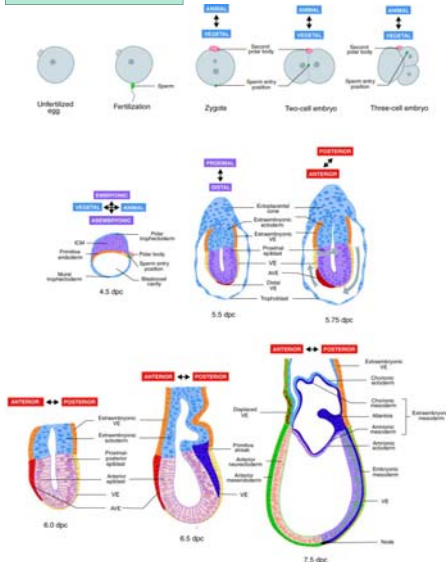
Fig. 19-4 Peri- and early postimplantation development. (c) and (d) show both sagittal and transverse sections at levels indicated by the lines.

Georg Weitzer

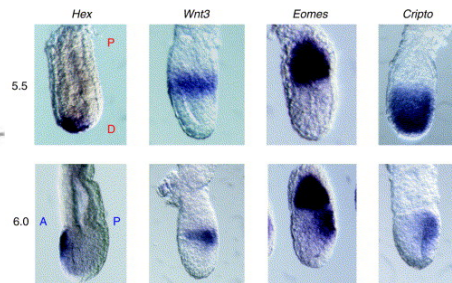


11

Gastrulation)



Current Opinion in Genetics & Development



Current Opinion in Genetics & Development

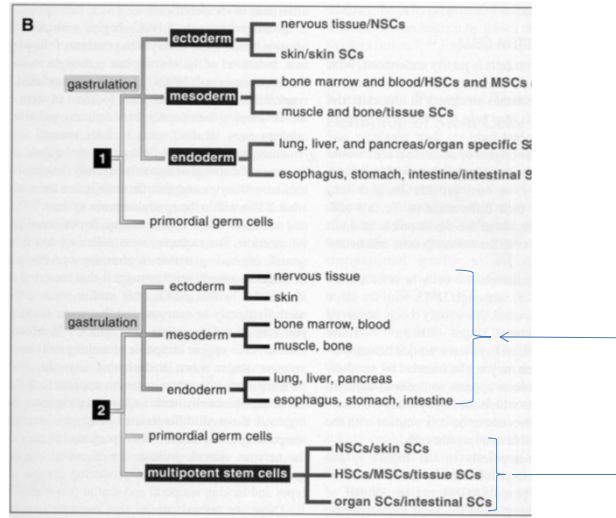
Aus: [Curr Opin Genet Dev](#), 2001 Aug;11(4):384-92. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. [Lu CC](#), [Brennan J](#), [Robertson EJ](#).

Georg Weitzer



12

Wie „überleben“ die somatischen Stammzellen die Gastrulation unbeschadet ?



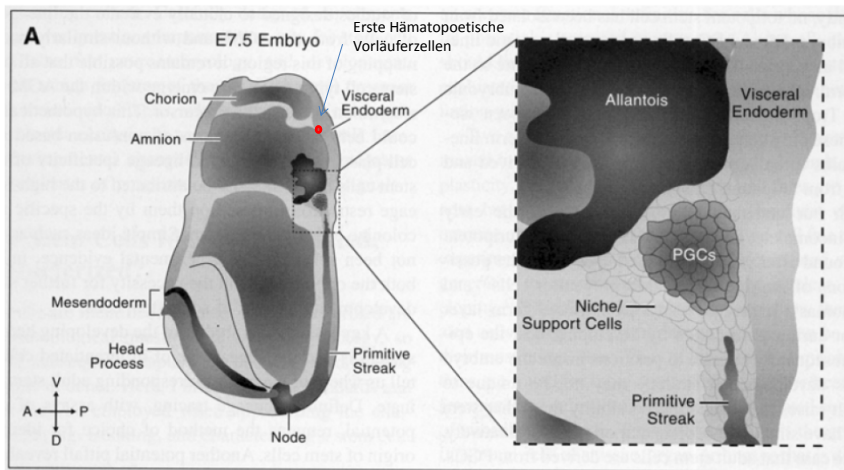
Georg Weitzer



13

Woher kommen die Keimbahnstammzellen?

Die extra-embryonale Lage der Primären Keimzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen

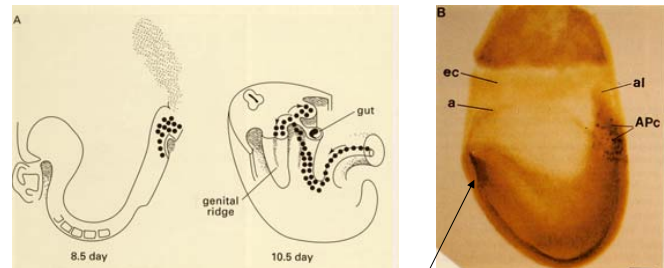


Georg Weitzer



14

Das Einwandern der primären Keimzellen in die Geschlechtsorgane



Neuroektoderm des Kopfbereiches

Für weitere besprochene Details siehe
 McLean, D. J. (2006). Vertebrate reproductive stem cells: recent insights
 and technological advances. *Semin Cell Dev Biol* 17, 534-539.
 Das pdf-file ist unter Lernunterlagen zugänglich.

B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –


Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

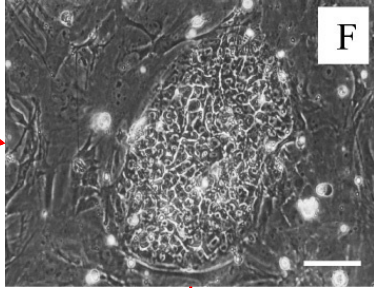
2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

E3.5 Blastozyst



**Kolonie mit ca. 200 ESCs,
von Fibroblasten umgeben.**





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

Konfluenz der ersten
Passage
(nach 8 bis 14 Tagen)

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

17

1.1. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien

1.1.1. Isolation von Blastozysten aus Mäusen

Mouse Female Superovulation Guideline
Superovulation is a technique used to get female mice to release more eggs than normal. It is a critical step in collection zygotes for mouse line re-derivation, IVF, and collection morulae for mouse embryo cryopreservation. Zygotes are collected at 0.5dpc, morulae are collected at 2.5dpc.

Hormone stock reconstitution:
PMSG (sigma G4877-1000IU) is reconstituted from a lyophilized powder at an activity of 1000 IU per vial by adding 3.6 ml of sterile PBS. 100ul microliters are then aliquoted into 1.5 ml tubes. Tubes are labeled and stored in -20 °C freezer.
hCG (sigma C1063-10VL) is reconstituted from a lyophilized powder at an activity of 10,000 IU per vial by adding 1.8 ml of sterile PBS. 100 microliters are then aliquoted into 1.5 ml tubes. Tubes are labeled and placed in -20 °C freezer.

Animals:

Female age: ~4 weeks of age at time of PMSG administration.

Male age: 8-24 weeks stud male, each male is set up only once per week.

Hormone concentrations and injections:

Each PMSG stock tube is diluted with 1ml sterile PBS. Each female is then injected with 0.1 ml. Final dose 5 IU/female.
 Each HCG tube is also diluted with 1ml of sterile PBS. Each female is then injected with 0.1 ml. Final dose 5 IU/female.
 All injections are delivered intraperitoneally.

Hormone time schedule:
 PMSG on Day 1 at 1:00 p.m., HCG on Day 3 at 12:00 p.m., Set-up female with male on Day 3 after hCG injection. → Day 4 check for vaginal pug.

<https://med.stanford.edu/tktc/service/transgenesis-animal-services/transgenic-service/mouse-female-superovulation-guideline-.html>

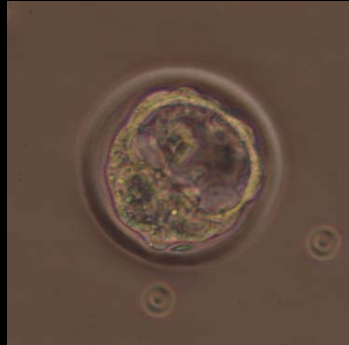
PMSG G pregnant mare serum Gonadotropin
 hCG humanes Choriongonadotropin, löst Eisprung aus

Georg Weitzer



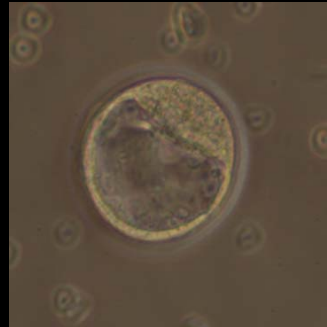

18

1.1. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien
1.1.1. Isolation von Blastozysten aus Mäusen



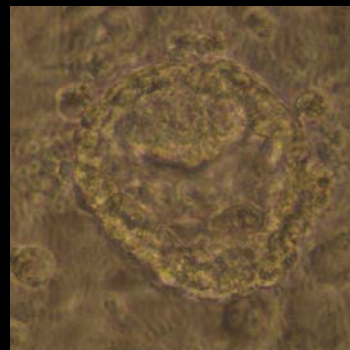
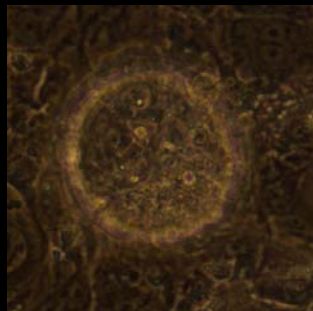
Maus Blastozyst E3.0

Maus Blastozyst E3.5

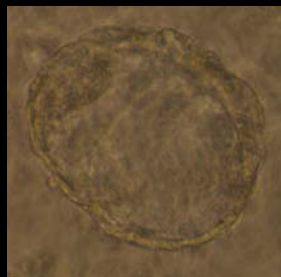


20.10.2011

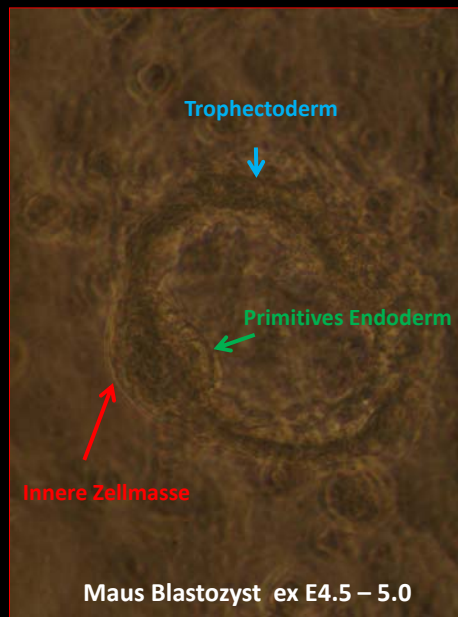
1.1.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“



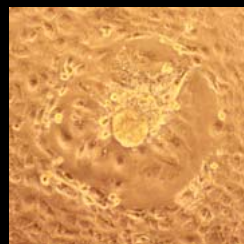
Maus Blastozysten E3.5 – 4.5



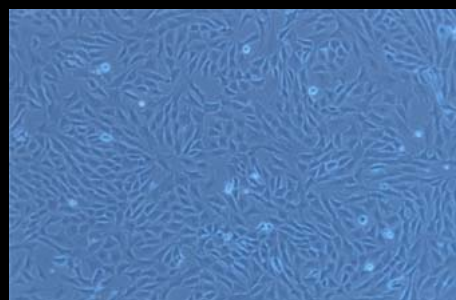
1.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“



Auf Fibroblasten angewachsener Blastozyst



Ex E8-9



Isolierte trophectodermale Zellen



1.1.2. Kultivierung der Blastozysten und daran anschließend der ESC Linien auf „feeder cells“

1. Mitotisch inaktivierte SNL76/7 Fibroblasten (mit 0.05mg/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 (darunter 4mM Gln) und Vitamine

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

4. 15% fötales Rinderserum (FBS)

enthält 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)

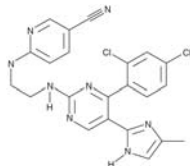
50% DMEM
 N2 (Insulin, Transferrin, Progesteron, Putrescin, Se (Selenit))
 B27 Proteinmischungen (geheim: Katalase, SOD, Hormone, ..., Quelle unbekannt)
 3 μ M CHIR99021 + 1 μ M PD03259010 (beim Menschen: + 2 μ M XAV939)
 10⁶ U/ml LIF

Ethisch problematisch

Zweck: Erhaltung des Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzials der ESCs.

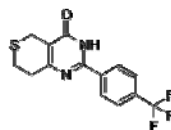
Komponenten des 3i Mediums:

CHIR99021 (CAS 252917-06-9)



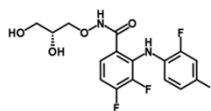
A Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β) Inhibitor mimicking Wnt signaling by activating the translocation of β-catenin into the nucleus of cells.

XAV-939



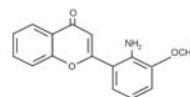
XAV-939 ist ein potenter **tankyrase**, der auf die **Wnt/β-catenin signaling** abzielt. XAV-939 stabilisiert Axin durch Hemmung von **tankyrase 1** und **tankyrase 2** (IC_{50} von 5 bzw. 2 nM) und stimuliert dadurch den Abbau von β-Catenin.

PD03259010



Mitogen-activated-Protein Kinase Kinase (MEK) inhibitor s 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

Georg Weitzer

25

1.1.2. 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 TGFβ antagonist), TGFβ- und Wnt-signaling.

STAT = Signal transducer and activator of transcription

Georg Weitzer

1.1.3. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF für Wunschbabys, hESCs und ntESCs

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

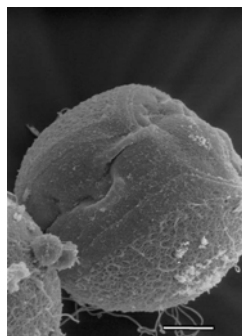
Voraussetzungen:

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

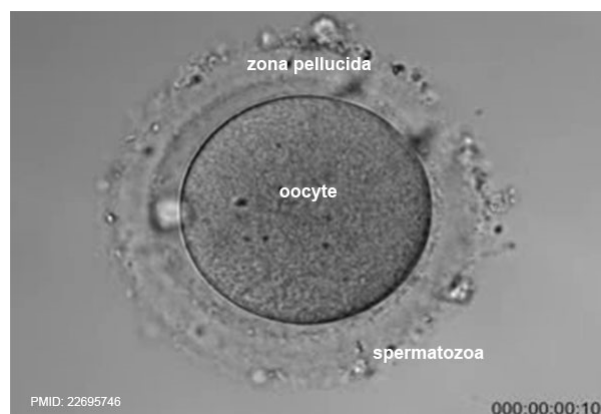
Procedere:

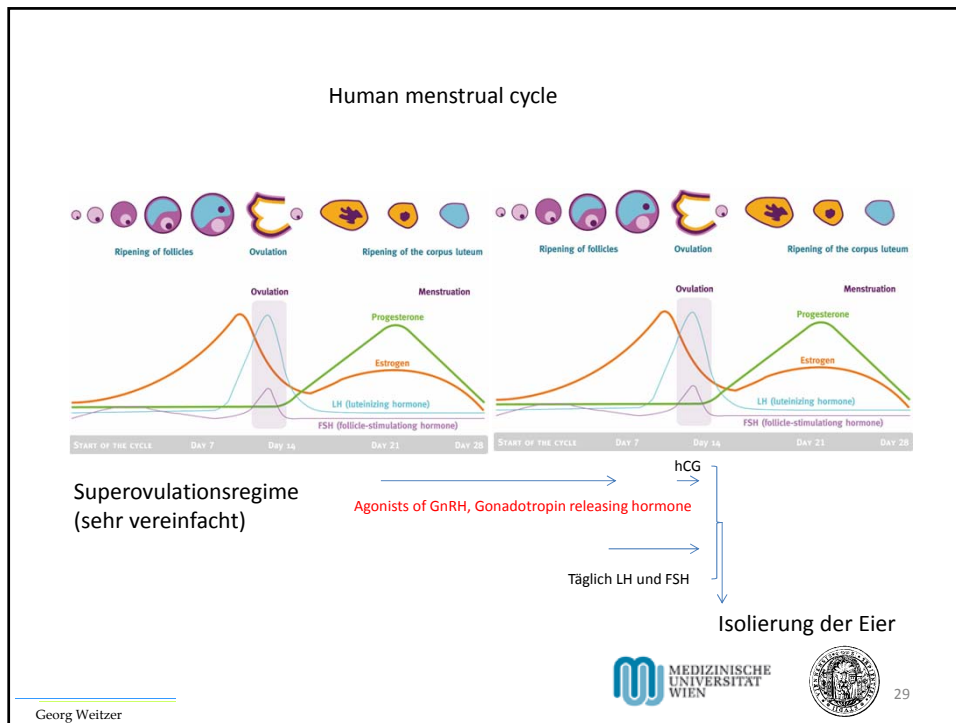
- Superovulation (unter Verwendung von bis zu 7 Hormonen und Medikamenten)
- Isolation mittels Ultraschall-überwachte transvaginale Katheterisierung
- *Ex vivo* Befruchtung
- Kultur der Zygote bis zum Blastozystenstadium *ex vivo*
- Transdermale Implantation des(r) Blastozysten oder *in vitro* Kultur der ICM bis zur Etablierung von ESC-Linien.

2.2.3. 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)





B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

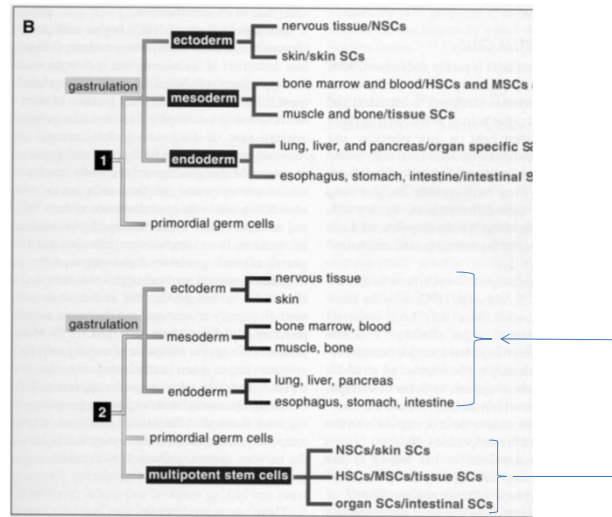
Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

Wo und wie „überleben“ die Stammzellen die Gastrulation unbeschadet ?



1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 1.2.1. Iteratives Isolieren und Charakterisieren mit Oberflächenmarkern
- 1.2.2. Isolieren und Kultur gemeinsam mit den Nischenzellen zusammen
- 1.2.3. Selektion von proliferierenden Zellen unter Annahme einer Nische

1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 1.2.1. Iteratives Isolieren und Charakterisieren
- Stammzellenmarker (Oberflächenproteine aus der Hämatologie)
 - c-Kit, Sca1, Mdr1, Flk1, ... Wo kommen diese Marker (M) in adulten Geweben vor?
 - Isolation dieser M⁺-Zellen mittels FACS oder MACS
 - Analyse der Expressionsmuster und der Selbsterneuerungs- und Differenzierungsfähigkeit in vitro.
- Alternative: Herstellung von transgenen Mäusen, die ein Stammzell-spezifisches Reportergen enthalten.
 - Isl1 (cardiac), Vav1 (hematopoetic), Nestin (neuronal)

Probleme:

- Identifikation von besseren Markern (Markerkombinationen) zB Lgr5 Dünndarm, Myf5 Myoblasten und Braune Fettzellen
- Identifikation der Nischenbedingungen und Kulturbedingungen
- Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.

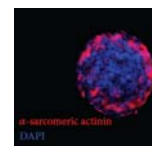
Georg Weitzer



33

1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

- 1.2.2. Isolieren und Kultur gemeinsam mit den Nischenzellen zusammen
- Herstellung von Aggregaten aus nicht definierten Zellpopulationen („outgrowths“)
 - Z.B.: Cardiospheres*, Neurosphären
- Identifikation der Nischenbedingungen und Kulturbedingungen
- Herstellung geklonter Zelllinien der adulten / somatischen Stammzellen.



* Cardiospheres (CSs) are self-assembling multicellular clusters from the cellular outgrowth from cardiac explants cultured in nonadhesive substrates. They contain a core of primitive, proliferating cells, and an outer layer of mesenchymal/stromal cells and differentiating cells that express cardiomyocyte proteins and connexin 43. Because CSs contain both primitive cells and committed progenitors for the three major cell types present in the heart, that is, cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells, and because they are derived from percutaneous endomyocardial biopsies, they represent an attractive cell source for cardiac regeneration. In preclinical studies, CS-derived cells (CDCs) delivered to infarcted hearts resulted in improved cardiac function. CDCs have been tested safely in an initial phase-1 clinical trial in patients after myocardial infarction. Whether or not CDCs are superior to purified populations, for example, c-kit+ cardiac stem cells, or to gene therapy approaches for cardiac regeneration remains to be evaluated.

Aus Human Cardiospheres as a Source of Multipotent Stem and Progenitor Cells
 Lucio Barile, Mihaela Gherhiceanu, Laurențiu M. Popescu, Tiziano Moccetti, and Giuseppe Vassalli
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/916837>

Georg Weitzer



34

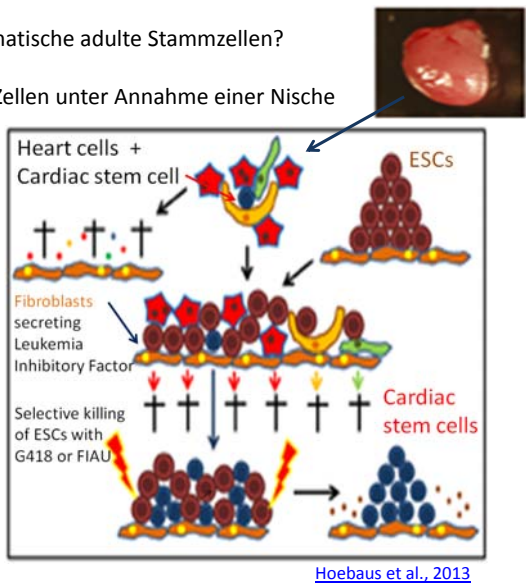
1.2 Isolation oder Herstellung von somatische adulte Stammzellen?

1.2.3. Selektion von proliferierenden Zellen unter Annahme einer Nische

Co-kultur von Geweben mit ESCs und „Nischen Zellen“.

Problem:

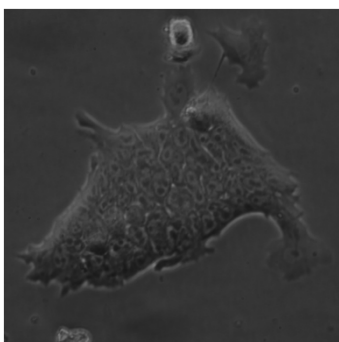
Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Re-programmierung oder Indizierung somatische Stammzellen aus somatischen Herzellen hergestellt wurden.



Hoebaus et al., 2013



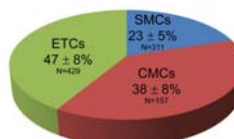
Somatische Stammzellen des Herzens behalten ihr Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial ex vivo, wenn sie in Gegenwart von LIF und mitotisch inaktivierten Fibroblasten (fcs), als Ersatz für die Nische, kultiviert werden.



Eine Kolonie der Cardiovascular Progenitor Cells

Aggregation von Herzstammzellen zu Cardiac bodies

In Abwesenheit von LIF und fcs führt zur Differenzieren zu
 Herzmuskelzellen
 Vaskulären Endothelzellen
 Glatten Muskelzellen
 ? Herzspezifischen Fibroblasten



... aber nie zu Zellen endo- und ectodermalen Ursprungs.



B. Methodische Aspekte der Stammzellforschung - Wie isoliert man oder wie stellt man Stammzellen her?

1. Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere -

Wo liegt der Ursprung von Stammzellen?

1.1. Wie macht man embryonale Stammzellen?

1.2. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen? –

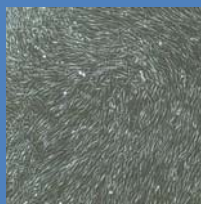
Wo befinden sich die adulten Stammzellen in den Organen?

2. Künstliche Stammzellen

2.1. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?

2.2. Wie macht man geklonte Stammzellen?

2.1. Herstellen von induzierten pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellen



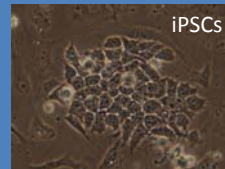
Dermale Fibroblasten aus Biopsie

Stochastic rate limiting deterministic

Phases

Gene, die für die Selbsterneuerung verantwortlich sind.

Gene, die für die somatische Zelle verantwortlich waren.



iPSCs

Herstellung von iPSCs

O...Oct4
K...Klf4
S...Sox2
M...c-Myc

- Lentivirale polycistronische OKSM Vektoren (Yamanaka Faktoren)
- FBx15::EFEG Reporter-Fibroblasten, um entstehende Stammzellen auf finden zu können.
(Fbx15 = Bestandteil des Proteinkomplexes der E3-Ubiquitinligase)
- BAC: Nanog::GFP-IRES-Puro^R in Nanog Reporter-Fibroblasten → Nanog Expression erlaubte erstmals iPSC Mäuse herzustellen. (BAC= Bacterial artificial chromosome aus F1 Plasmid von E. coli hergestellt.)
- Lentivirale OSNL Vektoren N...Nanog
L...Lin28
- Reprogrammieren nur mit Proteinen, RNA, kleinen synthetischen Molekülen. → z.B.: RepSox
.....alles sehr ineffizient!
- *stimulus-triggered acquisition of pluripotency cells* (STAP-Zellen) = S-iPSCs (stress induced) , Zitronensäure oder Mycobacterium laprae induzierte Reprogrammierung.
- c-iPSCs (pure chemically induced iPSCs, 2016, 7 Chemikalien reiche aus!)

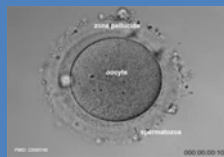
iPSC - Probleme

- Effizienz < 0,1%
- Reprogrammierung nicht vollständig oder nicht stabil → „Epigenetisches Gedächtnis der iPSCs“
- Spätere Tumorbildung c-Myc, Lentivirus Reaktivierung
- Reaktivierung der Transgene

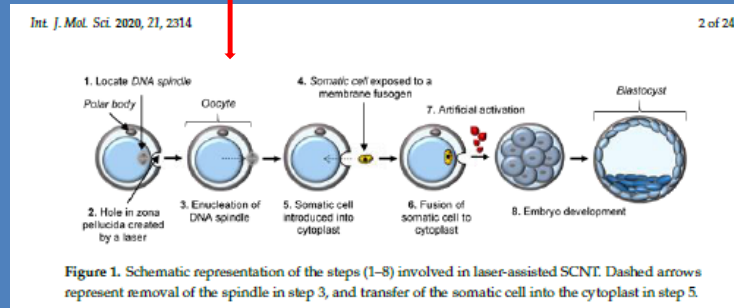
iPSC-Anwendungsmöglichkeiten

- Herstellung von patientenspezifischen iPSCs
 - Erforschung von Ursachen und Therapiemöglichkeiten von Krankheiten polygenetischen Ursprungs.
- Verwendung dieser Zellen zum Auffinden neuer Krankheits- oder Patienten-spezifischer Medikamente.
- Entwicklung von alternative Strategien zur **direkten programmierten Transdifferenzierung** von einem somatischen Zelltyp in einen anderen. z.B. Herzzellen und Leberzellen aus Fibroblasten

2.2. Herstellen von geklonten (durch somatischen Kerntransfer hergestellten) Stammzellen aus somatischen Zellen (Siehe IVF (Kapitel 2.2.3.))



Äußerst komplexes Zusatzregiem von >8 Chemikalien notwendig. z.B.: Cytokalin B , Ionomycin, Koffein



Kritische Parameter für den Kerntransfer

1. Extranukleare Bestandteile des somatischen Kerns stören

Hyaluronidase Behandlung, um die Cumulus Zellen zu entfernen; Proteolytische Behandlung der Kerne.

2. Mechanische Beschädigung des Oozyten

5µg/ml Cytochalasin B (Inhibiert Aktin Filament Bildung); Zellfusion mittels Hemagglutinating virus of Japan

3. Oozyten Aktivierung statt Befruchtung funktioniert bei H. sapiens nicht.

Ionomycin (Ca⁺⁺-Ionophor + 2mM 6-DMAP (Kinase inhibitor); Nocodazole

4. Meiose II Metaphase in H. sapiens ist instabil.

Inhibierung der Histondeacetylaseaktivität mittels 10nM Trichostantin A für 12 h. + Koffein

5. Phase des Zellzyklus des somatischen Kerns entscheidend.

G0 / G1 Arrest mit 3-5 % FCS für 3 Tage vor Kerntransfer. 5% Serum, Nocodazole

Spekulationen was man mit SCNT beim Menschen alles machen könnte.

- Austausch von Mitochondrien mit defekten Genom.
- (Mts haben 37 Gene und über 250 Mutationen sind bereits bekannt.)
 - Durch Spindeltransfer
 - Durch Pronukleustransfer („Drei-Patienten-IVF“)
 - Durch Polarkörperchentransfer („Kinder für alte Frauen (<45a) aus jungen Oozyten.“)

Theoretisch möglich:

- Zeugung von Mädchen durch zwei Frauen
- Zeugung von Kindern durch zwei Männer

Vergleich ntESCs mit iPSCs

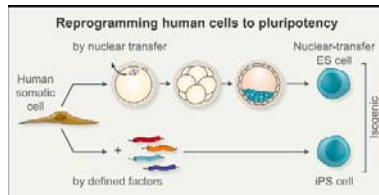
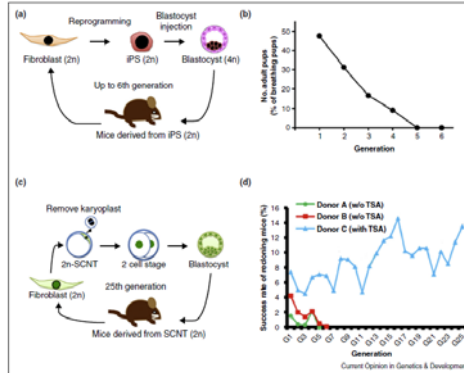


Figure 2



Es bedarf noch sehr viel Forschung zur Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie der iPSC Herstellung!

Propagation of mice by reprogramming. (a) Schematic of successive rounds of iPS reprogramming and injection into tetraploid blastocysts to generate all-iPS mice. (b) The percentage of live-born all-iPS pups that reached adulthood (from D17.5). (c) Schematic of repeated rounds of SCNT, followed by foster embryo transfer and generation of cloned mice. (d) The success rate of mouse reprogramming in each generation with or without the use of trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor during nuclear transfer (adapted from [31]).

C. Anwendungen der Stammzellbiologie – Was kann man mit Stammzellen machen?

1. In der Forschung (Molekularbiologie und Entwicklungsbiologie)
 - 1.1 In vitro Differenzierung von Stammzellen - Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
 - 1.1.1 Was sind Embryoid Bodies?
 - 1.1.2 Was sind Organoide?
 - 1.1.3 Was sind Gastruloide? - Autonome Morphogenese
 - 1.2. Was sind chimäre und transgene Mäuse?
 - 1.3. Beweis der Stammzeleigenschaften – Welche Experimente erlauben es Stammzeleigenschaften zu definieren?
2. In der Biotechnologie und Medizin
 - 2.1 Stammzellen für die Diagnostik
 - 2.2. Stammzellen-Therapien
 - 2.3. Die damit verbundene ethische Problematik