

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 (und das Herstellen von transgenen Mäusen)**
- 2.5. Herstellen von geklonten Embryonen für die Isolierung von ESCs

2.4. Pluripotenzbeweise (und das Herstellen von transgenen Mäusen)

2.4.1. Blastozyst ESC Injection

2.4.2. Tetraploidaggregation

2.4.3. Chimeraformation

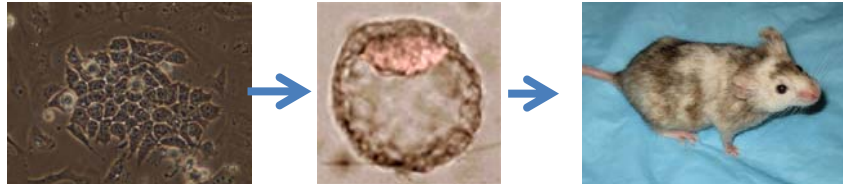
2.4.4. Teratomaformation

2.4.5. Embryoid body formation (and Organoid culture)

(= 5. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?)

2.4. Pluripotenzbeweise und Herstellung von Transgenen Mäusen

2.4.1. Blastozyst ESC Injection



Herstellung von transgenen ESCs durch Pronukleus-Injektion von DNA oder durch Homologe Rekombination mit Vektor DNA.
 → Heterozygot transgene ESCs durch Intrachromosomale Rekombination
 → homozygote transgene ESCs.

Injektion von Transgenen ESCs

Chimäre Maus:
 Keimbahntransmission:
 F1 = heterozygot
 F2 = homozygot

Georg Weitzer

 MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



3

Für die Einführung von Mutationen in Gene der ESCs werden folgende Selektionsmarker verwendet:

The most widely used selection agents for transfected mammalian cells are the resistance genes Neo^R, Hyg^R and Puro^R, respectively.

G418 Sulfate: An aminoglycoside antibiotic similar to gentamycin. Toxic to bacteria, yeast, higher plant and mammalian cells in addition to protozoans and helminths.
 neo^R: **aminoglycoside 3'-phosphotransferase**

Hygromycin B: An aminoglycoside antibiotic that inhibits protein synthesis in bacteria, fungi and higher eukaryotes.
 hyg^R: **aminocyclitol phosphotransferase**

Puromycin dihydrochloride: A broad spectrum antibiotic that inhibits protein synthesis in both prokaryotic and eukaryotic organisms.
 puro^R: **puromycin-N-acetyltransferase**

Georg Weitzer

 MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



4

2.4. Pluripotenzbeweise (und das Herstellen von transgenen Mäusen)

2.4.1. Blastozyst ESC Injection

2.4.2. Tetraploidaggregation

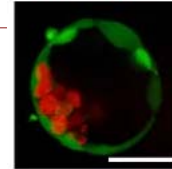
TS cells = 4N
ES cells = 2N

Zygoten → 2Blastula Stadium → Elektrofusion: 4n Zygote → Morula

Sandwich aus 4N-Molula - zu testende ESCs oder iPSCs - 4N-Molula

→ Blastocyst; besteht nur aus 4N Trophektoderm und 2N ICM

Einpflanzen in pseudoschwangere Maus → 100%-ige ESC-abstammende Maus in F0



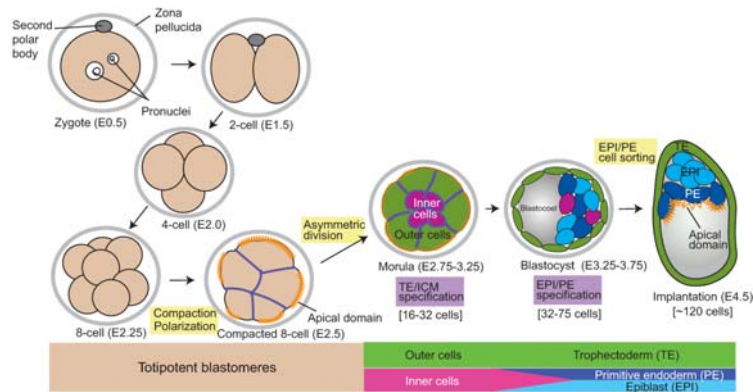
<https://www.catsmouse.de/warum-cats-mouse/inhaltsstoffe/>



5

Georg Weitzer

Zur Erinnerung an Kapitel 2.1. Embryogenes



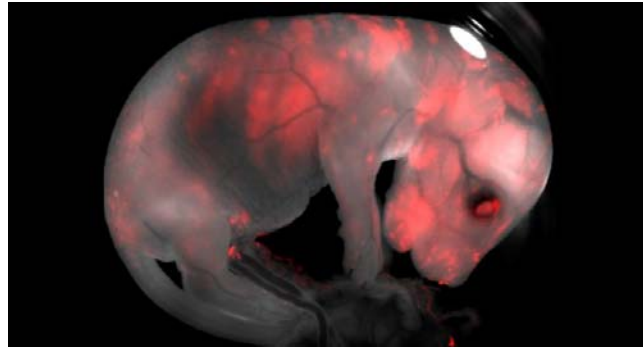
<https://www.semanticscholar.org/paper/Lineage-specification-in-the-mouse-preimplantation-Chazaud-Yamanaka>

2.4. Pluripotenzbeweise (und das Herstellen von transgenen Mäusen)

2.4.1. Blastozyst ESC Injection

2.4.2. Tetraploidaggregation

2.4.3. Chimeraformation = tierische Blastozysten Injektion mit hESCs



Georg Weitzer

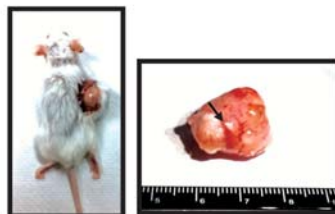
2.4. Pluripotenzbeweise (und das Herstellen von transgenen Mäusen)

2.4.1. Blastozyst ESC Injection

2.4.2. Tetraploidaggregation

2.4.3. Chimeraformation

2.4.4. Teratomaformation: Subkutane Injektion von großen Mengen an ESCs.



→ Histologische Analyse des Tumors

Teratoma formation is a key indicator of pluripotency
cells from all three germ layers are formed

<https://slideplayer.com/slide/10105550/>

Georg Weitzer

2.4. Pluripotenzbeweise (und das Herstellen von transgenen Mäusen)

2.4.1. Blastozyst ESC Injection

2.4.2. Tetraploidaggregation

2.4.3. Chimeraformation

2.4.4. Teratomaformation

2.4.5. Embryoid body formation (and organoid culture)

Die Aggregation von ESCs = 5. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?)

2.4.5. Embryoid body formation (and organoid culture)

– durch Aggregation von ESCs, iPSCs oder ntESCs

- Aggregation von ca. 800 ESCs zu Embryoid Bodies (EBs) in Tropfen für 4.5 Tage löst Gastrulations-ähnliche Prozesse aus.
- Transfer der EBs auf extrazelluläre Matrix (EMC)- Surrogat = Gelatine am Tag 4.5 löst Implantations-ähnliche Prozesse und weitere Differenzierung der ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Zelltypen aus.
- Alle Zellarten des Säugetierkörpers können zwischen Tag 6 und ca. 50 entstehen.

ZB: Herzzellen entstehen ab Tag 7

Neuronen entstehen ab Tag10

Glatte Muskelzellen entstehen ab Tag 15

Die in vitro Differenzierung von Stammzellen zu Embryoid Bodies

– ein Modell für die frühe Embryogenese?

Wie entstehen somatische Zellen in Embryoid Bodies?

Ist die Gastrulation chaotisch, oder gibt es reproduzierbare morphologische Strukturen?

Vergleich der Entwicklungsabschnitte in vivo und in vitro

In der Maus

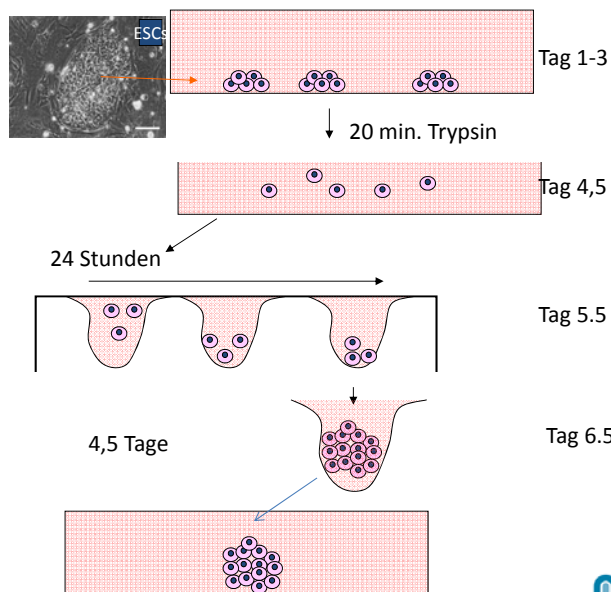
6.1.1 Pre-implantations Entwicklung: Tag 0 - 4

6.1.2 Pre-gastrulations Entwicklung : Tag 4 - 7

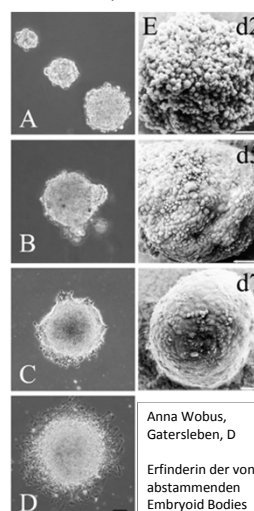
6.1.3 Gastrulation / Keimblattbildung: Tag 7 - 9...

Georg Weitzer

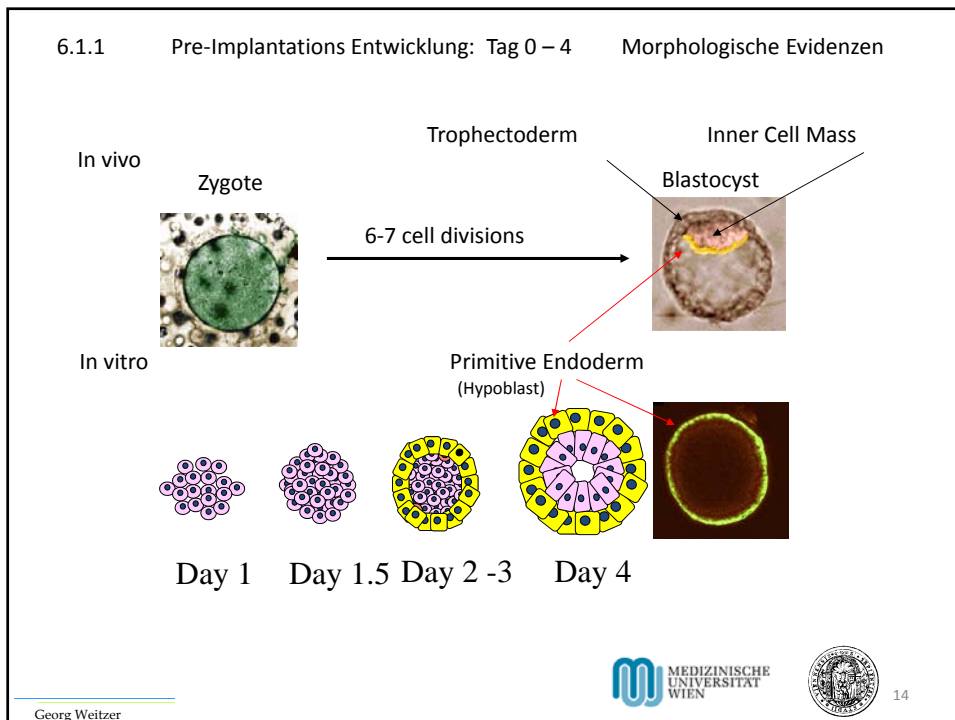
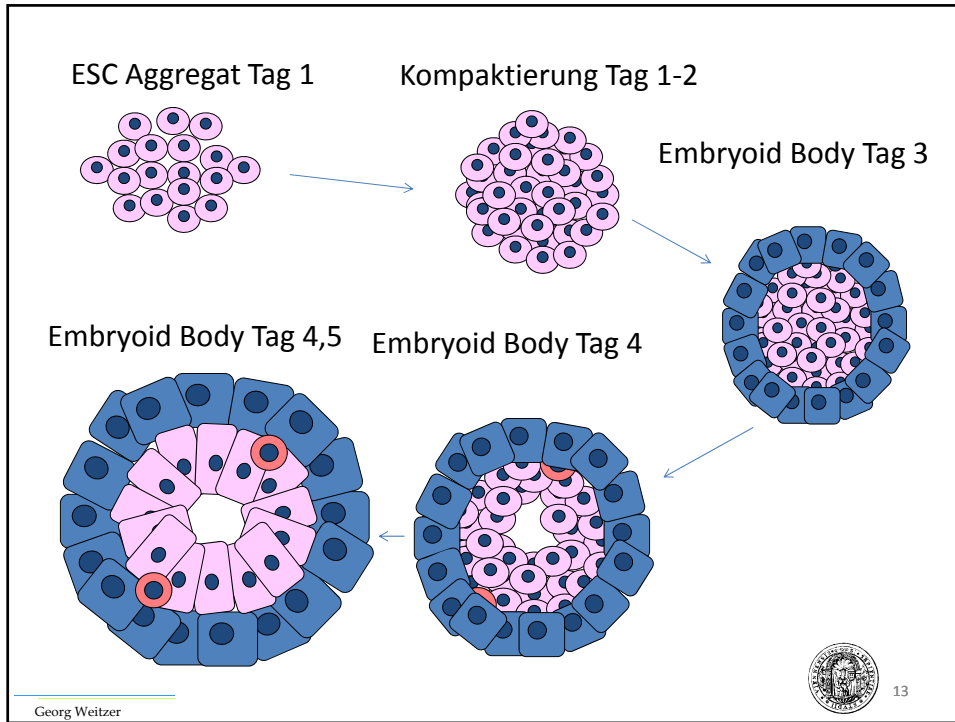
Herstellung von Embryoid Bodies



Embryoid Bodies

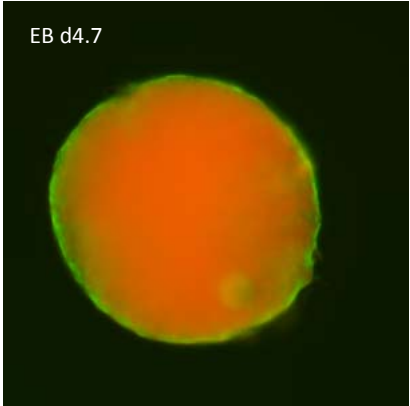


Georg Weitzer

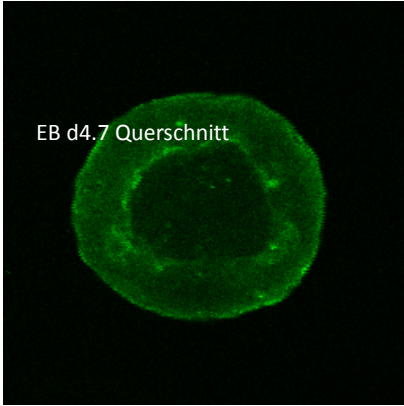


Quelle:CDvor2000

EB d4.7





EB d4.7 Querschnitt



Der Hypoblast und Epiblast bildet sich, aber kein Trophektoderm.

Embryoid Bodies verhalten sich wie die Innere Zellmasse.


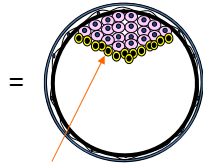
Kompaktierung der ESCs kann nicht wirklich mit der Kompaktierung der Blastomere verglichen werden.

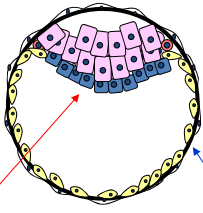


15

Georg Weitzer

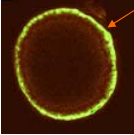
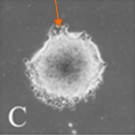
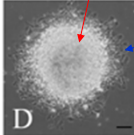
6.1.2. Pre-gastrulations Entwicklung: Day 4-7 Morphologische Evidenzen


In vivo
Implantation


=






In vitro
Primitive Endoderm
Visceral Endoderm
Parietal Endoderm

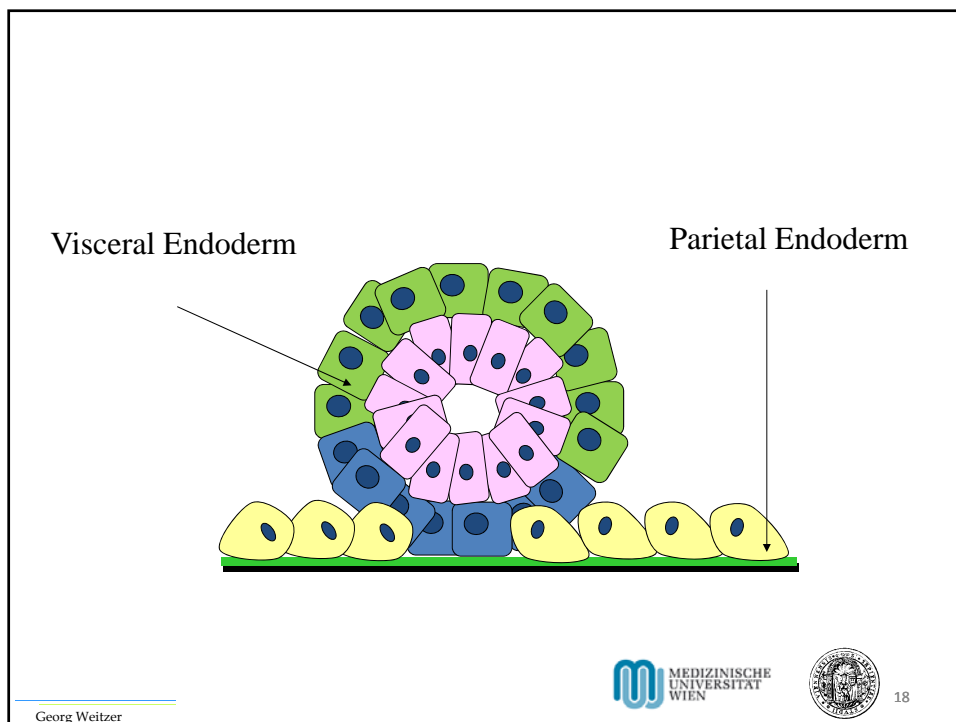
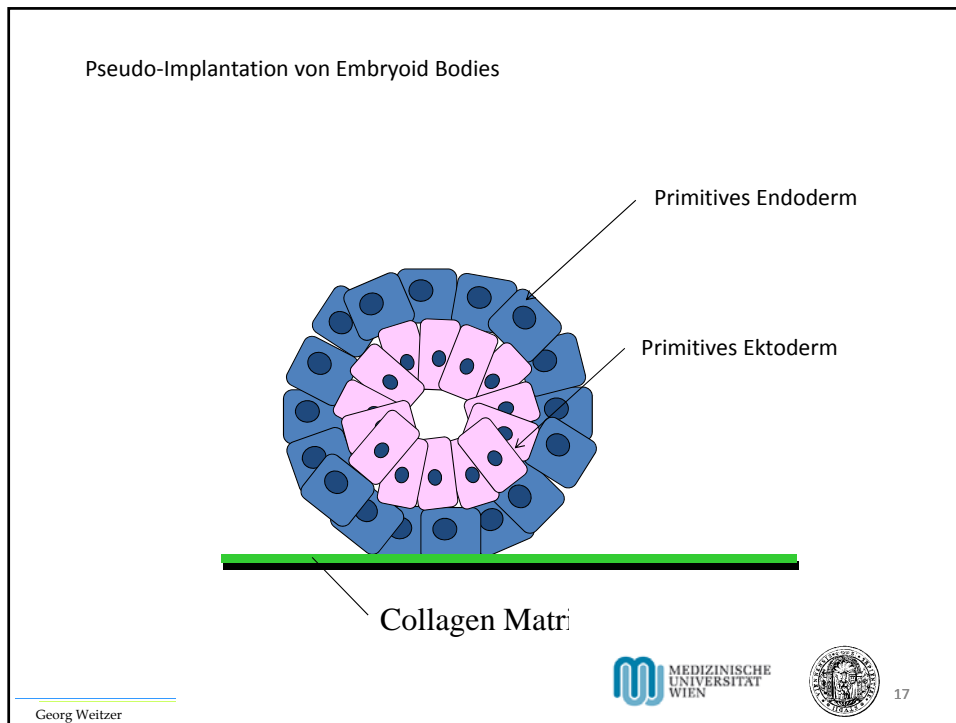

C

D


Embryoid Bodies
Pseudo-Implantation


16



16

Georg Weitzer



6.1.1 Pre-Implantations Entwicklung: Tag 0 – 4 Morphologische Evidenzen

In vitro

Visceral Endoderm

Parietal Endoderm

Dolichos biflorus agglutinin

Pseudo-implantation

β -catenin

➔ Extra-embryonales Gewebe bildet sich genau so, wie um den Embryo.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

19

Primitives Ektoderm

Mesoderm

Definitives Endoderm

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

20

Egg cylinder stage embryo
 Trophectoderm Reichert's membrane
 Proamniotic cavity
 Blastocoel
 culture medium
 Visceral endoderm
 Parietal endoderm
Day 7 embryo body
 collagen coated plastic

Ist die Entstehung der somatischen Zellen während der Gastrulation chaotisch?

Georg Weitzer MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN 21

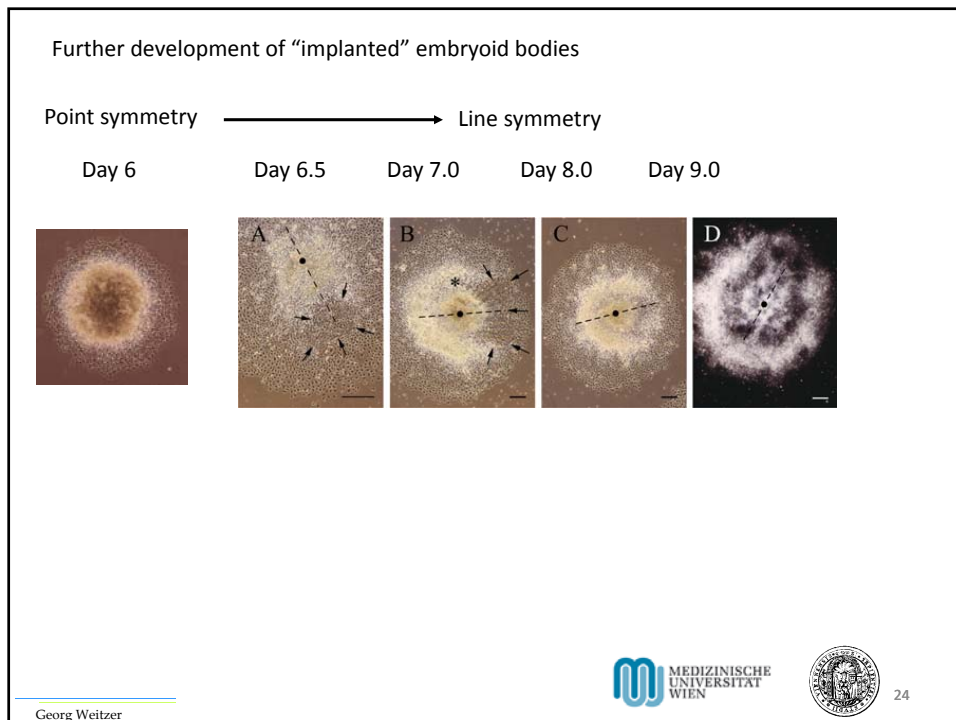
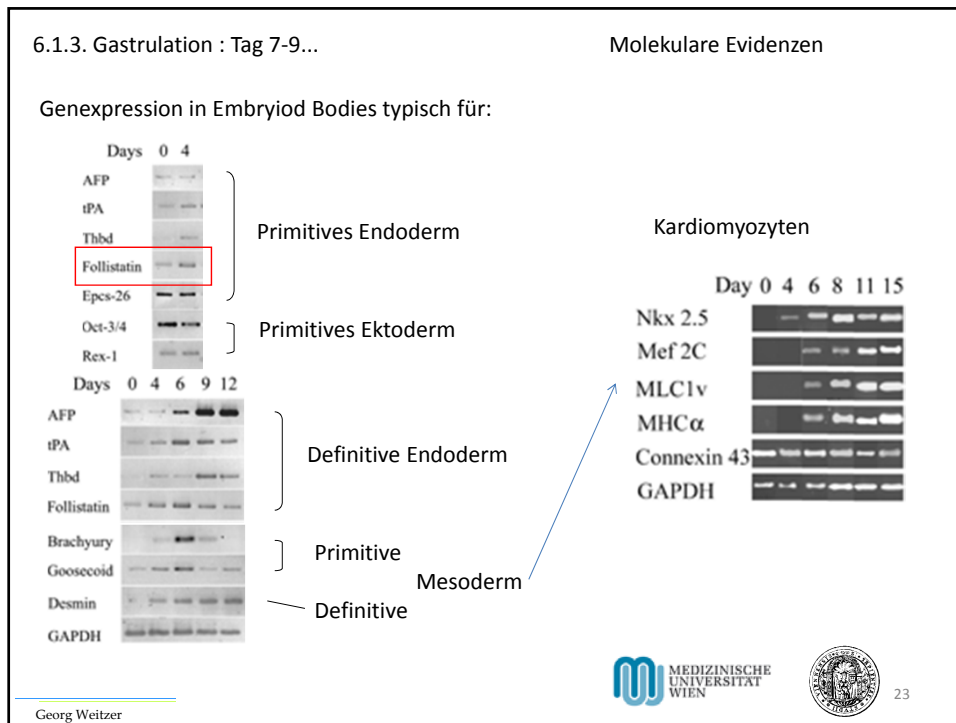
6.1.3. Gastrulation : Tag 7-9... Morphologische Evidenzen

In vivo

Egg cylinder stage	Primitive streak stage	Head fold stage
In vitro Prim. Ectoderm	Primitive Mesoderm	Cardiocytes
Embryoid Body Day 5	Day 6 (T ⁺ Zellen)	Erythrozyten Day 8

Der zeitliche Ablauf der Keimblattentwicklung in vitro ist gleich wie bei der Gastrulation in vivo.

Georg Weitzer MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN 22



Mesodermbildung in Embryoid Bodies

Primitve Mesoderm

Cardiomyocyt

Brachyury

MHC α

Braking line symmetry

Area where mesodermal cells emerge

left right

upper lower

In 65 +/- 7 % der Embryoid Bodies beginnen die ersten Kardiomyozyten „links unten“ zu schlagen! (N= 349)

Embryoid Bodies sind asymmetrisch!

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

25

Anwendungsmöglichkeiten:

Murine Embryo, day 7

Blastocyst, day 3.5

Embryonic Stem Cells

Embryoid Body, day 7

In vivo

In vitro

Embryoid bodies erlauben eine relative einfache Bestimmung der Potentialität von Stammzellen

Die Untersuchung von molekularen und zellulären Prozessen während der Embryogenese, die experimentell im Embryo nicht erfassbar sind.

Herstellung somatischer Zellen für die Therapie

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

26

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**
- am Beispiel des Menschen

Georg Weitzer



27

Zur Erinnerung: 1.7.Somatic cell nuclear transfer (SCNT) = Klonen

- 1981 Somatic cell nuclear transfer (SCNT) bei der Maus durch [Karl Illmensee](#); Genf (war nicht reproduzierbar)
- 1991 1. klonierte Maus aus einem Blastomerenkern
- 1997 **1. Schaf, Ian Wilmut** aber: [Keith Campbell](#); Roslin Institute, Edinburgh, Scotland
(Dolly lebte nur 7 Jahre, Lebenserwartung bei Schafen 12 Jahre)
- 1998: 8 Kühe geboren, [Yukio Tsunoda](#), Nara, Japan
- 1998 **1. Maus, Cumulina, R. Yanagimachi**, Hawaii, USA
- 2000 1. Schwein, [H. S. Campell](#), UK
- 2002 1. Katze, *CC* (für *Carbon copy*), College Station, Texas. Epigenetik und Umwelt ergaben "ganz anderes Tier"
- 2004 1. humane Klone bis zum Blastozystenstadium [Hwang Woo-suk](#), Südkorea
(Sehr wahrscheinlich Betrug, aber Partenogenese dürfte erstmals bei menschlichen Eiern ex vivo funktioniert haben.)
- 2007 1. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) beim Rhesus Affen (Macaca Mulatta) Shoukhrat Mitalipov**
- 2013 1. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) beim Menschen** (Kerne aus Kinderzellen) [Shoukhrat Mitalipov](#)
Oregon, USA
- 2014 1. erfolgreicher SCNT mit humanen Zellkernen von Erwachsenen von [Dieter Egli](#), NY und bestätigt durch [Dong Ryul Lee](#), Südkorea
- 2014 1. reproduktives Klonen von Menschen (nicht erfolgreich), [Robert Lanza](#), Advanced Cell Technology (ACT), USA 2015 ntESCs werden wegen fremder Mitochondrien abgestoßen; [Sonja Schrepfer](#); Hamburg
- 2017 Nachweis, dass SCNT mit Gentherapie kombinierbar ist. Diabetische Maus nicht mehr Insulinpflichtig, [Dieter Egli](#)
- 2017 hSCNTEs sind hiPSCs sehr ähnlich! ([Josef Wu Lab](#))
- 2018 **1. geklonte Affen geboren (Zhen et al., 2018).**

Bis 10/2019: 33 Publikationen in denen SCNT mit Gentherapie verbunden wurden.

Weiters wurden bis heute das Dromedar, die Ziege und Büffel geklont.

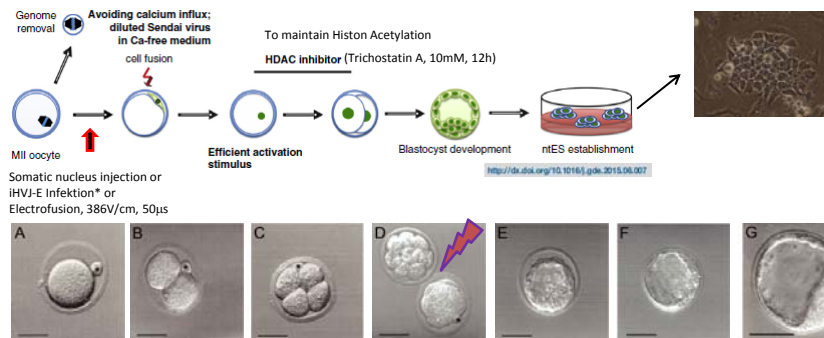


28

Georg Weitzer

2.3 Herstellen von geklonten Embryonen für die Herstellung von ESCs

Wie IVF, aber unter Bedingungen, die Mitose des somatischen Kernes in der Zygote erlauben und die Zytokinese der Blastomeren unterstützen.



Im Gegensatz zum erfolgreichen SCNT bei *Macaca mullata* (Rhesusaffe) [\(Bryne et al., 2007\)](#), starben *Homo sapiens* Embryonen immer im Morula Stadium.

*Inaktivierter Hemagglutinating virus of Japan type E (HVJ-E) führt zur Fusion von Somatischen Zellen und *M. mullata* Oozyten (100%). – wenn Kerne in G0/G1 Phase!

Georg Weitzer