

ESF-II / 5 WS2014

2. Dst 15.10.2014

Klonen – ein Überblick

Georg Weitzer

ESF-II WS2014



1

## Was kann man mit Stammzellen machen?

(Letzter Teil der Einführung)

In transgenen Mäusen:

Funktion von Genen

Ursache von Krankheiten

Frühe Embryogenese und Morphogenese:

Genese der somatischen Zellen

Embryonale Stammzellen → Embryoid Bodies

Somatische Stammzellen:

Herzstammzellen → Cardiac bodies / Cardiosphären

Hirnstammzellen → Neurosphären

Organoide aus embryonalen Stammzellen und angereicherten Hirnstammzellen

Was kann man mit Stammzellen nicht machen?

Reine funktionelle somatische Zellen für Therapien herstellen.

(siehe auch letzte Folie 1. Dst.)

2

## 2. - 5. Dst. Künstliche Stammzellen – eine Überblick

### Geklonte Stammzellen:

Somatischer Zellkerntransfer (SCNT) in eine Eizelle und Isolierung der ESCs aus den entstehenden Blastozysten

→ Patienten spezifische Therapie, Neue Krankheitsmodelle

### Haploide Stammzellen aus parthenogenetischen Blastozysten:

Noch nicht stabil. → „Hefe-Genetik“ bei Säugetieren

### Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs):

Viraler Transfer von Genen, mRNA Transfektion, Injektion von Proteinen, Small synthetic molecules

→ Patienten spezifische Therapie, Neue Krankheitsmodelle

### Durch Fusion hergestellte Stammzellen:

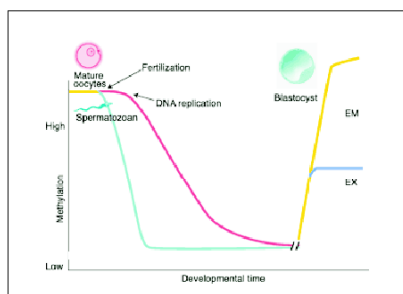
Nicht wirklich brauchbar, weil tetraploid oder aneuploid.

## Geschichte des „Klonens“ von Vertebraten

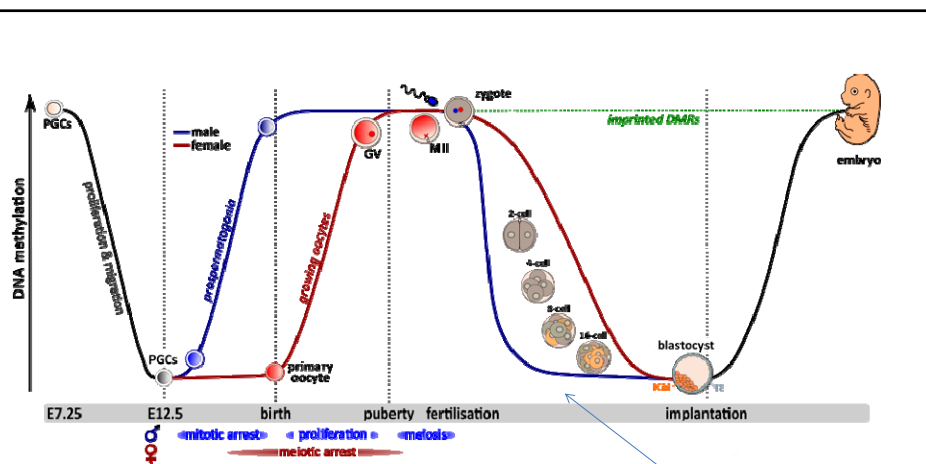
- 1962 John Gurdon Xenopus laevis
- 1981 Klaus Illmensee Mus musculus 1984 wiederlegt.
- 1986 erster Schafembryo
- 1997 Ian Wilmut Schaf Dolly
- 1998 8 Kälber, Maus NT-ESCs, dann Ziege Rind und Schwein
- 2001 Rober Lanza Mensch bis 2-Zellstadium
- 2004 Woo-Suk Hwang NT-hESCs (Betrug)
- 2004 Katze
- 2005 Hund
- 2007 Rhesus Affe
- 2007 Trivedi HL 32 NT-hESCs (Indien, nicht belegt)
- 2008 Rudolf Jänisch Maus, reproduktiv
- 2011 Schweine NT-ESCs
- 2011 Rhesus Affen NT-ESCs
- 2013 Shoukhrat Mitalipov Homo Sapiens NT ESCs von fötalen Hautfibroblasten
- 2014 Homo Sapiens NT ESCs mit Fibroblasten von erwachsenem und altem Mann

## Vermutete unüberwindliche Hürde bei Primaten im Gegensatz zu den Paarhufern (Artiodactyla)

Reprogrammierung hat nicht genug Zeit bis zum Einsetzen des embryonalen Expressionsprogrammes in den Blastomeren der kompaktierten Morula.  
Die Meiose II Metaphase (Spindel) ist nicht stabil.



<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/hajkova-petra-2002-09-16/HTML/chapter1.html>



<http://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/37-46.htm>

In diesem Zeitraum dürften sich auch die anderen epigenetischen Modifikationen des Chromatins verändern (siehe Rolle von Trichostatin A).

Lanza, West et al. 2001

TABLE 1. MATURATION PROFILE OF HUMAN EGGS AT THE TIME OF COLLECTION

Donor	No. of eggs	Germinal vesicle	MI	MIII
1	6	1	0	5
2	15	0	0	15
3	8	2	0	6
4	11	2	4	5
5	15	0	2	13
6	11	0	3	8
7	5	0	0	5
Total	71	5	9	57

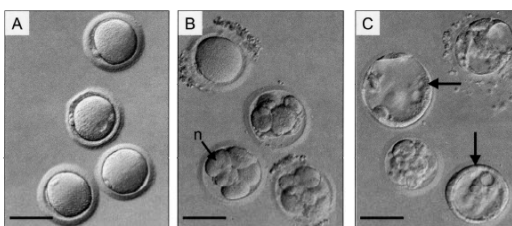


FIG. 1. Parthenogenetic development in human eggs. (A) MII eggs at the time of retrieval. (B) Four- to six-cell embryos 48 h after activation. Distinguishable single-nucleated blastomeres were consistently observed (n). (C) Blastocoele cavity (arrows) were detected on day 6 and maintained in culture until day 7. Scale bars = 100  $\mu$ m.

TABLE 2. PARTHENOGENETIC ACTIVATION\* OF HUMAN EGGS

Donor	No. of eggs	Pronucleus (%) <sup>a</sup>	Cleaved (%) <sup>a</sup>	Embryos with blastocoele cavity (%) <sup>b</sup>
1	5	4 (80)	4 (80)	0
2	14	13 (93)	13 (93)	4 (31)
6	3	3 (100)	3 (100)	2 (67)
Total	22	20 (90)	20 (90)	6 (30)

<sup>a</sup>As a percentage of activated eggs.

<sup>b</sup>As percentage of cleaved eggs.

\* 5 $\mu$ M Ionomycin, 4min., dann 2mM 6-dimethylaminopurin, 3h.

Georg Weitzer

ESF-II WS2014



7

TABLE 3. SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER IN HUMAN EGGS

Donor	Cell type	Reconstructed eggs	Pronucleus (%) <sup>a</sup>	Cleaved (%) <sup>b</sup>
3	Fibroblast	2	0	0
4		5	4 (80)	0
5		4	3 (75)	0
6	Cumulus	5	3 (60)	3 (100)
7	(Umgeben das Ei)	3	1 (33)	0
Total		19	11 (58)	3 (27)

<sup>a</sup>As a percentage of reconstructed eggs.

<sup>b</sup>As percentage of pronuclear embryos.

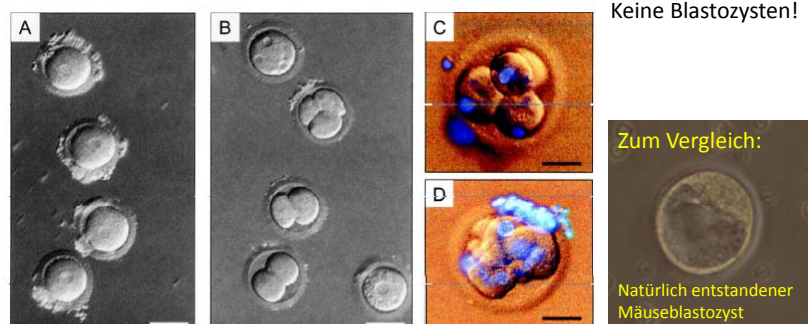


FIG. 2. NT-derived human embryos reconstructed with cumulus cells. Pronuclear-stage embryos at (A) 12 and (B) 36 h, (C) a four-cell embryo at 72 h, and (D) a six-cell embryo at 72 h. In C and D the nucleus of the embryos were stained with bisbenzimidazole (Sigma) and visualized under UV light. Scale bars = 100  $\mu$ m for A and B and 50  $\mu$ m for C and D.

Georg Weitzer

ESF-II WS2014



8