

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması



Teknik Alan

Sağlık Hizmeti, Yaşam Bilimleri



Özet

Buluş, uyarılmış pluripotent kök hücrelerinin (UPKH) laboratuvarında kültür ortamında farklılaştırılmasıyla elde edilen, laboratuvar koşullarında 3 boyutlu karaciğer benzeri yapıların organoidlerin oluşturulması ile ilgilidir.

Teknolojinin Avantajları

UPKH temelli organoid oluşturma protokollerinde, çeşitli büyüme faktörleri ve kimyasallar kullanılmaktadır. Bu süreçte hücrelerin hepsi aynı durumda olmadıkları için farklı şekilde diferansiye olmaktadır. Bir kısım hücre farklı şekilde daha ileri safhada olurken diğer bir kısım hücre farklılaşmamış ya da daha az farklılaşma geçirmiş olmaktadır. Bu durum bir heterojen popülasyon oluşturmaktadır. Dolayısıyla organoid oluşurken farklı potansiyelde hücre ile yola çıkmakta böylelikle edilen organoid yapısında endodermden gelişen farklı hücre tipleri ya da progenitorlarının bulunması ihtimalini doğurmaktadır. Bu nedenlerden dolayı daha kısa sürede elde edilebilen, verimi yüksek, uzun süre kültür edilebilen, daha uzun süreli olarak karaciğer fonksiyonlarını taşıyabilen, maliyeti düşük, ticari ortamlara bağımlı olmayan organoidlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut buluşun amacı pluripotent kök hücrelerden karaciğer organoidleri oluşturmaktır. Bu buluş, sağlıklı gönüllülerden ve genetik karaciğer hastalıklarına sahip bireylerden alınan deri biyopsilerinden karaciğer organoidi oluşturmayı sağlamaktadır. Buluş ile organoidlerin, kısa sürede elde edilebilir olması ve uzun süreli kültürlerde halen normal ve hastalık fenotipinde karaciğer işlevselliğini taşıyor olması tekniğin avantajını oluşturmaktadır. Bu teknikle elde edilen organoidlerin, hepatotoksisite ve ilaç taramalarında kullanım avantajları bulunmaktadır.

UPKH hücrelerinde 14 günde hepatic organoid elde edilmektedir. İşlevsel karaciğer hepatosit benzeri hücreleri oluşturmak için 10 gün daha farklılaşma yapıyor, yani 25. günün sonunda Albumin sekresyonu, LDL hücre içine alımı, yağ biriktirme, glikojen depolama, ilaç detoksi-

fikasyon enzim aktivitesi gibi karaciğere spesifik işlevselere sahip hepatosit elde edilmiş oluyor. Ek olarak, eHEPO teknolojisi bir nadir karaciğer metabolizma hastalığı olan sitrüllinemi'nin modellenmesinde kullanılmış olup, hastalığın insanda görülen fenotipinin tamamen aynısı (karaciğerin amonyak eliminasyonunu yapamaması gibi) kültürde taklit edilebilmiştir.

Buluş ile Endoderm 5 günde, 3B hepatic organoid lineage 10 günde ve işlevsel hepatic organoid 25 günde elde edilebilmektedir.

Endoderm kökenli hepatic organoid (eHEPO) kültüründe organoidler yaklaşık 16-18 ay 48. pasaja kadar işlevselliğini kaybetmeksizin kültüre edilebilmektedir.

Buluşta EpCAM hücreleri sort edilerek daha saf ve potansiyel bir hücre popülasyonu ile başlanıldığı için daha verimli bir kültür elde edilebilmektedir. Buluş kapsamında erken pasajlardan ileri basamaklara kadar organoidlerin karakterizasyonu ve işlevsellik testleri yapılmıştır.

Buluş ile HCM gibi ticari ortamlara bağımlı olmayan, uzun süre kültür edildiğinde hücresel içeriğini ve işlevselliğini koruyabilen organoidler elde edilmektedir.

Organoid oluştururken daha saf ve etkin hücre olan EpCAM ayrımlanarak organoid oluşturulmuştur. Bu durum da organoid oluşumunun daha hızlı ve etkili bir şekilde olmasını sağlamaktadır.

Ek olarak, bu yöntem bir üre siklusu hastalığı olan sitrüllineminin modellenmesinde kullanılmıştır. İki sitrüllinemi hastasından alınmış olan deri fibroblastlarından elde edilen UPKH'lerden oluşturulan organoidlerde hastalık fenotipini taklit eder şekilde amonyak eliminasyonunun yapılamadığı gözlemlenmiştir.



Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması



Buluşun Tanıtımı

Mevcut buluş, organoid teknolojisi adı verilen, 3 boyutlu hücre/doku kültürünün oluşturulması ile ilgilidir. Mevcut buluş, uyarılmış pluripotent kök hücrelerin laboratuvar koşullarında farklılaştırılması ile elde edilen EpCAM+ endodermal progenitor hücrelerden, fonksiyonel karaciğer (hepatik) organoid kültürü oluşturmayı kapsamaktadır. Bu kültür, a) yaklaşık 14 gün gibi kısa sürede oluşması, b) 1 yıldan fazla süre kültürde sağlıklı şekilde çoğaltılabilmesi, c) ileri pasajlarda dahi, albümin üretme, glikojen

depolama, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) hücre içine alımı ve sitokrom p450 enzim aktivitesi gibi spesifik karaciğer işlevlerini yerine getirmesi bakımından diğer uyarılmış pluripotent kök hücrelerden (UPKH) elde edilmiş hepatik organoidlere göre üstünlüğe sahiptir. Bu nedenle, eHEPO adı verilen bu teknoloji, kişiye özel ilaç taramaları, pre-klinik hepatoksisite analizleri ve hastalık modellemelerinde kullanımda kolaylık sağlayacaktır.

Teknoloji Hazırlık Seviyesi: 4

Tamamlanan Testler: Buluş kapsamında erken pasajlardan ileri basamaklara kadar organoidlerin karakterizasyonu ve işlevsel testleri yapılmıştır. Ek olarak, bu yöntem bir üre siklusu hastalığı olan sitrüllineminin modellenmesinde kullanılmıştır. İki sitrüllinemi hastasından alınmış olan deri fibroblastlarından elde edilen UPKH'lerden oluşturulan organoidlerde hastalık fenotipini taklit eder şekilde amonyak eliminasyonunun yapılamadığı gözlemlenmiştir.

Fikri Mülkiyet Hakları

Ulusal Patent başvurusu yapıldı, PCT girişi yapıldı, süreç devam ediyor.

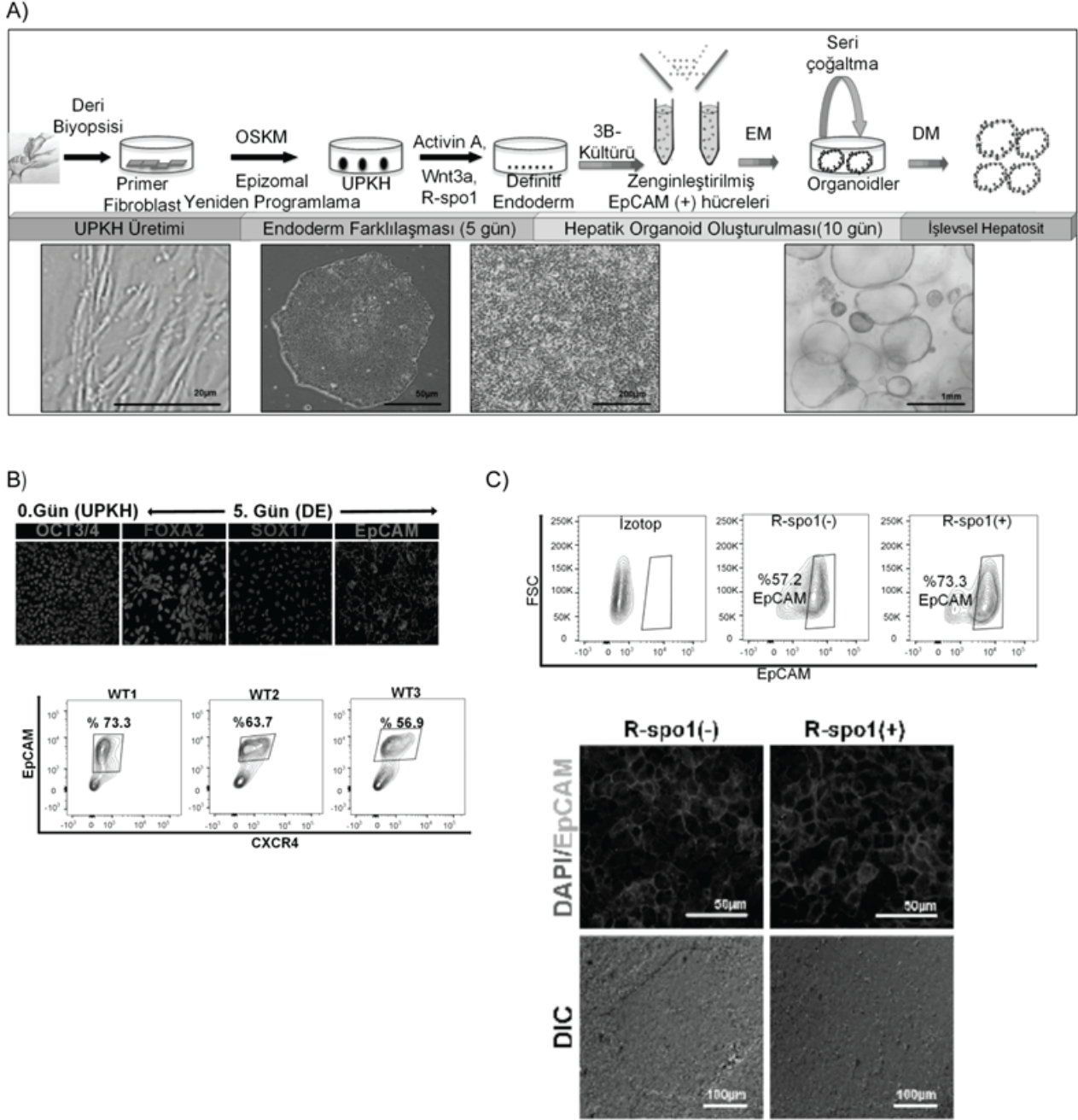
Başvuru No: 2020/16056

PCT Başvuru No: PCT/TR2021/050761



Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması

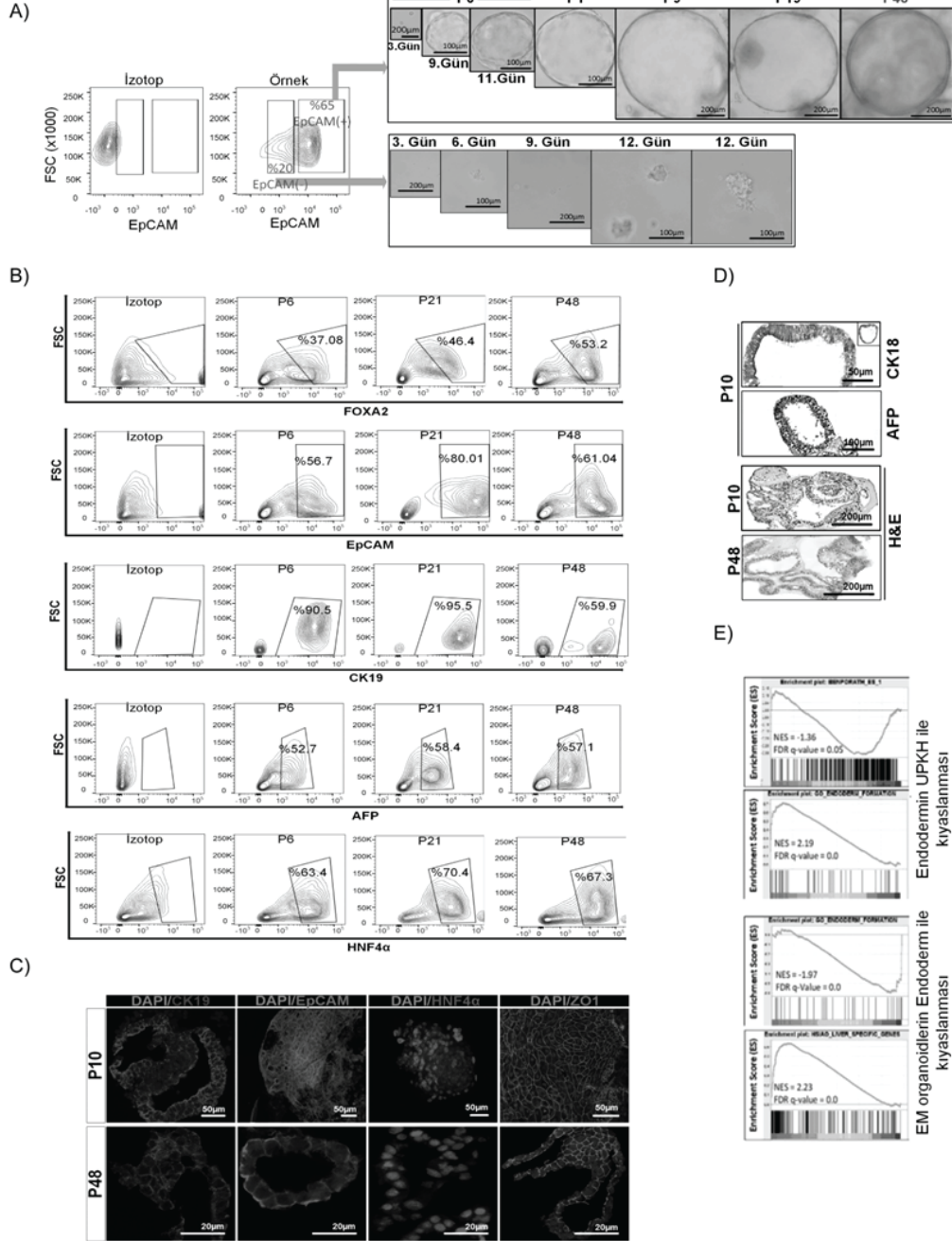
Şekil 1.



Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması



Şekil 2.

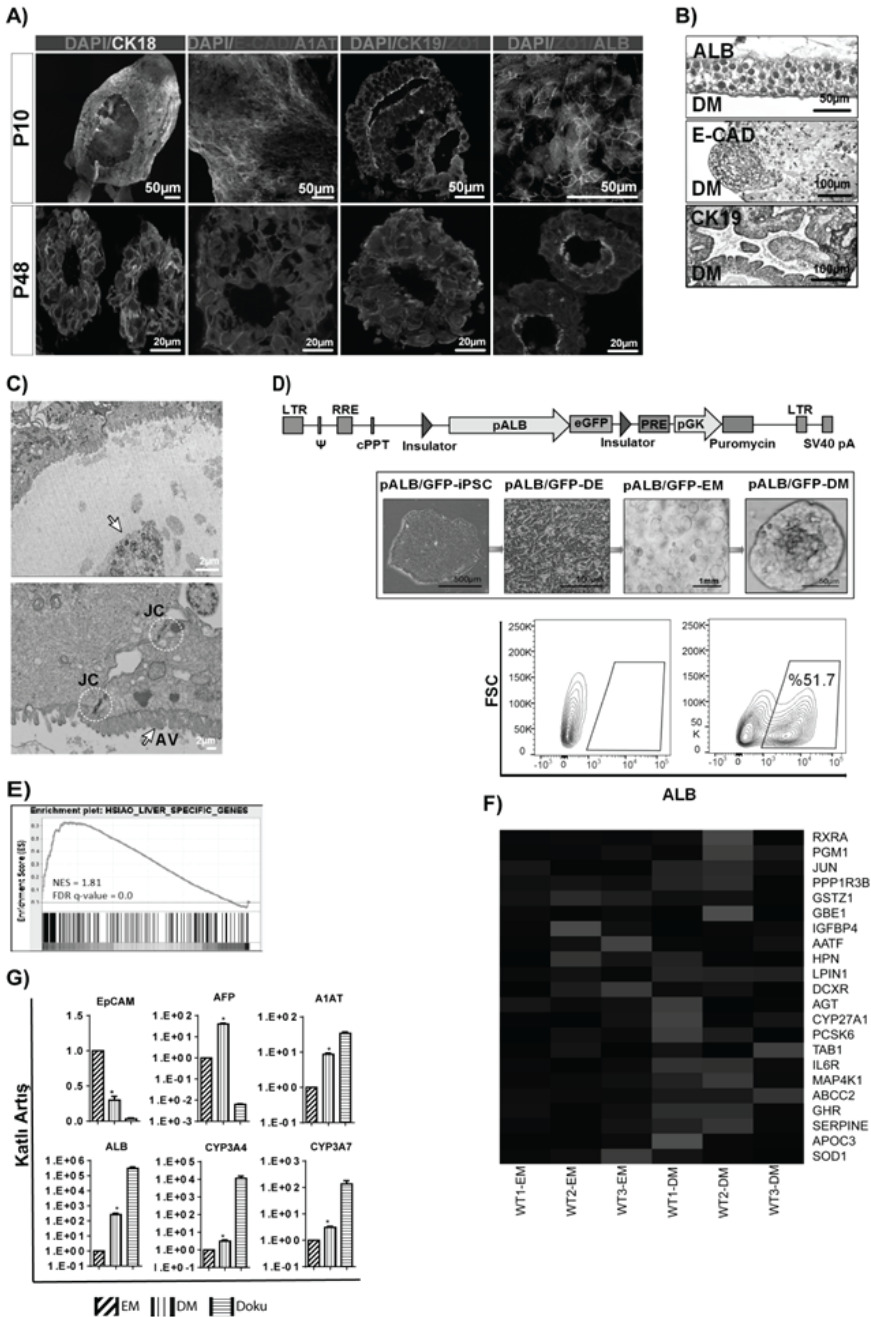


Şekil 2: eHEPO organoidlerin oluşturulması. A) EpCAM+ ve EpCAM- hücrelerin organoid oluşturma potansiyelleri. Oluşan organoidlerin farklı zamanlarda faz kontrast mikroskop ile elde edilen görüntüleri. “p” pasaj numarasını ifade etmektedir. B) Endoderm kaynaklı sağlıklı organoidlerin farklı pasajlarda (p6, p21 ve p48) Ekspansiyon ortamı (EM) ortamındaki fenotipik karakterizasyonları. C) EpCAM, HNF4α ve ZO1 proteinlerinin konfokal görüntüleri. Hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. p10 organoidlerde EpCAM\HNF4α ve ZO-1 tüm yapı boyanmıştır. Diğer boyamalar frozen kesitlerinde yapılmıştır. D) AFP ve CK18 organoidlerde immünohistokimyasal yöntem ile boyanmıştır. H&E (hematoxylin/eosin) boyamasını ifade etmektedir. E) GSEA plot farklılaşma sürecinde gen ekspresyonlarının değişimini göstermektedir. Normalized enrichment scores (NES) and FDR q-values her gen listi için analizlenmiştir.



Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması

Şekil 3.

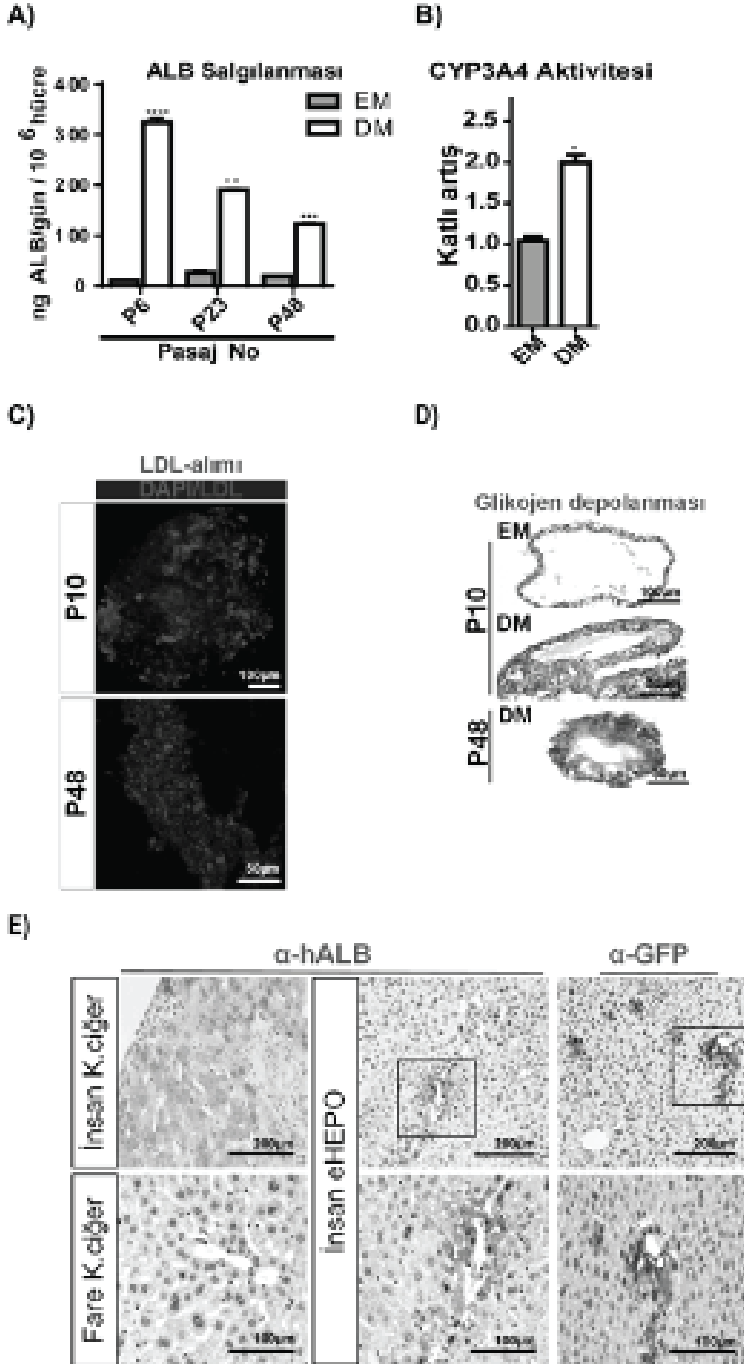


Şekil 3: eHEPO organoidlerin olgun hepatositlere in vitro farklılaşması. A) Differensiyasyon ortamı (DM)'da kültüre edilen organoidlerde CK18, E-Cadherin, A1AT, ZO1 ve ALB proteinlerinin konfokal görüntüleri. Hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. p10 grupta organoidlerin tüm yapıları CK18, E-CAD/A1AT ve ZO-1/ALB boyanmış, diğer koşullar frozen kesitlerinde boyanmıştır. B) Organoidlerde ALB, CK19 ve E-cadherin proteinlerin immünohistokimyasal görüntüleri. C) eHEPO'ların taramalı elektron mikroskop ile çekilen görüntüleri. Ok işareti apoptotik hücreler ve multiveziküler yapılar ile göstermektedir (üst panel). Beyaz yuvarlak ve ok hücre bağlantıları ve apikal villusları göstermektedir (alt panel). D) Organoidlerde albumin ekspresyonunu izlemek için lentiviral albumin promotör-GFP reporter sistem yapılmıştır. Işık mikroskop ve floresan mikroskop ile pALB-GFP reporter'ı taşıyan UPKH'lerin farklılaşma basamaklarının görüntüleri. Akış sitometri organoidlerin içerisindeki ALB+ hücrelerinin sayısını göstermektedir. E) GSEA plot EM ve DM arasındaki genlerin farklı ekspresyonlarını göstermektedir. Normalized enrichment scores (NES) ve FDR q-values karaciğere özgün genler için analizlenmiştir. F) Isı haritası EM ve DM ile ilintili genlerin ifadelerini göstermektedir. G) qPCR EM, DM organoidlerin ve karaciğer dokusundaki genlerin analizi. EM/DM ve doku/EM arasında fold change yapılmıştır (3 farklı biyolojik tekrar için 4 teknik replika yapılmıştır). (* $p \leq 0.05$).

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması



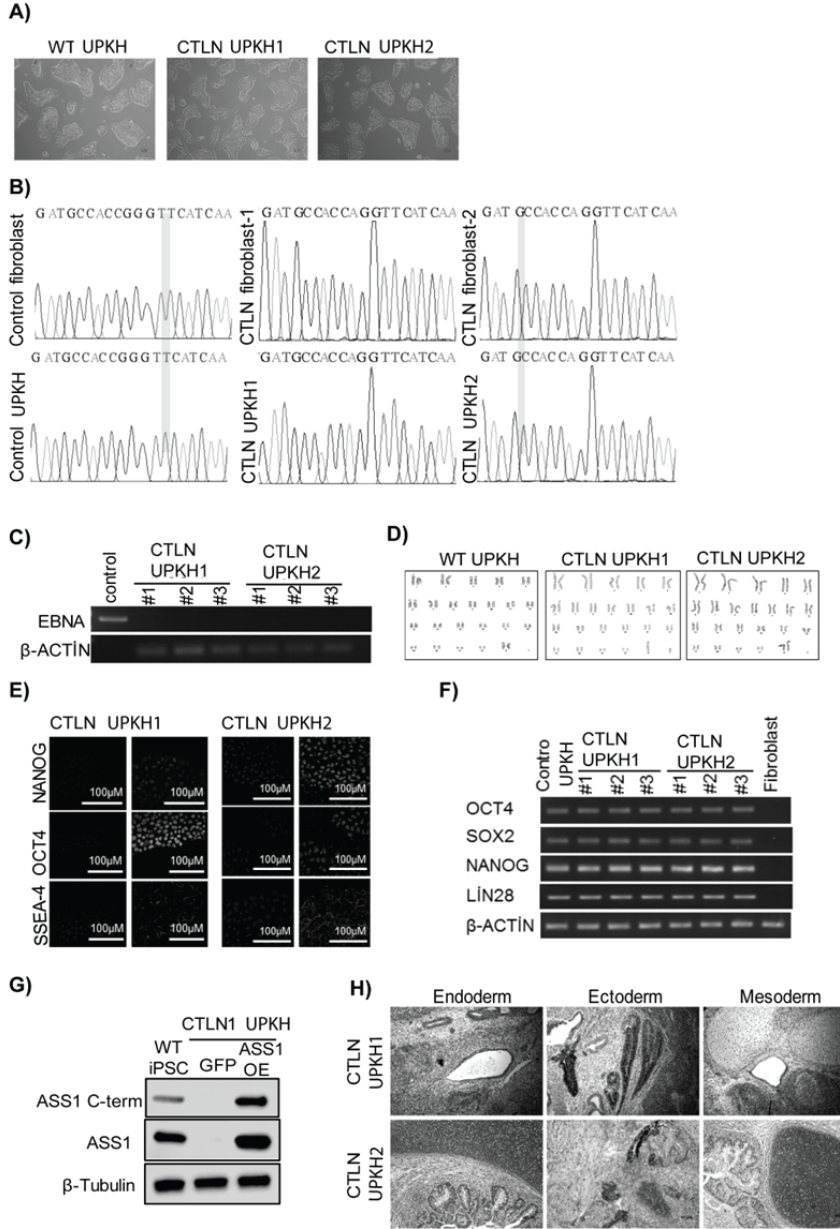
Şekil 4.



Şekil 4: eHEPO organoidlerin in vitro işlevsellik testleri. Sağlıklı organoidlerin farklı pasajlarda (p6, p23, p48) EM ve DM koşullarındaki albümin salınımı ELIZA yöntemiyle analizi. Veriler üç farklı deneyin ortalaması ngALB/gün/milyon hücre şeklinde hesaplanmıştır. B) Organoidlerin CYP3A4 aktivitesi RLU/ml/milyon hücre şeklinde ifade edilmiştir. C) LDL alımı p10 ve p48 pasajlarında farklılaşmanın 14. gününde immünofloresan görüntüleri. D) Glikojen depolaması p10 ve p48 pasajlarında farklılaşmanın 14. gününde PAS boyama görüntüleri. EM negatif kontrol olarak kullanılmıştır. E) DMN ilacı ile NGS fare karaciğerlerine hasar verildikten sonra, organoid transplante edilen karaciğerlerden elde edilen kesitlerde immünohistokimyasal boyama görüntüleri. GFP+ ve ALB+ hücrelerin varlığı hepatositlerin fare karaciğerine engraft olduğunu göstermektedir. (*p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001).

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması

Şekil 5.

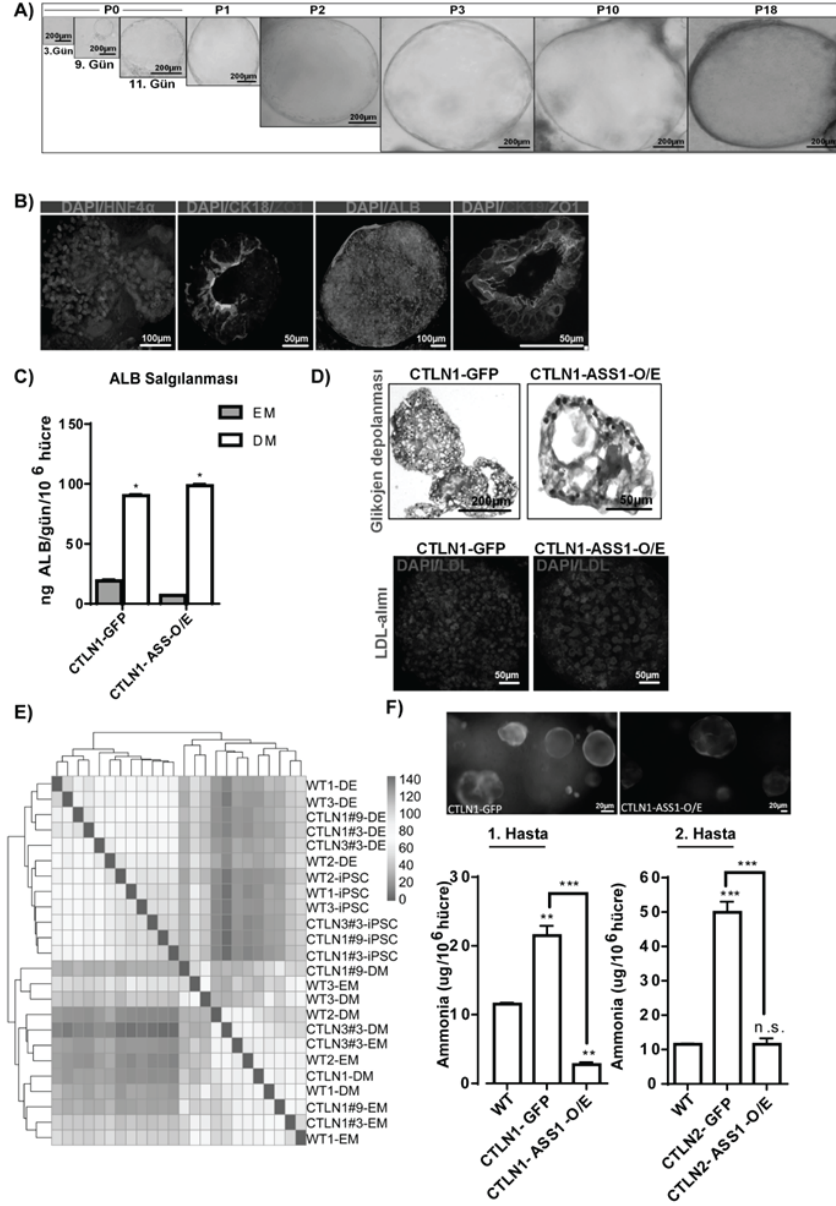


Şekil 5: Sitrülinemi (CTLN) hastalardan UPKH'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu. A) Sağlıklı, CTLN1 ve CTLN2 UPKH'lerin morfolojik görüntüleri. B) Sağlıklı bireylerden ve hastalardan elden edilen fibroblast ve UPKH'lerde ASS1 geninin 15. ekzonundaki mutasyonların dizi analizi. C) Epizomal yeniden programlama vektörlerinin PCR ile entegrasyon analizleri. D) Sağlıklı, CTLN1 ve CTLN2 UPKH'lerin kariyotip analizleri. E) UPKH'lerin NANOG, OCT4 ve SSEA-4 immünoiforesan görüntüleri. Hücre çekirdekleri Hoechst ile boyanmıştır (Skala: 100 µm). F) pluripotent genlerinin mRNA düzeyindeki ifade analizleri. G) Sağlıklı ve CTLN1UPKH'lerde GFP ve ASS1'in aşırı ifadesinin western blot ile analizleri. H) CTLN1 ve CTLN2 UPKH'lerin SCID farelerde teratoma analizleri (Skala, 100 µm).

Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreden Farklılaştırılan Epcam+ Endodermal Progenitor Hücrelerden, Uzun Süreli ve İşlevsel Hepatik Organoid (Ehepo) Kültürünün Oluşturulması



Şekil 6.



Şekil 6: eHEPO organoidlerin in vitro işlevsellik testleri. Sağlıklı organoidlerin farklı pasajlarda (p6, p23, p48) EM ve DM koşullarındaki albümin salınımı ELIZA yöntemiyle analizi. Veriler üç farklı deneyin ortalaması ngALB/gün/milyon hücre şeklinde hesaplanmıştır. B) Organoidlerin CYP3A4 aktivitesi RLU/ml/milyon hücre şeklinde ifade edilmiştir. C) LDL alımı p10 ve p48 pasajlarında farklılaşmanın 14. gününde immünofluoresan görüntüleri. D) Glikojen depolaması p10 ve p48 pasajlarında farklılaşmanın 14. gününde PAS boyama görüntüleri. EM negatif kontrol olarak kullanılmıştır. E) DMN ilacı ile NGS fare karaciğerlerine hasar verildikten sonra, organoid transplante edilen karaciğerlerden elde edilen kesitlerde immünohistokimyasal boyama görüntüleri. GFP+ ve ALB+ hücrelerin varlığı hepatositlerin fare karaciğerine engraft olduğunu göstermektedir. (*p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001).

