

ESF-II / 5 WS2014

4. Dst 29.10.2014

Herstellung von SCNT-hESCs

Georg Weitzer

Georg Weitzer

ESF-II WS2014



1

Oozytenaufbereitung und Kerntransfer in humanen Oozyten

N=63
 Hyaluronidase (Hyalase) Behandlung – um die Cumulus Zellen zu entfernen
 Transfer in Puffer mit 5µg/ml Cytochalasin B
 Entkernen / Spindel Absaugen (95%)
 HVJ-E vermittelte Fusion der Hautfibroblasten von humanen Föten (100%)
 Wenn < 60 Minuten: keine spontane Ausbildung einer Spindel im somatischen Kern
 = Metaphase der Meiose II bleibt stabil.
 Sofortige Aktivierung mittels Elektroporation (2.7kV7cm, 50µsec + 4h 2mM 6-DMAP.
 Inhibierung der Histondeacetylaseaktivität mittels 10nM Trichostantin A für 12 h.
 → 83% Pronucleus Ausbildung und 87% entwickelten sich zum Zwei-Blastomeren Stadium.
 → 62% 8-Zell-Stadium aber nur 14% bildeten eine kompaktierte Morula
 und nur 12% einen Blastozysten. → Reprogrammieren funktioniert. Aber
 0% (N=6) der Blastozysten hatten ICM und ergaben so keine NT-ESCs.
 → **Aktivierung des embr. Expressionsprogrammes im somatischen Kern funktioniert nicht.**

→ Was tun?

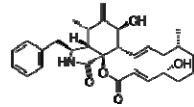
Tachibana et al., 2013; Cell 153, 1228-1238.

Georg Weitzer

ESF-II WS2014

2

Cytochalasin B from [fungus, *Helminthosporium dematioideum*](#) or *Drechslera dematioidea*



- **Cytochalasin B**, substoichiometric concentrations of cytochalasin B (CB) strongly inhibit network formation by [actin](#) filaments.
- It inhibits [cytoplasmic division](#) by blocking the formation of [contractile microfilaments](#).
- It is also used in cloning through [nuclear transfer](#). Here enucleated recipient cells are treated with cytochalasin B. Cytochalasin B makes the cytoplasm of the [oocytes](#) more fluid and makes it possible to aspirate the nuclear genome of the oocyte within a small vesicle of [plasma membrane](#) into a micro-needle. Thereby, the oocyte genome is removed from the oocyte, while preventing rupture of the plasma membrane.
 - → spindle aspiration

Georg Weitzer ESF-II WS2014

3

Spindel Entnahme macht Meiose II instabil?

Fusion von Fibroblasten mit Oozyten

- In 17/17 Oozyten bildeten sich Spindeln in den somatischen Kernen innerhalb von 30 Minuten

Fusion von Fibroblasten mit Oozyten nach Spindelabsaugen

- 0/3 : keine Spindelausbildung

Humane Oozyten werden durch den Spindelentzug aktiviert.

D.h. Meiose II wird beendet, ohne dass sich eine Spindel im somatischen Kern ausbilden kann.

Wie kann man dies unterdrücken?

2007 Koffein verbessert die Erfolgsrate in Rhesusaffen. → ?

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

Georg Weitzer ESF-II WS2014

4

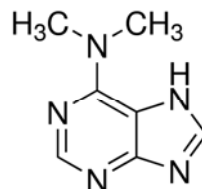
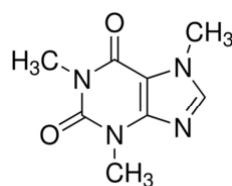
Koffein; 1,3,7-Trimethylxanthine (Protein phosphatase Inhibitor)

- „Early experimentations on mouse SCNT described structural changes in the donor nucleus occurring soon after introduction into the MII cytoplasm due to high activity of maturation promoting factor (MPF) that is a complex of two subunits: a catalytic subunit, CDC2, a homologue of the yeast cdc2 protein kinase; and a regulatory subunit, cyclin B (Szollosi et al.,1988).“
- CDC2 + cyclin B wenn phosphoryliert = „**Maturation promoting factor**“
- Caffeine can abrogate the cell cycle checkpoints, including the G2 arrest that occurs in response to DNA damage.
- Caffeine inhibits dephosphorylation of cyclin B (?)

Georg Weitzer ESF-II WS2014

5

Koffein; 1,3,7-Trimethylxanthine (Protein phosphatase Inhibitor)



6-Dimethylaminopurine (Kinase Inhibitor)

Georg Weitzer ESF-II WS2014

6

Spindel Entnahme macht Meiose II instabil?

Fusion von Fibroblasten mit Oozyten

- In 17/17 Oozyten bildeten sich Spindeln in den somatischen Kernen innerhalb von 30 Minuten

Fusion von Fibroblasten mit Oozyten nach Spindelabsaugen **in Gegenwart von 1,25 mM Koffein**

- 83% (10/12): Spindelausbildung in den somatischen Kernen

Oozytenaufbereitung und Kerntransfer in humanen Oozyten

Hyaluronidase (Hyalase) Behandlung – um die Cumulus Zellen zu entfernen **N=42**
 Transfer in Puffer mit 5µg/ml Cytochalasin B + **1.25 mM Koffein**
 Entkernen / Spindel Absaugen (95%)
 HVJ-E vermittelte Fusion der Hautfibroblasten von humanen Föten (100%)
 Wenn < 60 Minuten: keine spontane Ausbildung einer Spindel im somatischen Kern = Metaphase der Meiose II bleibt stabil.
 Sofortige Aktivierung mittels Elektroporation (2.7kV7cm, 50µsec + 4h 2mM 6-DMAP.
 Inhibierung der Histondeacetylaseaktivität mittels 10nM Trichostantin A für 12 h.
 → 83% (**74%**) Pronucleus Ausbildung und 87% (**81%**) entwickelten sich zum
 → Zwei-Blastomerenstadium.
 → 62% (**68%**) 8-Zell-Stadium aber nur 14% (**32%**) bildeten eine kompaktierte Morula und nur 12% (**24%**) einen Blastozysten.
 → 0% (**50%**, **N=8**) der Blastozysten hatten ICM und ergaben so **4 NT-ESC Zelllinien**.
 → **Effizienz vergleichbar mit IVF-ESC Herstellungsausbeute.**

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

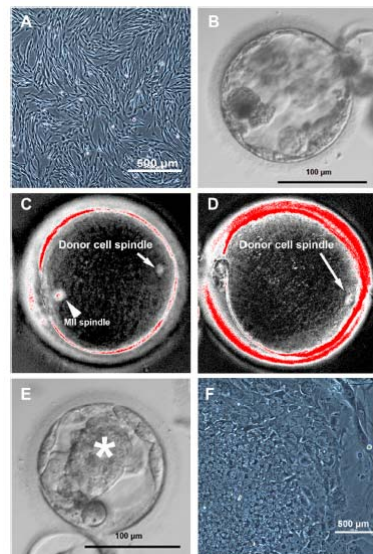


Figure 2. SCNT Blastocyst Development is Affected by Premature Cytoplasm Activation

(A) Morphology of nuclear donor fetal fibroblasts before SCNT. (B) Poor-quality human SCNT blastocyst without distinct ICM produced with suboptimal protocols; note the presence of excluded cells.

(C) Spindle-like structures detected when donor nuclei were introduced into intact MII oocytes, but not when introduction was conducted after enucleation. Arrowhead and arrow point at the maternal MII spindle and somatic cell spindle, respectively.

(D) Somatic nuclear cell spindles were formed in cytoplasts when oocyte enucleation and fusion were conducted in the presence of caffeine.

(E) Human SCNT blastocyst with prominent ICM (asterisk) produced after caffeine treatment.

(F) NT-ESC colony with typical morphology derived from a caffeine-treated SCNT human blastocyst.

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

Georg Weitzer

ESF-II WS2014

9

Reproduzierbarkeit der Methode

- Alle 4 NT-ESC Linien stammen von einer Eispenderin (A)
- Statt fötale Hautfibroblasten $\leftarrow \rightarrow$ von Kind mit Leigh Syndrom.
- Spenderinnen B (15) und C (5) Oocyten
- \rightarrow 27% (4/15) und 60% (3/5) Blastozysten
- \rightarrow je 1 stabile NT-ESC Linie (7% bzw 20%)

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

Georg Weitzer

ESF-II WS2014

10

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)

Georg Weitzer ESF-II WS2014

11

Reproduzierbarkeit der Methode mit adulten somatischen Kernen.

- 4 Spenderinnen
- nur 2 „erfolgreich“ nachdem die die Zeit zwischen Fusion und Aktivierung der Zygoten von 30 auf 120 Minuten verlängert wurde.
- D (12) und G (5) Oozyten
- Statt fötale Hautfibroblasten $\leftarrow \rightarrow$ von 35 jährigen und 75 jährigen Männern.
- \rightarrow 17% (2/12) und 20%(1/5) Blastozysten
- **\rightarrow Je 1 stabile NT-ESC Linie (8% bzw 20%) vom 35 jährigen und 75 jährigen Mann.**

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

Georg Weitzer ESF-II WS2014

12

2. Bestätigung des SCNT

- 54 Spenderinnen, 3NT-hESCs von Vorhaut-Fibroblasten neugeborener Knaben und 1 NT-hESC von einer **Frau** mit Diabetes Typ 1
- Methodische Verbesserungen:
 - +Translations- und Kinase Inhibitoren, Ca⁺⁺-freies Medium und stark verdünnte Sendai Virus Präparation
- Je kürzer die Stimulation mit Gonadotropinen (zur Follikelreifung), um so besser die Qualität der Oozyten.
- 21-26 jährige Frauen sind viel bessere Spenderinnen als 27- 32 jährige Frauen.

doi:10.1038/nature12387

Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells

Mitsuruhi Yamada^{1*}, Bjarki Johannsson^{1*}, Aiko Sagai², Ima Cole Burnett³, Daniel H. Keefe^{4,5}, Robert W. Pinner^{4,5}, Daniel Pfaff⁶, Michael W. Sommer⁶, Matthew Freese⁶, Ellen Greenberg⁶, Ichiro S. Kohara⁶, Madeline L. Lober⁶, Susan L. Solomon⁶, Naima Benvenisty⁷, Mark V. Sauer^{8,9} & Dieter Eggli⁸

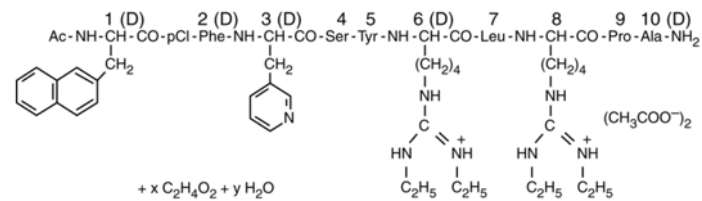
Yamada et al., 2014; Nature 510, 533-536.

Nachtrag: „Superwoman“

- Hohe endogene Östrogen-Werte vor Eisprung führen zu vielen Oozyten aber zu geringerer Qualität dieser bezüglich der Entstehung von lebensfähigen Blastozysten.
- Unterdrückung der Hypophysenaktivität durch GnRH-Antagonisten (Ganirexil) fördert das Überleben der Blastozysten.
 - Ganirexil hemmt die LH und FSH Ausschüttung durch die Hypophyse und senkt dadurch die Östrogenkonzentrationen.
- Je kürzer die Stimulation mit Gonadotropinen (zur Follikelreifung), um so besser die Qualität der Oozyten.

Kompetitiver Inhibitor des GnRH

Ganirelix Acetate



Georg Weitzer ESF-II WS2014

15

Weiterführende Literatur:

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

- SCNT wurde früher schon oft versucht:

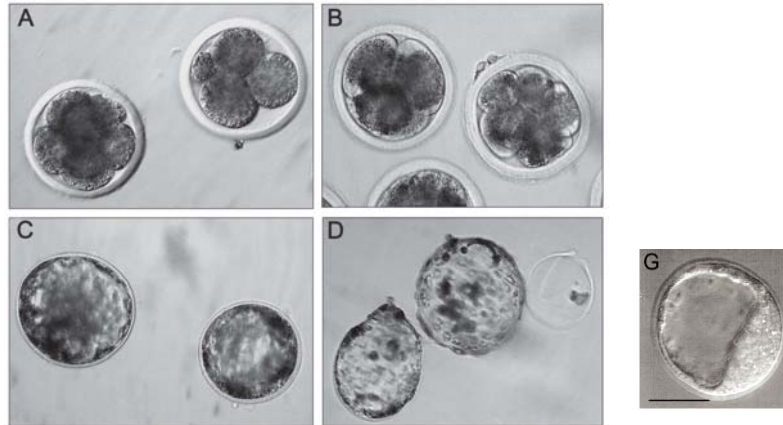


Georg Weitzer ESF-II WS2014

16

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-II WS2014

17

Derivation of Cloned Human Blastocysts by Histone Deacetylase Inhibitor Treatment After Somatic Cell Nuclear Transfer with β -Thalassemia Fibroblasts

Yong Fan, Yonghua Jiang, Xinjie Chen, Zhanhui Ou, Yifei Yin, Shengchang Huang, Zhaohui Kou, Qing Li, Xiaolin Long, Jianqiao Liu, Yuemei Luo, Baoping Liao, Shaorong Gao, and Xiaofang Sun.
Stem Cells and Development. November 2011, 20(11): 1951-1959. doi:10.1089/scd.2010.0451.

- Derivation of embryonic stem cells from patient-specific cloned blastocysts by somatic cell nuclear transfer (SCNT) holds promise for both regenerative medicine and cell-based drug discovery. However, the efficiency of blastocyst formation after human SCNT is very low. The developmental competence of SCNT embryos has been previously demonstrated in several species to be enhanced by treatment with histone deacetylase inhibitors, such as trichostatin A (TSA), to increase histone acetylation. In this study, we report that treatment of SCNT embryos with 5 nM TSA for 10 h following activation incubation increased the developmental competence of human SCNT embryos constructed from β -thalassemia fibroblast cells. The efficiency of blastocyst formation from SCNT human embryos treated with TSA was approximately 2 times greater than that from untreated embryos. Cloned blastocysts were confirmed to be generated through SCNT by DNA and mitochondrial DNA fingerprinting analyses. Further, treatment of SCNT embryos with TSA improved the acetylation of histone H3 at lysine 9 in a manner similar to that observed in in vitro fertilized embryos.
- Indien 2007: 33 NT ESC Linien 8?).

Georg Weitzer ESF-II WS2014

18