

6DSt

Georg Weitzer

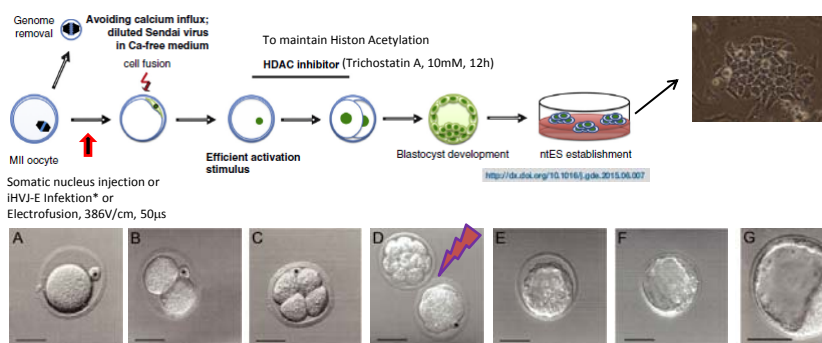
Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. **Wie macht man embryonale Stammzellen?**
3. Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

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!

Kritische Parameter für den Kerntransfer

1. Extranukleare Bestandteile des somatischen Kerns stören
(Somatischer Kern und anhaftendes Soma ist „giftig“; Intermediärfilamente, die an der äußeren Kernmembran über Plectin und Nesprin 3 haften, ebenso das Endoplasmatisches Retikulum).
2. Mechanische Beschädigung des Oozyten
(Möglichst wenig Zytoplasma aus der Eizelle entfernen. Chromosomen assoziiertes Material [Spindelapparat] ist für die Reprogrammierung bzw. Aktivierung des embryonalen genetischen Programmes mitverantwortlich.)
3. Cytoplasten_Aktivierung statt Befruchtung funktioniert bei *H. sapiens* nicht.
(Aktivierung = Aufheben des Metaphase II Blocks und Ausbildung eines weiblichen / somatischen Pronukleus; Bei Tieren reicht Sr^{++} , 7% EtOH, Ionomycin (Ca^{++}), Stromstoß, ...)
4. Meiose II Metaphase in *H. sapiens* ist instabil.
(Meiose hat nicht „genug Zeit“. spezifische Faktoren sind für die Reprogrammierung notwendig.)
5. Phase des Zellzyklus des somatischen Kernen entscheidend.

Was tun? → Tachibana et al., 2013; Cell 153, 1228-1238.

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

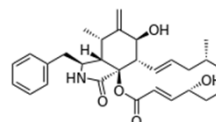
Georg Weitzer

5

Chemikalien die zum erfolgreichen SCNT bei *Homo sapiens* geführt haben.

Cytochalasin B (*Helminthosporium dematioideum*, a fungus)

Cytochalasin B makes the cytoplasm of the oocytes more fluid and makes it possible to aspirate the nuclear genome of the oocyte.



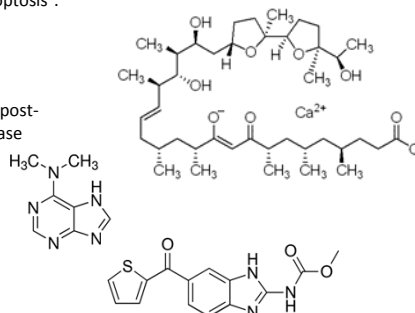
Ionomycin (*Streptomyces conglobatus*)

Reduziert Ca⁺⁺ Konzentration und verhindert die frühzeitige Beendigung der Meiose II. Ist aber auch giftig weil: "Calcium Ionomycin can serve as an inducer of apoptosis".

6-Dimethylaminopurine

(Kinase Inhibitor)

6-DMAP-sensitive kinases are involved in the control of post-fertilization events such as the formation of the interphase network of microtubules, the remodelling of sperm chromatin and pronucleus formation.



Nocodazole (*Streptomyces conglobatus*)

Verhindert die Mikrotubulipolymerisation; löst Apoptose aus.

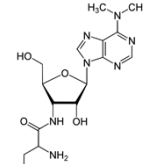
Georg Weitzer

6

Chemikalien die zum erfolgreichen SCNT bei Homo sapiens geführt haben.

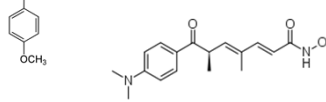
Puromycin

Blockiert die Proteinsynthese.

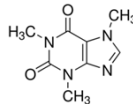


Trichostatin A (*Streptomyces platensis*),

Blockiert selektiv die Klasse I- und Klasse II-[Histon-Deacetylase](#) (HDAC) von Säugetieren.



Koffein (1,3,7-Trimethylxanthine)



Ein Protein phosphatase Inhibitor; erhält die Phosphorylierung von CDC2 + cyclin B = „**Maturation promoting factor**“ and kann den „cell cycle checkpoints“ und „G2 arrest“ nach DNA Beschädigung aufheben.

Hemagglutinating virus of Japan

Zur Fusionierung ganzer somatischer Zellen mit den Oozyten.

→ Es bedarf noch sehr viel Forschung zur Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie der Zygote!

Georg Weitzer

7

Spekulationen was man mit SCNT beim Menschen alles machen können wird.

- 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:

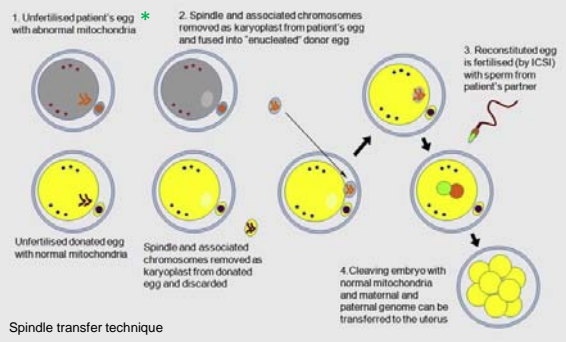
- Zeugung von Mädchen durch zwei Frauen
- Zeugung von Kindern durch zwei Männer

Georg Weitzer ESF-I WS2019

8

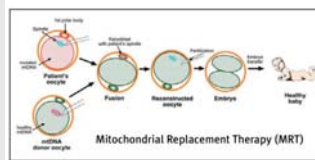
SCNT = Somatic Cell Nuclear Transfer → Weiterentwicklung:

Spindeltransfer = Transfer of a karyoplast from an foreign egg



* Beim SCNT wird statt dem Ei eine somatische Zelle genommen.

Problem: Heteroplasmie!



Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases

Paula Amato, Masahito Tachibana, Michelle Sparman, Shoukhrat Mitalipov
 Fertility and Sterility, Volume 101, Issue 1, 2014, 31 – 35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.030>

Umbenannt in :

Mitochondrial replacement therapy (MRT)

= Reproduktives Klonen von Menschen

SCNT = Somatic Cell Nuclear Transfer → Weiterentwicklung: Pronukleustransfer

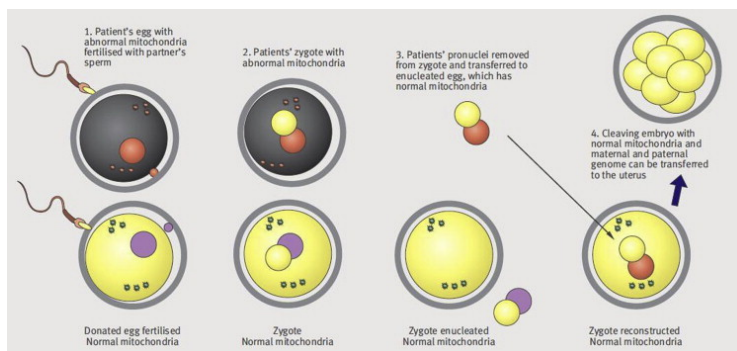


Figure 1 Pronuclear transfer technique.

Gefahrenquellen bei der Zeugung von Kindern mit Hilfe von SCNT

- Ist das Genom der Oozyte identisch mit dem der 1. und 2. Polkörperchen ?
- Welche vielleicht einzigartigen Faktoren im Zytoplasma der gespendeten Oozyte beeinflussen die Embryogenese des Kindes und somit dessen Individualität?
- Ist die Programmierung des Genoms in einer künstlich aktivierten Zygote wirklich vollständig?
- Bewirkt SCNT das gehäufte Auftreten von Mutationen?

Reproduzierbarkeit der Methode

1. Publikation: Alle 4 NT-ESC Linien stammen von einer Eispenderin (A)
1. Wiederholung: Statt fötale Haut-Fibroblasten wurden Fibroblasten eines Kindes mit Leigh Syndrom verwendet (Mitochondrien bedingte Erkrankung).
2. Wiederholung mit Spenderinnen B (15 Oozyten, 4 Blastozysten, 1h ESC Linie) und C (5 Oozyten, 3 Blastozysten, 1 hESC Linie (7% bzw. 20% Ausbeute)
3. Wiederholung: Haut-Fibroblasten von 35 jährigen und 75 jährigen Männern. E 1 hESC Linie (8% bzw. 20% Ausbeute)
4. Wiederholung: 54 Spenderinnen, 3NT-hESCs von Vorhaut-Fibroblasten neugeborener Knaben und 1 NT-hESC von einer Frau mit Diabetes Typ 1 (6% Ausbeute)

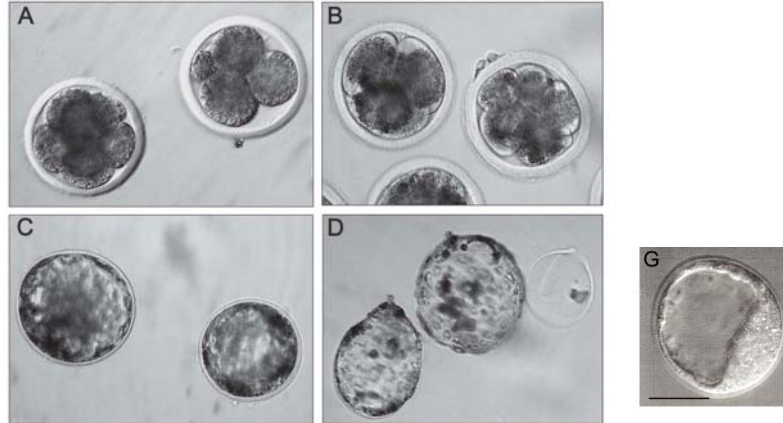
Yamada et al., 2014; Nature 510, 533-536.

Chung et al., 2014; Cell Stem Cell 14, 1-4.

Tachibana et al., 2013; Cell 153, 1228-1238.

Rind-Mensch SCNT Blastozysten

Interspecies-SCNT preimplantation embryos derived from **human granulosa cells** fused with enucleated **bovine oocytes**. Cleavage embryos (A) and blastocysts (C) derived from SCNT. Parthenogenetically developed cleavage embryos (B) and hatching blastocysts (D) as controls. (aus Illmensee K., *J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2007; 4 (1), 6-16)



Georg Weitzer ESF-I WS2019

13

Autoren weiterführender Literatur:

- Shoukhrat Mitalipov
- Dong Ryul Lee
- Dieter Egli
- Rudolph Jaenisch

Georg Weitzer ESF-I WS2019

14

Leigh-Syndrom (engl.: Leigh's disease)

- auch als *Morbus Leigh* oder als [subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie](#) bezeichnet, ist eine Erbkrankheit, die zur Gruppe der so genannten [Mitochondriopathien](#) gehört. Beim Leigh-Syndrom liegt eine Störung des [mitochondrialen](#) Energiestoffwechsels vor. Viele [Kaskaden](#) sind betroffen, besonders die [Pyruvat-Dehydrogenase](#) und die [Cytochrom c Oxidase](#) in der mitochondrialen [Atmungskette](#). Der Erbgang kann [autosomal-rezessiv](#), [X-chromosomal](#)-rezessiv oder **maternal** sein. (Wikipedia)

Embryonen und Stammzellforschung I: Stammzellbiologie

1. Entstehung der Stammzellforschung - Historischer Überblick
2. Wie macht man embryonale Stammzellen?
3. **Wie macht man induzierte pluripotente Stammzellen?**
4. Wie isoliert man somatische adulte Stammzellen?
5. Welche Eigenschaften haben Stammzellen?
6. Wie macht man somatische Zellen aus Stammzellen?
7. Stammzellen in der Medizin und die damit verbundene ethische Problematik.
8. Neue Herausforderungen in der Grundlagenforschung zur Stammzellbiologie.

Herstellung von iPSCs

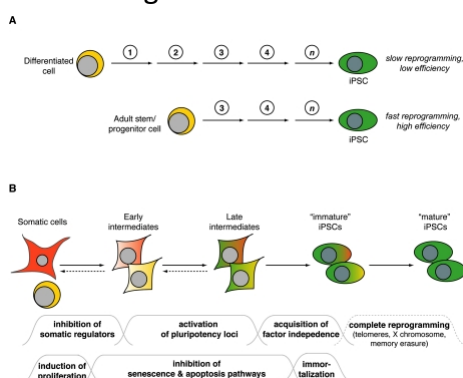
O...Oct4
K...Klf4
S...Sox2
M...c-Myc

- Lentivirale polycistronische OKSM Vektoren
- FBx15::EGFP 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 PSCs, 2016, 7 Chemikalien reiche aus!)

Georg Weitzer ESF-I WS2019

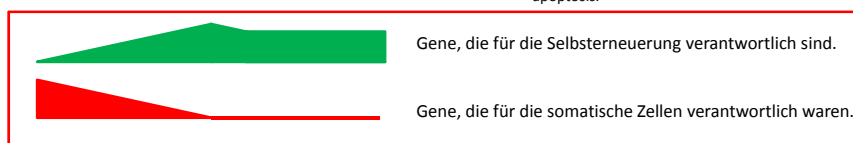
17

Herstellung von iPSCs



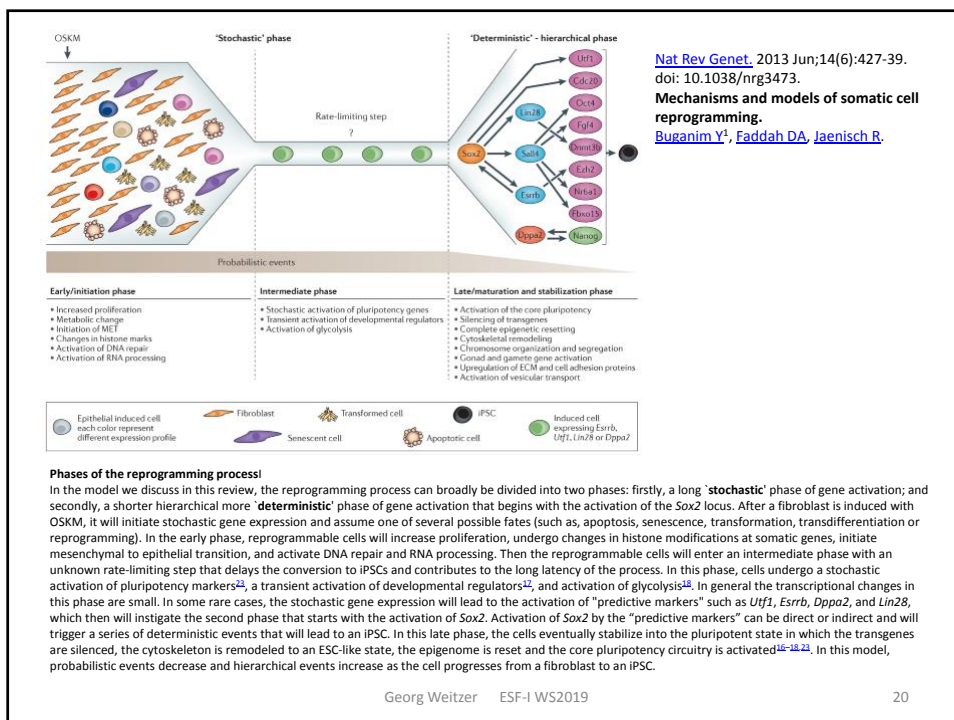
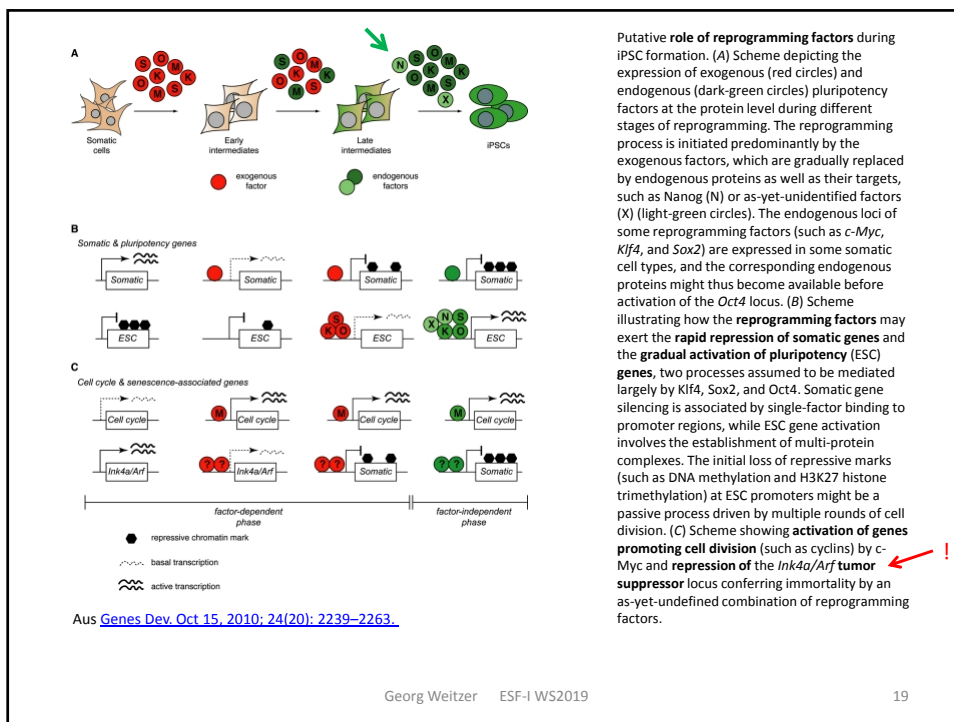
Aus [Genes Dev. Oct 15, 2010; 24\(20\): 2239-2263.](#)

Models of cellular reprogramming. (A) Mature cells, such as lymphocytes, reprogram into iPSCs at lower efficiencies than immature cells, such as hematopoietic stem cells. This may be due to a lower number of stochastic epigenetic events (represented by circled numbers and arrows) that are required in immature cells to acquire pluripotency. The precise number and nature of such changes is unclear (represented by "n"). (B) Scheme summarizing **major changes** that characterize the **transition of somatic cells into iPSCs**. The early steps are reversible, as indicated by the dashed reverse arrows. "Immature iPSCs" are defined as cells that have already acquired pluripotency but still retain an epigenetic memory of their cell type of origin, while "mature iPSCs" have lost this memory. The wavelines *below* indicate assumed reprogramming roadblocks that cells are facing at different stages. Failure to pass any of these roadblocks may result in cells that arrest at that stage or, alternatively, undergo senescence or apoptosis.



Georg Weitzer ESF-I WS2019

18



Bereits reprogrammierte Zellen

Table 2 | Summary of iPSC derivation methods*

Cell types	Reprogramming factors and methods			
	Integrating	Excisable	Non-integrating	Chemicals
Fibroblasts	• Retroviral KSO ^M or KSO ^T ¹⁰⁴ • Lentiviral KSO ^M • Inducible lentiviral KSO ^M • Lentiviral OSN1 ¹⁰⁵ • Lentiviral mi-302 cluster ¹⁰⁶	• Flaved lentiviral KSO ^M or KSO ^T • Transposon KSO ^M	• Adenoviral ¹⁰⁴ • Plasmid ^{104,107} • Protein ¹⁰⁸ • mRNA ¹⁰⁹ • RNA virus ¹¹⁰ • miRNA mimics ¹¹¹ • RNA virus ¹¹² • Plasmid ^{104,113}	• KSO + valproic acid ¹⁰⁴ • KSO + vitamin C ¹⁰⁴ • KSO + SB415282, PD0325901 and Thiazovivin ¹⁰⁴ • KSO + sodium butyrate (Nab) ¹⁰⁴
Bone marrow (mobilized) or peripheral blood cells	• Retroviral KSO ^M ¹¹⁴ • Inducible lentiviral KSO ^M	Not applicable	• Plasmid ¹¹⁴	Not applicable
Cord blood cells	• Lentiviral OSN1 ¹⁰⁵ • KSO ^M • Retroviral OCT4 and SOX2 (REF. 164)	Not applicable	• Plasmid ¹¹⁴	Not applicable
EBV-immortalized blood cells	-	Not applicable	• Plasmid ¹¹⁵	Not applicable
HLVECs	• Retroviral KSO ^M ¹¹⁶	Not applicable	Not applicable	• OCT4 + PS48, Nab, A-83-01 and PD0325901 (REF. 161)
Adipose-derived stem cells	• Lentiviral KSO ^M ¹¹⁷ • Retroviral KSO ^T	Not applicable	• Plasmid mimics ¹¹⁷ • miRNA mimics ¹¹⁸	Not applicable
Keratinocytes	• Retroviral KSO ^M and KSO ^T • Inducible lentiviral KSO ^M cassette ¹¹⁹	Not applicable	Not applicable	• OCT4 and KLF4 + transcyprimine and CHIR99021 (REF. 170) • OCT4 + PS48, Nab, A-83-01 and PD0325901 (REF. 611)
Neural stem cells	• Retroviral OCT4 (REF. 171)	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Astrocytes	• Retroviral KSO ^M ¹²¹	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Hepatocytes	• Retroviral KSO ^M ¹²²	Not applicable	Not applicable	Not applicable
Amniotic cells	• Retroviral KSO ^M ¹²³ • Lentiviral OSN ¹²⁴	Not applicable	Not applicable	• OCT4 + PS48, Nab, A-83-01 and PD0325901 (REF. 611)

A-83-01, 3-(3-Methyl-2-pyrindin-5-ylphenyl)-4-(4-quinolinyl-1H-pyrazol-1-yl)carbamamide, CHIR99021, 6-(2-(4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-methyl-1H-imidazol-2-yl)pyrimidin-2-ylamino)ethylamino)nicotinamide, EBV Epstein-Barr virus, HLVEC, human umbilical vein endothelial cells, iPSC, induced pluripotent stem cells, KLF4, Krippel-like factor 4, KSO, culture medium containing the transcription factors KLF4, SOX2 and OCT4, KSO^M, culture medium containing the transcription factors KLF4, SOX2, OCT4 and MYC, miRNA, microRNA, OCT4, octanone-binding protein 4, OSN, a lentivirus containing transcription factor, OCT4, SOX2 and Nanog, OSN1, a lentivirus containing transcription factors OCT4, SOX2, Nanog and LIN28, PD0325901, N-(2-(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-dioxane-2-yl)-fluorene-9-sulfonylbenzamide, PS48, (2Z)-5-(4-(4-bromophenyl)-3-phenyl-2-pyridinyl)acid, SB415282, 4-H (1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl)benzamide. *For simplicity, only the first reports of a given method on a given cell type are listed.

© 2011 Nature Publishing Group. All rights reserved.

iPSC - Probleme

- Effizienz
- Reprogrammierung nicht vollständig
- Reprogrammierung 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

Georg Weitzer ESF-I WS2019

23

Kapitel 8:

Herstellen von induzierten pluripotenten Stammzellen aus somatischen Zellen -und daraus wieder- Herstellung von Keimzellen

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

Orie Hikabe^{1,*}, Nobuhiko Hamazaki¹, Go Nagamatsu¹, Yayoi Obata², Yuji Hirao³, Norio Hamada^{1,4}, So Shimamoto¹, Takuya Imamura¹, Kinichi Nakashima¹, Mitsunori Saitou^{5,6,7,8} & Katsuhiko Hayashi^{1,9*}

The female germ line undergoes a unique sequence of differentiation processes that confers totipotency to the egg. The reconstitution of these events *in vitro* using pluripotent stem cells is a key achievement in reproductive biology and regenerative medicine. Here we report successful reconstitution *in vitro* of the entire process of oogenesis from mouse pluripotent stem cells. Fully potent mature oocytes were generated in culture from embryonic stem cells and from induced pluripotent stem cells derived from both embryonic fibroblasts and adult tail tip fibroblasts. Moreover, pluripotent stem cell lines were re-derived from the eggs that were generated *in vitro*, thereby reconstituting the full female germline cycle in a dish. This culture system will provide a platform for elucidating the molecular mechanisms underlying totipotency and the production of oocytes of other mammalian species in culture.

Georg Weitzer

Kapitel 7.2. Herstellung von Keimzellen und Mäusen aus iPSCs → Reproduktionsmedizin



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

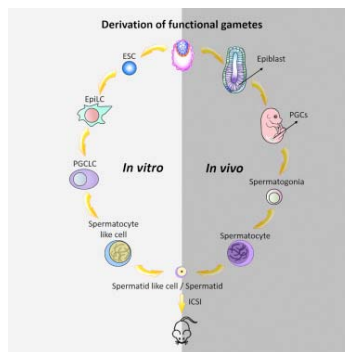
Orie Hikabe, Nobuhiko Hamazaki, Go Nagamatsu, Yayoi Obata, Yuji Hirao, Norio Hamada, So Shimamoto, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima, Mitsunori Saitou & Katsuhiko Hayashi 2016

The female germ line undergoes a unique sequence of differentiation processes that confers totipotency to the egg. The reconstitution of these events *in vitro* using pluripotent stem cells is a key achievement in reproductive biology and regenerative medicine. Here we report successful reconstitution *in vitro* of the entire process of oogenesis from mouse pluripotent stem cells. Fully potent mature oocytes were generated in culture from embryonic stem cells and from induced pluripotent stem cells derived from both embryonic fibroblasts and adult tail tip fibroblasts. Moreover, pluripotent stem cell lines were re-derived from the eggs that were generated *in vitro*, thereby reconstituting the full female germline cycle in a dish. This culture system will provide a platform for elucidating the molecular mechanisms underlying totipotency and the production of oocytes of other mammalian species in culture.

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



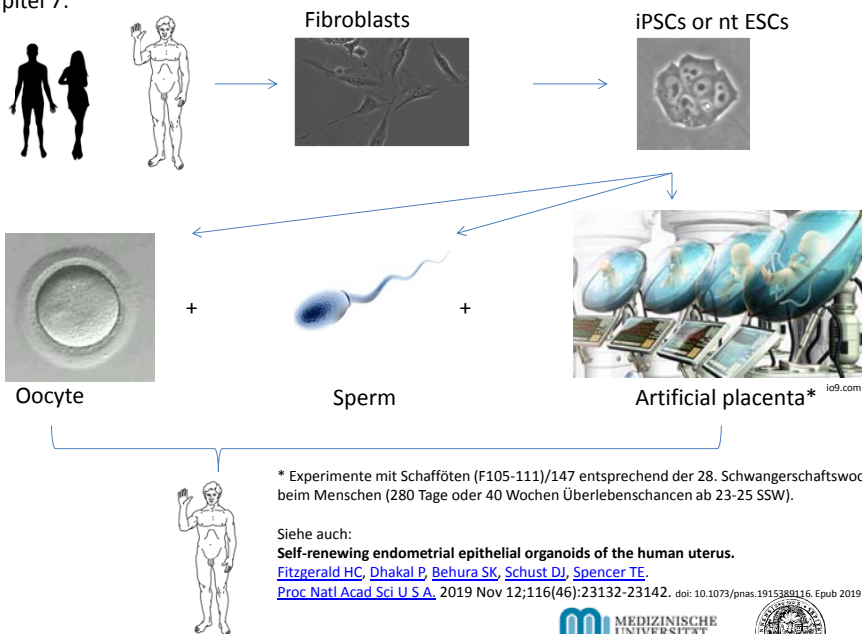
Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells *In Vitro*



Zhou et. Al. Cell Stem Cell Volume 18, Issue 3, 2016, 330–340
<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.017>



Kapitel 7:



* Experimente mit Schafföten (F105-111)/147 entsprechend der 28. Schwangerschaftswoche beim Menschen (280 Tage oder 40 Wochen Überlebenschancen ab 23-25 SSW).

Siehe auch:
Self-renewing endometrial epithelial organoids of the human uterus.

[Fitzgerald HC, Dhakal P, Behura SK, Schust DJ, Spencer TE. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019 Nov 12;116\(46\):23132-23142. doi: 10.1073/pnas.1915380116. Epub 2019 Oct 30.](#)



Vergleich ntESCs mit iPSCs

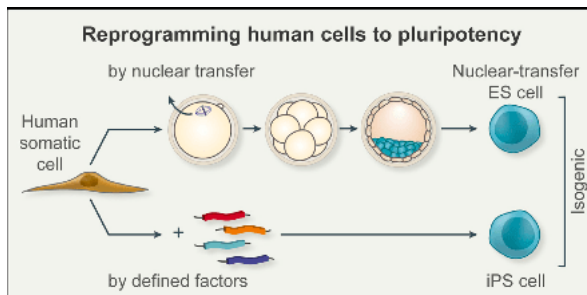
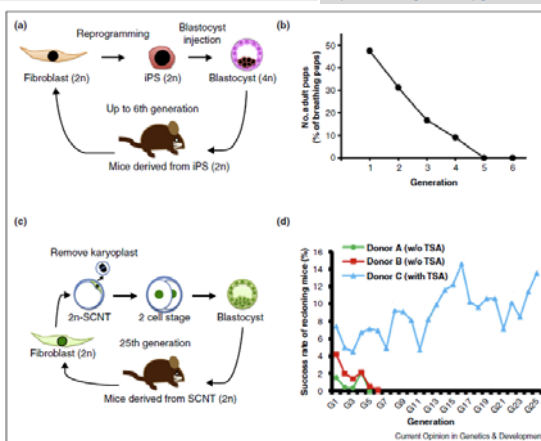


Figure 2

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2015.06.007>



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-iPSC pups that reached adulthood (from [30]). (c) Schematic of repeated rounds of SCNT, followed by foster embryo transfer and generation of cloned mice. (d) The success rate of mouse recloning in each generation with or without the use of trichostatin A (TSA), an HDAC inhibitor during nuclear transfer (adapted from [31]).

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