

2. Herstellung von embryonalen Stammzellen

- 2.1. Die Entstehung von Stammzellen im Laufe der Ontogenese
 - 2.1.1. Die frühe Embryonalentwicklung der Eutheria (Placentales) am Beispiel der Maus (später 2.1.2. Entstehung der somatischen Stammzellen im adulten Organismus)
- 2.2. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien
 - 2.2.1. Isolierung von Blastozysten aus trächtigen Mäuseweibchen
 - 2.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“
 - 2.2.3. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)
 - 2.2.4. Pluripotenzbeweis und Herstellung von transgenen Mäusen

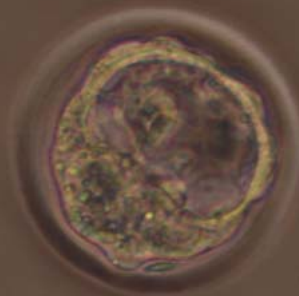
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



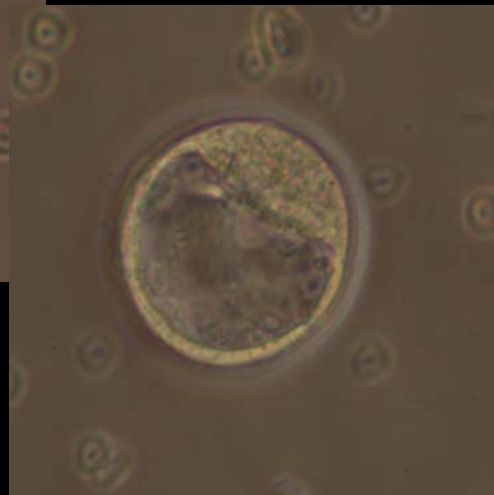
1

2.2. Die Herstellung von embryonalen Stammzelllinien



Maus Blastozyst E3.0

Maus Blastozyst E3.5



20.10.2011

2.2.1. Isolierung oder Herstellung von Blastozysten

2.2.1.1. Isolierung von Blastozysten aus trächtigen Mäuseweibchen
(estrous cycle)

2.2.1.2. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF
(menstrual cycle)

Ad 2.2.1.1.

Ausspülen der Blastozysten aus den Uterushörnern mit Medium

Entfernen der Zona Pellucida mittels Tyrode's solution (pH 2.5)

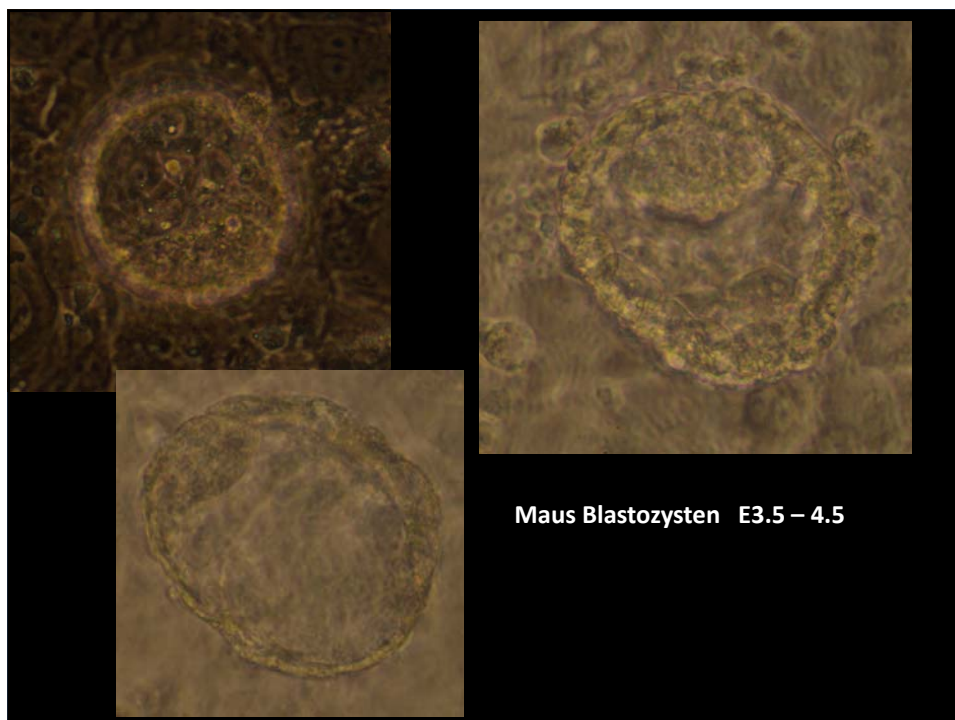
Kultur der Blastozysten auf „feeder cells“ in geeigneten Medien
(In vitro Nischen Bedingungen)

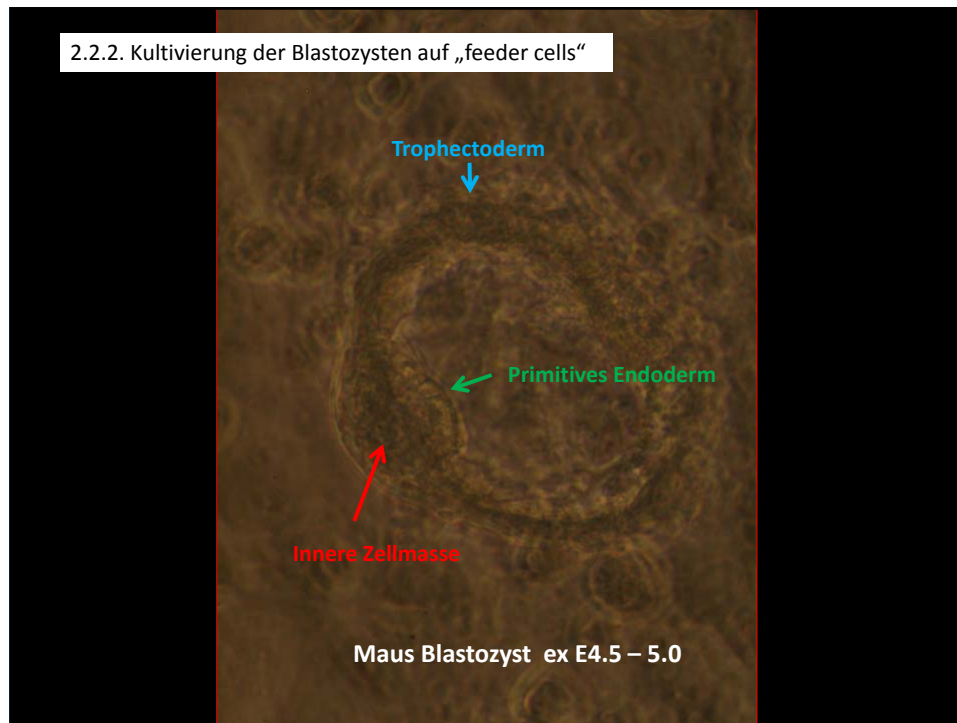
Georg Weitzer

M MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN



3





2.2.2. Kultivierung der Blastozysten auf „feeder cells“

- Mitotisch inaktivierte SNL76/7 Fibroblasten (mit 10mg/ml Mitomycin C 2 Std behandelt)
 - S = STO fibroblasten S = SIM (= Sandos Inbred Mice) Mäusestamm; TO = Thioguanine/Ouabain-resistent
 - N = Neomycin Resistent
 - L = sezernieren Leukämie Inhibition Faktor (LIF) (erste FCs waren Teratocarcinomzellen)
- DMEM Medium mit viel (4,5g/l) Glucose, 0,11g/l Pyruvat, GPS und 0,1 mM β -Mecaptoethanol
 - DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium
 - Ca-, Mg-, K-, Na-Salze, alle Aminosäuren und Vitamine
- GPS = 2mM (292mg/l) Glutamin + 30mg/l Penicillin + 50mg/l Streptomycin
- 15% fötales Rinderserum (FBS) Ethisch problematisch
 - Insulin, Transferrin, Albumin,, Hormone (Testosteron, ...) Enzyme, Bone morphogenetic protein (s)
 - kaum reproduzierbar und ethisch bedenkliche Gewinnung

Alternative zu FBS N2B27 + 2i + LIF Medium (Entwicklung dauerte ca. 20 Jahre)

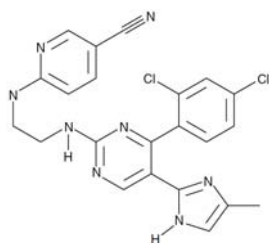
50% DMEM
 N2 (Insulin, Transferrin, Progesteron, Putrescin, Se (Selenit))
 B27 Proteinmischungen (geheim: Katalase, SOD, Hormone, ...)
 3mM CHIR99021 + 2mM PD03259010
 10⁶ U/ml LIF

Ethisch problematisch

164 proteins were significantly upregulated and 107 proteins downregulated in 2i-grown cells compared to serum.

Georg Weitzer

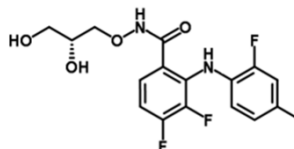
Komponenten des 2i Mediums:



CHIR99021 (CAS 252917-06-9)

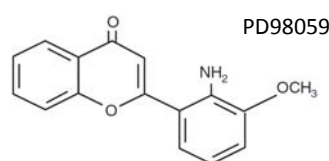
A Glycogen-Synthase-Kinase 3β(GSK3β) Inhibitor mimicking Wnt signaling by activating the translocation of β-catenin into the nucleus of cells.

PD03259010



A Mitogen-activated-Protein Kinase Kinase (MEK) inhibitor which prevents phosphorylation and nuclear localisation of Extracellular-Signal-Related-Kinases (ERK1/2), thus inhibiting differentiation promoting signals such as FGF4.

Oder:



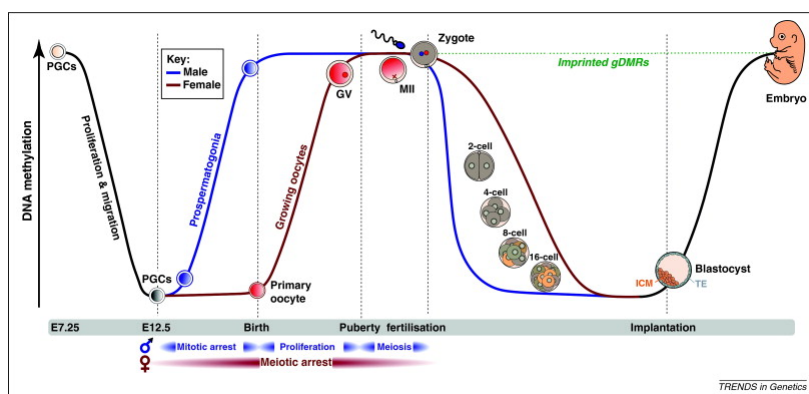
PD98059

Georg Weitzer



7

Ad: De novo DNA Methylation während der frühen Embryogenese



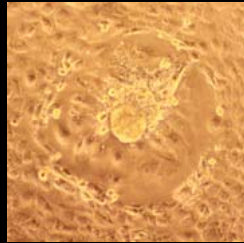
AUS:
[De novo DNA methylation: a germ cell perspective.](#)
 Smallwood SA, Kelsey G.
 Trends Genet. 2012 Jan;28(1):33-42. doi: 10.1016/j.tig.2011.09.004.

Georg Weitzer

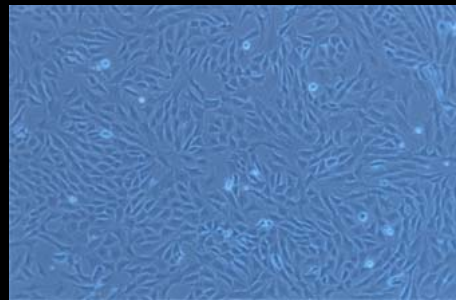


8

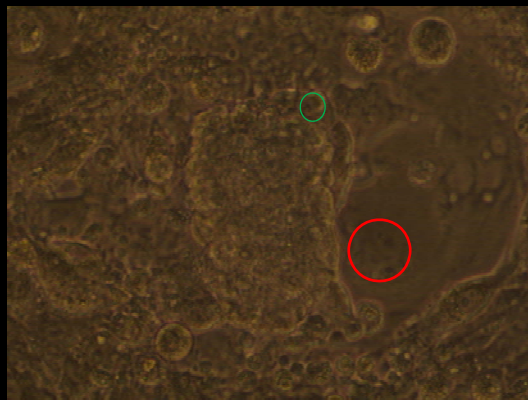
Auf Fibroblasten angewachsener Blastozyst



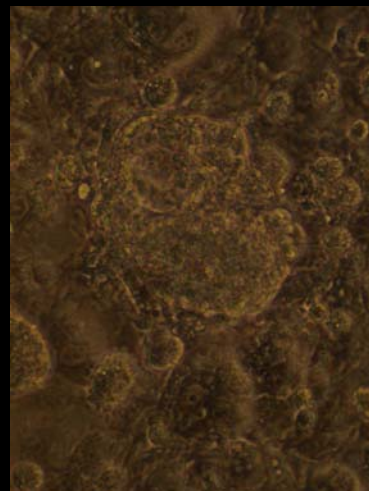
Ex E8-9



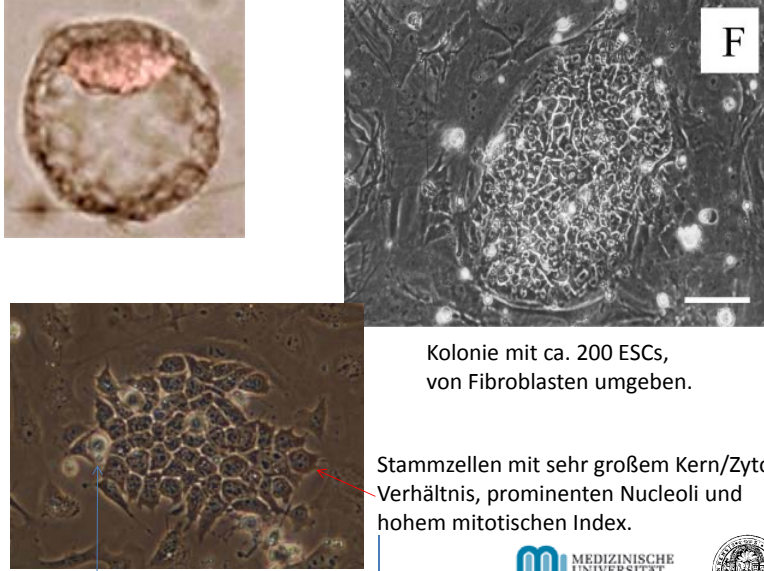
Isolierte trophektodermale Zellen



Auf Feeder Zellen explantierte
Maus Blastozysten ex E6 und ex E9



E3.5 Blastozyst



Kolonie mit ca. 200 ESCs, von Fibroblasten umgeben.

Stammzellen mit sehr großem Kern/Zytoplasma-Verhältnis, prominenten Nucleoli und hohem mitotischen Index.

Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

11

2.2.1.2. Isolierung von Eier aus Frauen und Herstellung von Blastozysten durch IVF



zona pellucida

oocyte

spermatozoa

doi: [10.1007/s10815-007-9131-z](https://doi.org/10.1007/s10815-007-9131-z)

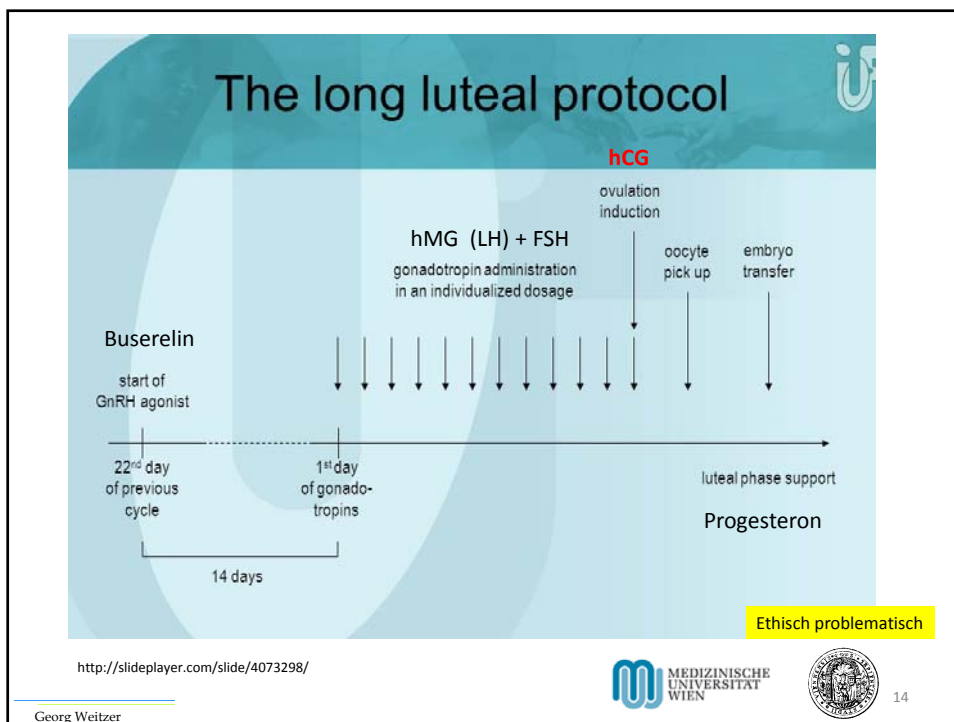
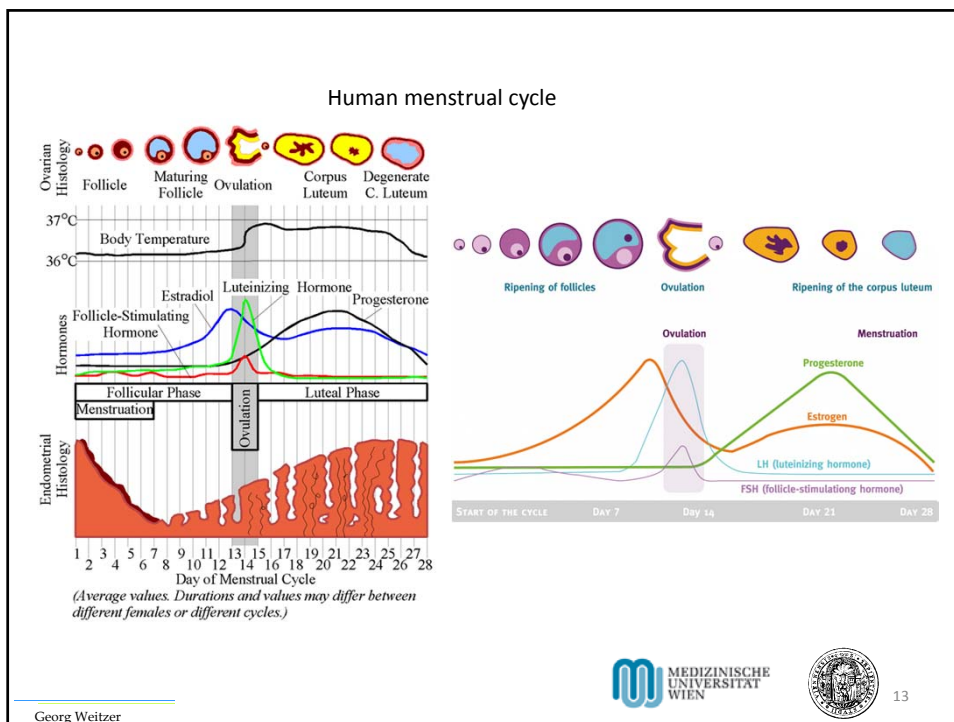
PMID: 22695746

000:00:00:10

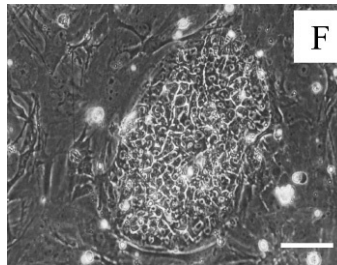
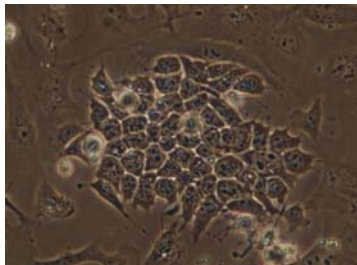
Georg Weitzer

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN

12



2.2.3. Kultur der embryonalen Stammzellen (ESCs)



mESCs: Kultur wie Blastozystenkultur: LIF (STAT3) Bmp2/4 und Wnt (β -Catenin) essentiell.

hESC: Kultur wie mESC aber nicht LIF (STAT3) und Bmp2/4 entscheidend, sondern

FGF2, Activin/ Nodal, Noggin (a Bmp and TGF β antagonist), TGF β - und Wnt-signaling.

STAT = Signal transducer and activator of transcription