

Wir suchen für Mitte 2023 eine*n
Studierende*n die/der seine
Masterarbeit bei uns machen will.

Anfragen ab sofort persönlich (bitte
keine Emails) in meinem Büro 2.118
oder Labor 2.522.

**Einführung in die Stammzell- und
Embryonenforschung II
(ESF-II/9) WS2022/23**

Zur Herstellen von Lebewesen aus einer Stammzelle

**Biologische Grundlagen – Stand der Forschung – Gesellschaftliche
Auswirkungen**

6. Doppelstunde

Wiederholung der 5DSt: Entstehung der PGCs:

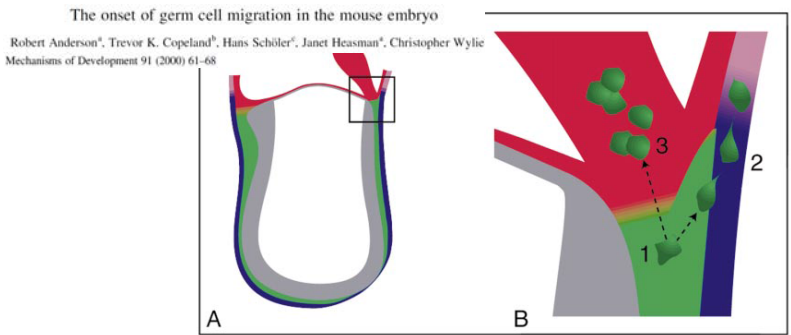
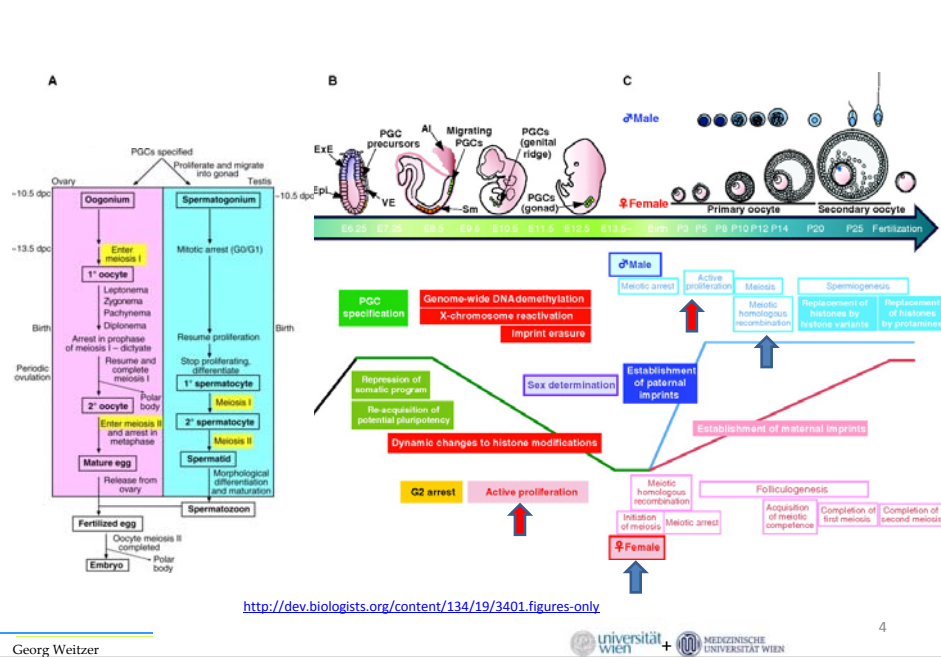


fig. 7. A model of PGC formation and behavior. (A) PGCs arise in mouse embryos on the 7th day of development, (B) in the region of the posterior primitive streak. (1) PGCs and cells of the proximal allantois arise from a common precursor (Lawson and Hage, 1994). (2) In the ventral posterior primitive streak, PGCs differentiate and migrate actively into the endodermal epithelium. (3) Cells of the proximal allantois remain outside of embryo proper, and do not contribute to the germline. Gray, ectoderm; green, mesoderm; red, extraembryonic mesoderm; dark purple, definitive endoderm; light purple, visceral endoderm.

[Link](#)

Wiederholung der 5DSt: Vergleich der Meiose in Keimzellen beider Geschlechter:



Teil 2 Herstellung von Lebewesen - Stand der Forschung (3. bis 6. Doppelstunde)

2.1. Ex vivo Embryonen aus einer pluripotenten Stammzellen

- 2.1.1. Blastozyste - Herstellung von Blastozysten aus Stammzellen
- 2.1.2. Gastruloide – Gastrulation in Stammzellaggregaten
- 2.1.3. Embryoids - Synthetische Embryonen

2.2. Ex vivo Keimzellen aus pluripotenten Stammzellen

- 2.2.1. **Der weibliche und männliche Reproduktionszyklus** in vivo und **ex vivo**
- 2.2.2. Herstellung von Zygoten - In vitro Fertilisation und Klonen
- 2.2.3. Herstellung von künstlichen Plazenten aus Stammzellen
(siehe auch 2.1.3., 4. Doppelstunde)
- 2.2.4. Herstellung von Mäusen aus Stammzellen in Leihmüttern
(siehe Einleitung zu 2.1.3., 4. Doppelstunde)

30.11.2022

Georg Weitzer Max Perutz Labs Uni Wien und MUW

5

2.2.1.1. Der männliche Reproduktionszyklus ex vivo

2016

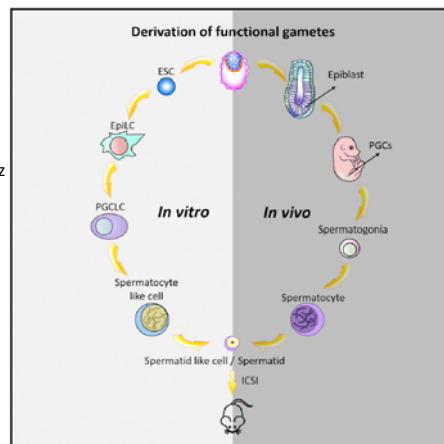
Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. Zhou et al., 2016 *Cell Stem Cell*. 2016 Mar 3;18(3):330-40. doi: 10.1016/j.stem.2016.01.017. Epub 2016 Feb 25.

[In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells.](#) Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, Hayashi K, Nakamura T, Okamoto I, Yamamoto T, Kurimoto K, Shirane K, Sasaki H, Saitou M. *Cell Rep*. 2016 Dec 6;17(10):2789-2804. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.026

In vitro Meiosis:

1. Aufheben des Imprintings
2. Chromosomen Synapsis
3. Rekombination
4. Korrekter 1n Chromosomensatz in den Spermatischen.

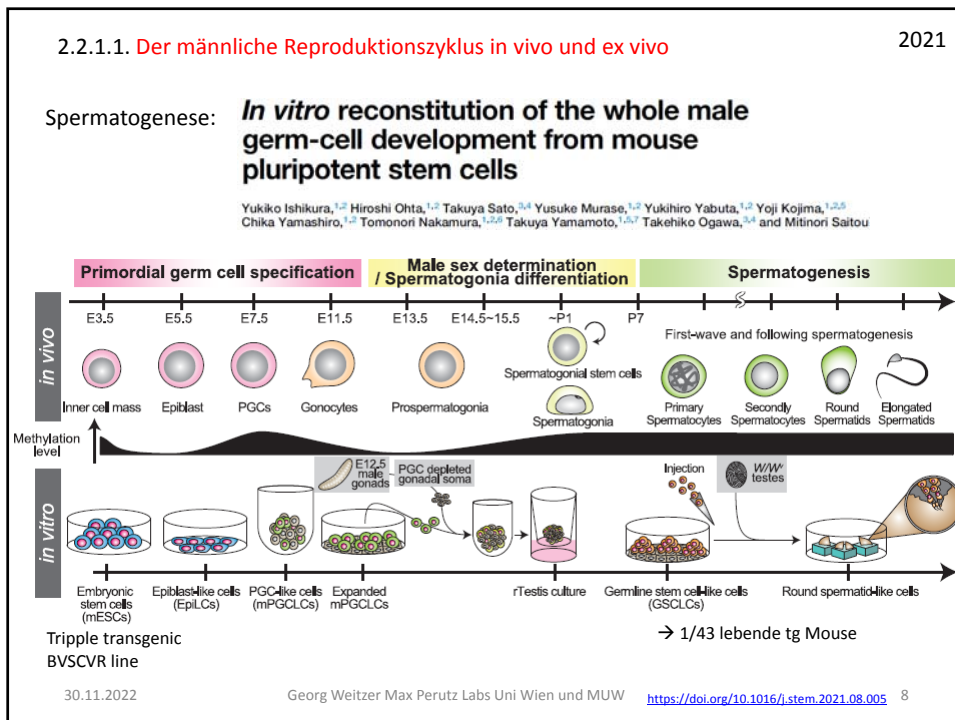
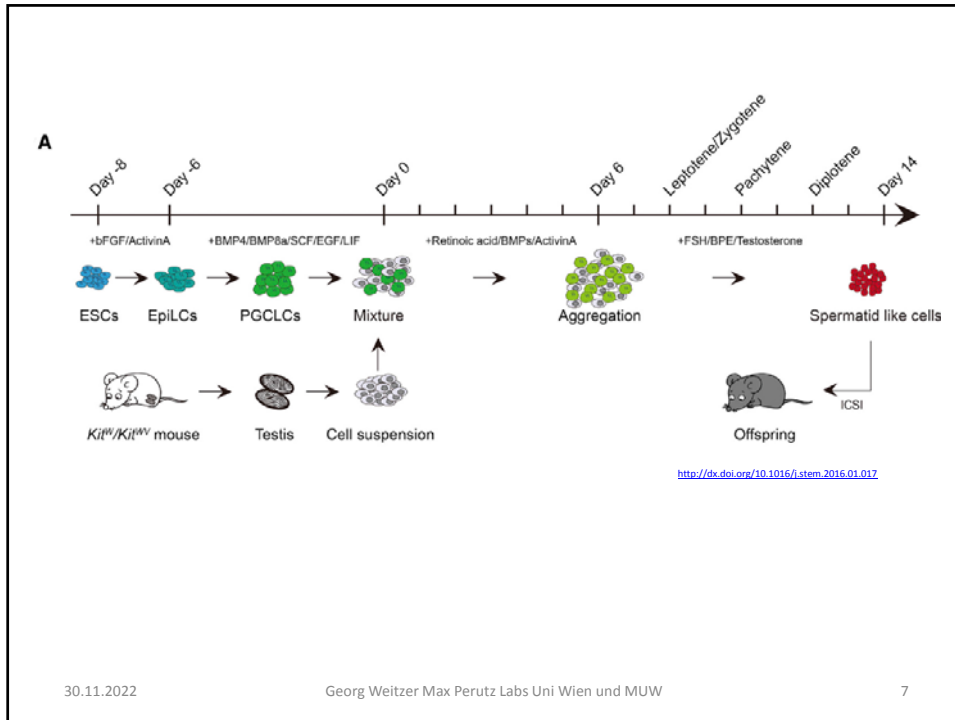
EpiLC, Epiblast like cells
ICSI, intra-cytoplasmic sperm injection

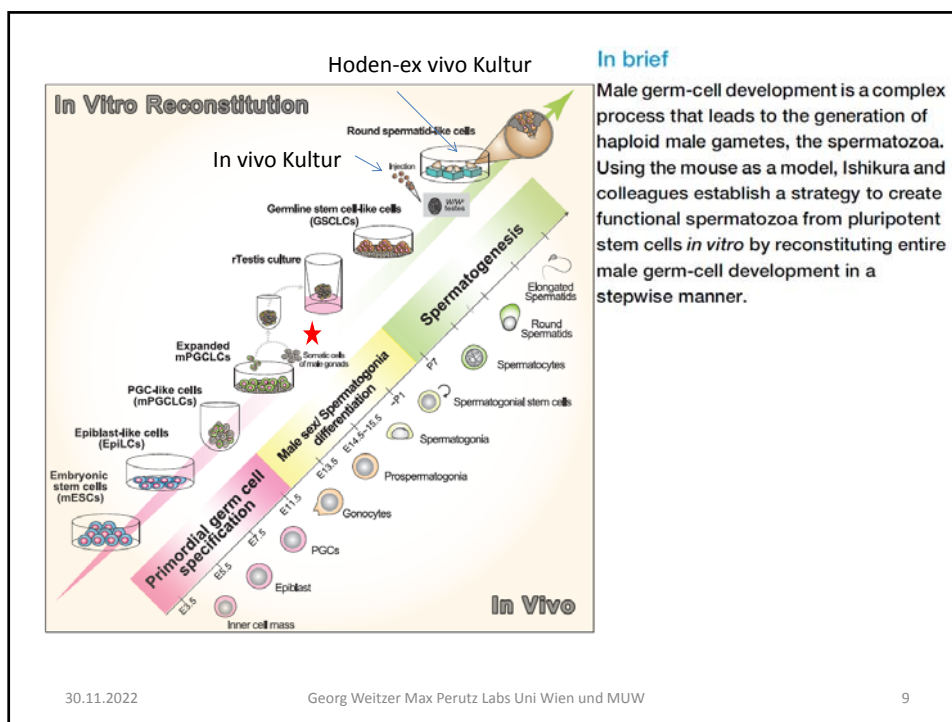


[Link to paper](#)

Georg Weitzer

6





2020

Xu et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2020) 11:408
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01896-0>

Stem Cell Research & Therapy

<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01896-0>

RESEARCH **Open Access**

Derivation and propagation of spermatogonial stem cells from human pluripotent cells

Huiming Xu^{1,2*}, Mengbo Yang¹, Ruhui Tian³, Yonghui Wang¹, Linhong Liu¹, Zijue Zhu³, Shi Yang⁴, Qingqing Yuan¹, Minghui Niu¹, Chencheng Yao³, Erlei Zhi³, Peng Li³, Chenhao Zhou³, Zuping He¹, Zheng Li^{3*} and Wei-Qiang Gao^{1,2*}

Problem: Wie testet man diese Zellen auf Funktionalität?

1. Spermatisid-injektion in humanes Ovum (IVF) oder- SSCs Injektion in den Hoden eines Mannes und Zeugung.
2. In vitro Entwicklung bis zum Blastozysten
3. Einpflanzen des Blastozysten in eine Leihmutter
4. Geburt eines Kindes das eine hPSC als Vater und eine Eispenderin als Mutter hat.

Darf man das einem Mann, einer Frau und einem Kind antun?

30.11.2022 Georg Weitzer Max Perutz Labs Uni Wien und MUW 10

2.2.1.2. Der weibliche Reproduktionszyklus ex vivo

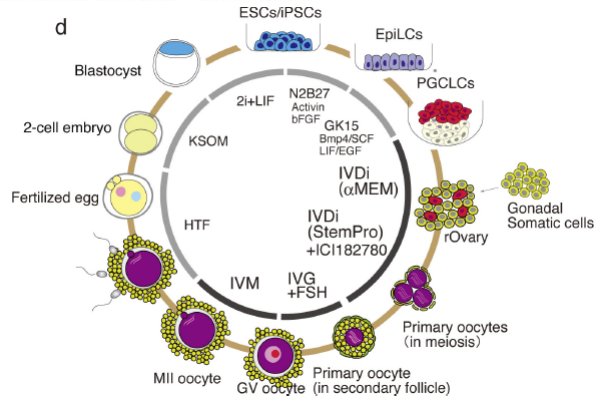
2016

LETTER

doi:10.1038/nature20104

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

Orin Hikiabe^{1*}, Nobuhiko Hamazaki¹, Go Nagamatsu¹, Yuyei Obata², Yuji Hirao³, Norio Hamada^{3,4}, So Shimamoto², Takuya Imamura³, Kinichi Nakashima³, Mitsunori Saitou^{3,4,5,6} & Katsuhiko Hayashi^{1,2*}



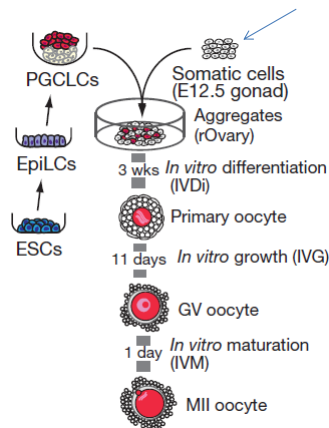
<https://www.nature.com/articles/nature20104>

Georg Weitzer



11

The somatic cells of gonades determine the sex of gametes!

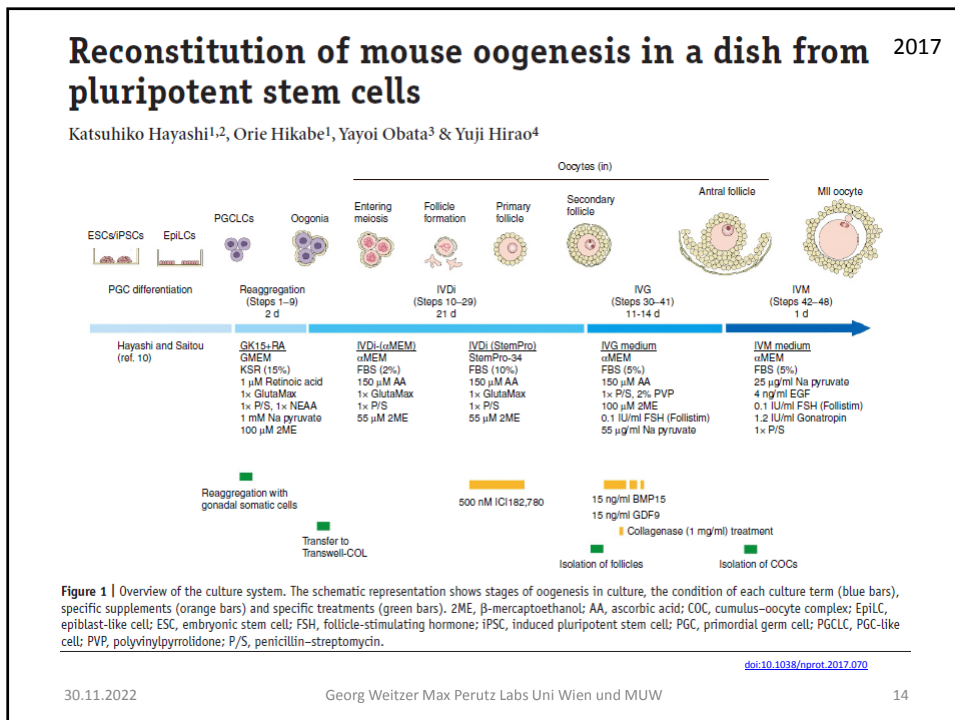
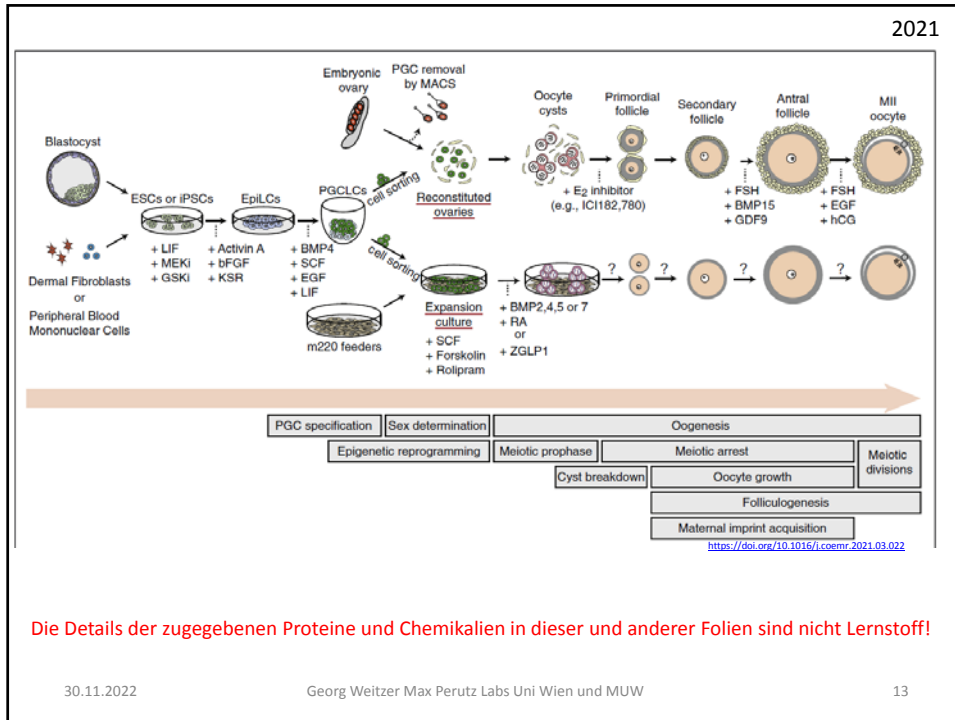


doi:10.1038/nature20104

30.11.2022

Georg Weitzer Max Perutz Labs Uni Wien und MUW

12



Resumée

In vitro Reproduktion von Säugetieren inklusive Homo sapiens

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

Verbleibende Hürden:

1. PCG/Oozyten sowie Spermien Nische derzeit nicht rekonstruierbar.
2. Parakrine, hormonale und epigenetische Regulation nicht durchschaubar.
3. Zeitlicher Rahmen der Entwicklungsschritte ex vivo nicht konsistent (nicht der Natur entsprechend)

Zu beachten:

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

Georg Weitzer



15

Are human oocytes from stem cells next?

[Johan E J Smitz](#) & [Robert B Gilchrist](#)

Nature Biotechnology volume 34, pages 1247–1248 (2016)

2016

Bis

11/2022

nicht geglückt!

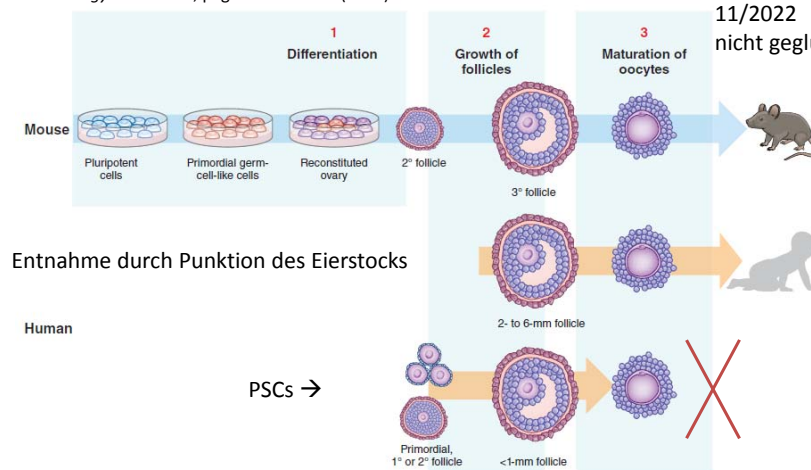


Figure 1 Hikabe *et al.*¹ succeeded in producing mouse oocytes entirely *in vitro* from stem cells. Making human oocytes *in vitro* is likely to be particularly challenging. To date, human pregnancies have been achieved after *in vitro* culture of nearly full-grown oocytes from 2- to 6-mm follicles, but progress in using earlier-stage oocytes has been limited.

Georg Weitzer



16

Human induced pluripotent stem cells and male infertility: an overview of current progress and perspectives

[Fang Fang](#)¹, [Zili Li](#)^{1,2}, [Qian Zhao](#)¹, [Honggang Li](#)¹, [Chengliang Xiong](#) Review. 2018 Feb 1;33(2):188-195. doi: 10.1093/humrep/dex369.

Abstract

Recently, significant progress has been made in ART for the treatment of male infertility. However, current ART has failed to help infertile patients with non-obstructive azoospermia, unless donor sperm is used. In fact, most couples wish to have their own genetically related child. Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) can be generated from patients' somatic cells and in vitro derivation of functional germ cells from patient-specific iPSCs may provide new therapeutic strategies for infertile couples. The overall developmental dynamics of human primordial germ cells are similar to that in mice, but accumulating evidence suggests that there are **crucial differences between human and mouse PGC specification**. Unlike mouse iPSCs (miPSCs) in naive state, hiPSCs exhibit a primed pluripotency which possess less potential for the germ cell fate. Based on research in mice, male germ cells at different stages have been derived from hiPSCs with different protocols, including spontaneous differentiation, overexpression of germ cell regulators, addition of cytokines, co-culture with gonadal cells in vitro and xeno-transplantation. The aim of this review is to summarize the current advances in derivation of male germ cells from hiPSCs and raise the perspectives of hiPSCs in medical application for male infertility, as well as in basic research for male germ cell development.

ART, .Assisted reproductive technologies

Teil 2 Herstellung von Lebewesen - Stand der Forschung (3. bis 6. Doppelstunde)

2.1. Ex vivo Embryonen aus einer pluripotenten Stammzellen

- 2.1.1. Blastoide - Herstellung von Blastozysten aus Stammzellen
- 2.1.2. Gastruloide – Gastrulation in Stammzellaggregaten
- 2.1.3. Embryoids - Synthetische Embryonen

2.2. Ex vivo Keimzellen aus pluripotenten Stammzellen

- 2.2.1. Der weibliche und männliche Reproduktionszyklus in vivo und ex vivo
- 2.2.2. **Herstellung von Zygoten - In vitro Fertilisation und Klonen**
- 2.2.3. Herstellung von künstlichen Plazenten aus Stammzellen
(siehe auch 2.1.3., 4. Doppelstunde)
- 2.2.4. Herstellung von Mäusen aus Stammzellen in Leihmüttern
(siehe Einleitung zu 2.1.3., 4. Doppelstunde)

2.2.2. Herstellung von Zygoten

2.2.2.0. In vitro Fertilisation (IVF) seit 1970 möglich und in ca. 3% der Versuche erfolgreich.

2.2.2.1. Klonen oder Somatic Cell Nucleus Transfer (SCNT)

2.2.2.2. Herstellen von bi-maternalen (parthenogenetischen) und bi-androgenetischen Zygoten und Mäusen (Zur Erforschung der Unterschiede zwischen weiblicher und männlicher epigenetischer Regulation der Keimzellenentwicklung).

Vorgeschichte: Herstellung von haploiden ESCs

2.2.2.2.1. Partenogenetische PSCs → 1n ESCs¹ → PGCs/Keimzellen.

¹Martin Leeb bzw. Ulrich Elling, 2011; hpESC (2016)

2.2.2.2.2. Androgenic PGC-like ahESCs aus Spermien und entkernten Oocyten (2012) →

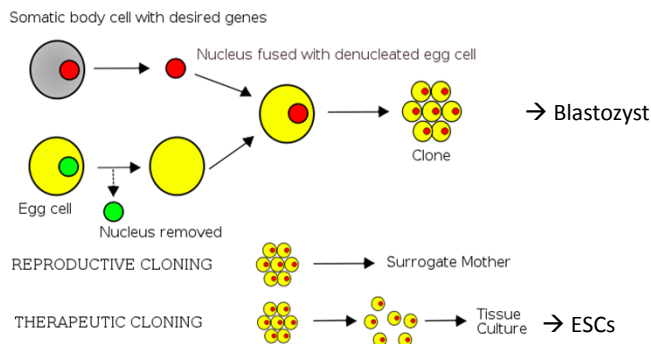
Alle sind 19+X und nicht 19+Y !

Es stellte sich nach der Herstellung von haploiden PSCs heraus, dass sich im Laufe der Kultur derer das Methylierungsmuster der DNA in Richtung dessen, das in Gameten vorgefunden wird, verändert.

2.2.2.1. Alternative zur Herstellung von Gameten: Klonen (SCNT)

Herstellung von Zygoten

- von Schafen 1996 (gefolgt von vielen andere Huftiere → Landwirtschaft, Tierzucht und Arterhaltung)
- Klonen von Mäusen 1972 – 1999 (Igf2 locus imprinting entscheidend)
- Klonen von Menschen 2001 - (2005 Hwang) – 2013 Mitalipov und Co.
- Klonen von hESCs mit homozygoten human leukocyte antigen (HLA) Haplotypus 2020



Auch hier sind die korrekten epigenetischen Modifikationen des Genoms während der Beendigung der Meiose II und der Verschmelzung der maternalen und paternalen Pronuklei entscheidend und Spezies-spezifisch. Z.B.: 3 von den 12 notwendigen Interventionen

- Inhibierung der Histondeacetylaseaktivität mittels 10nM **Trichostantin A** für 12 h ist eine unabdingbare Voraussetzung, dass MII Oocyten sich weiterentwickeln. Nur so kommt es zur Ausbildung eines Pronukleus.
- Ebenso war **Koffein** notwendig, weil wahrscheinlich Koffein die Phosphorylierung von cyclin B inhibiert und CDC2 + cyclin B, wenn phosphoryliert = „Maturation promoting factor“ → Koffein setzt so den „cell cycle checkpoint“ außer Kraft und fördert die Teilung der Zygote in zwei Blastomere.
- „... **H3K27me3** functions as an epigenetic barrier and **Lysin demethylase** KDM6A overexpression improves SCNT efficiency by facilitating transcriptional reprogramming.“ (Zhou, C., Wang, Y., Zhang, J., Su, J., An, Q., Liu, X., Zhang, M., Wang, Y., Liu, J., Zhang, Y. H3K27me3 is an epigenetic barrier while KDM6A overexpression improves nuclear reprogramming efficiency. FASEB J. 2019 Mar;33(3):4638-4652. doi: 10.1096/fj.201801887R)

Klonen von Menschen



PSC derivation efficiency ~9%

Stem Cell Reports

Article

ISSCR

OPEN ACCESS

Cryopreserved Human Oocytes and Cord Blood Cells Can Produce Somatic Cell Nuclear Transfer-Derived Pluripotent Stem Cells with a Homozygous HLA Type

Jeoung Eun Lee,^{1,8} Ji Yoon Lee,^{1,8} Chang-Hwan Park,^{2,8} Jin Hee Eum,³ Soo Kyung Jung,³ A-Reum Han,⁴ Dong-Won Seol,⁴ Jin Saem Lee,⁵ Hyun Soo Shin,⁵ Jung Ho Im,⁷ Taehoon Chun,⁸ Kyungsoo Ha,⁷ Deok Rim Heo,⁷ Tae Ki Yoon,⁸ and Dong Ryul Lee^{1-8*}

Volume 15, Issue 1, 14 July 2020, Pages 171-184

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.05.005>

2.2.2.2. Bi- maternal und Bi- paternale Mäuse 2018

Generation of Bimaternal and Bipaternal Mice from Hypomethylated Haploid ESCs with Imprinting Region DeletionsZhi-Kun Li ⁵Le-Yun Wang ⁵Li-Bin Wang ⁵Wei LiQi Zhou ⁶Bao-Yang Hu [Show all authors Show footnotes](#)Published: October 11, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.004>

← verpflichtet zu lesen!

Highlights

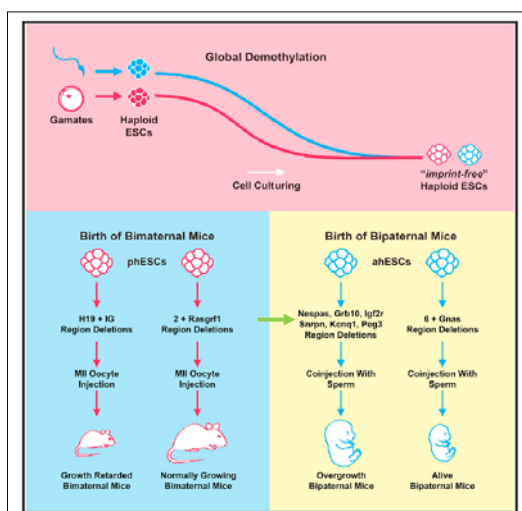
- Haploid ESCs display PGC-like methylation profiles following *in vitro* cultivation
- Parthenogenetic and androgenetic haploid ESCs show different demethylation dynamics
- phESCs carrying 3 deleted imprinting regions support normal growth of bimaternal mice
- ahESCs carrying 7 deleted imprinting regions produce live full-term bipaternal mice

Summary

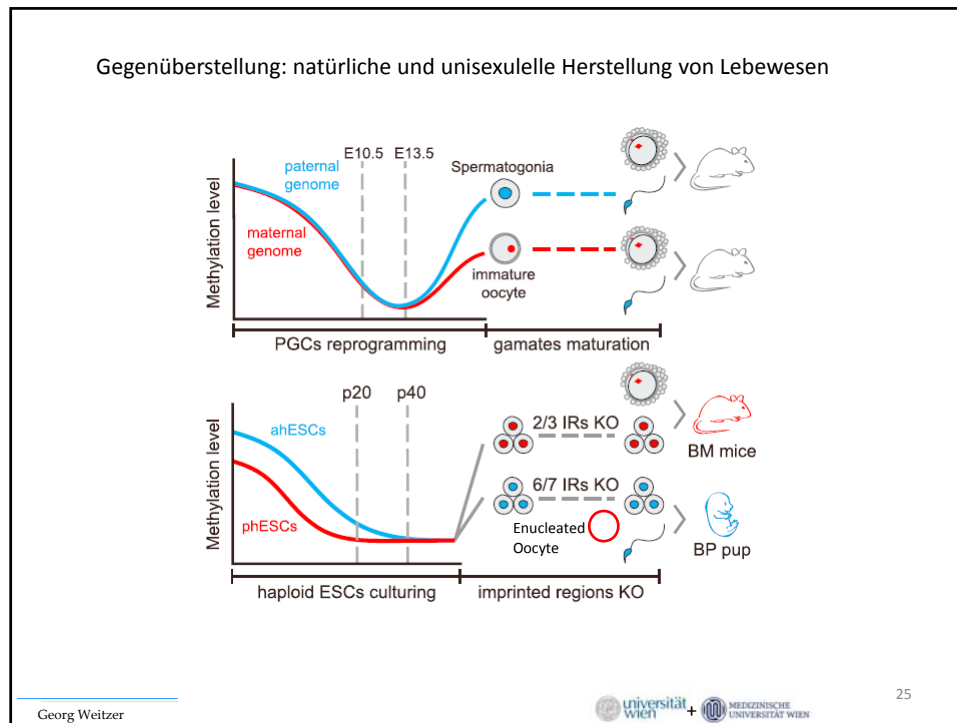
Unisexual reproduction is widespread among lower vertebrates, but not in mammals. Deletion of the H19/Igf2 imprinting region in immature oocytes produced bi-maternal mice with defective growth; however, bi-paternal reproduction has not been previously achieved in mammals. We found that cultured parthenogenetic and androgenetic haploid embryonic stem cells (haESCs) display DNA hypomethylation resembling that of primordial germ cells. Through MII oocyte injection or sperm coinjection with hypomethylated haploid ESCs carrying specific imprinting region deletions, we obtained live bi-maternal and bi-paternal mice. Deletion of 3 imprinting regions in parthenogenetic haploid ESCs restored normal growth of fertile bi-maternal mice, whereas deletion of 7 imprinting regions in androgenetic haploid ESCs enabled production of live bi-paternal mice that died shortly after birth. Phenotypic analyses of organ and body size of these mice support the **genetic conflict theory** of genomic imprinting. Taken together, our results highlight the factors necessary for crossing same-sex reproduction barriers in mammals.

2.2.2.2. Bi- maternal und Bi- paternale Mäuse

2018



→ Injektion eines Kerns einer phESCs in einem MII Oozyten bzw. Ko-injektion eines Kerns einer ahESC gemeinsam mit einem Spermium in einem entkernten MII Oozyten.



Imprinting und „Genetic conflict theory“

Was sind **imprinted genes**?

Regionen auf Genen (derzeit ca. 100 bekannt) die durch epigenetische Mechanismen (hier vor allen die Methylierung von CpG Islands) auf den maternalen oder paternalen Schwesterchromatiden alternativ stillgelegt werden. Vorallem 5mC aber auch 6mA, 4mC, etc.

z.B.: Das Igf2 Gen ist paternal aktiv und maternal inaktiviert. (Xist und H19 umgekehrt) - Dies verhindert eingeschlechtliche Fortpflanzung. - Wenn dennoch uniparentale Disomie auftritt (durch temporäre Trisomie in den Oocyten), kommt es zu Fehlbildungen.

Z.B.: Prader Willi Syndrom durch Verlust eines Teils des paternalen Chromosoms 15, d.h. wenn also in diesem Bereich maternale Disomie* vorliegt. Liegt in demselben Bereich paternale Disomie (oder maternale Mikrodeletionen) vor kommt es zum Angelman Syndrom (siehe auch Wikipedia und UBE-3A Gen in OMIM Datenbank).

*Bei einer **Uniparentale Disomie** stammen beide Chromosomen eines homologen Chromosomenpaares von einem Elternteil.

Imprinting und „Genetic conflict theory“

Allgemein glaubt man folgende „Regel“ zu finden:

Aktive paternale Allele fördern das Wachstum des Embryos (negative Konsequenz: Embryo wird zu groß und schädigt die Mutter). zB Igf

Aktive maternale Allele fördern beschützen die Mutter vor der Ausbeutung durch den Embryo und fördern so das Überleben der Mutter und das Entstehen von mehreren Nachkommen. (negative Konsequenz: Embryonen werden zu klein und verkümmern.) z.B. H19

Diese Befunde führten zur „**Genetischen Konflikttheorie**“ zwischen den Geschlechtern.

Siehe auch Arbeiten von Denise Barlow (1991), Anton Wutz (1998), Martin Leeb (2011) [auch Ulrich Elling mit Josef Penninger]

Zusammenfassung: 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 oder Leihmutter → Embryonal und Fötal Entwicklung → Neugeborenes Lebewesen.

Und

Tg-ESC → Blastozysten → haploide maternale (partenogenetische) und androgenetische
(paternale) phESCs bzw. ahESCs → klonen bzw. intracytoplasmic sperm injection ICSI (ROSI)
→ Neugeborenes Lebewesen

Aber

Dürfen /Sollen wir auch alles machen, was wir können? → 7. DSt

