

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 248682 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **448318**

(22) Data zgłoszenia: **2024.04.16**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2025.10.20 BUP 42/2025**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.01.12 WUP 02/2026**

(51) MKP:

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU, Poznań, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:
**MAŁGORZATA BOROWIAK, Suchy Las, PL
KATARZYNA BŁASZCZYK, Poznań, PL
ANNA PAULINA JĘDRZEJAK, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:
**rzecz. pat. Joanna Matkowska-Peszko,
Poznań, PL**

(54) Tytuł:

Zastosowanie SPOCK2, jako regulatora różnicowania ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku komórek β trzustki

PL 248682 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie SPOCK2, jako regulatora różnicowania ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku komórek β trzustki.

Wynalazek ujawnia zastosowanie SPARC/osteonektyna, CWCV i domeny podobne do Kazal proteoglikan 2 (SPOCK2), jako regulatora różnicowania ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (hPSC, ang. human pluripotent stem cells) w kierunku komórek β trzustki. SPOCK2 wpływa na powstawanie komórek β w procesie różnicowania z ludzkich komórek macierzystych (SC- β , ang. stem cells derived β cells), regulują ich proliferację i funkcjonalność. SPOCK2 jest negatywnym, regulatorem tych procesów. Obniżenie poziomu SPOCK2 przyczynia się do znacznego wzrostu proliferacji komórek SC- β , podczas gdy aktywacja SPOCK2 hamuje ich ekspansję. Dodatkowo, brak SPOCK2 podczas różnicowania hPSC w kierunku komórek β już na etapie ich progenitorów przyspiesza ten proces, co skutkuje efektywniejszym ich różnicowaniem. Powstałe w ten sposób komórki SC- β charakteryzują się zwiększonym wydzielaniem insuliny (INS) *in vitro* i *in vivo*, stymulowanym glukozą, porównywalnym do ludzkich komórek β wysp trzustkowych.

Obecne protokoły różnicowania komórek β *in vitro* z hPSC opierają się na naśladowaniu kolejnych etapów rozwojowych trzustki poprzez modulację szlaków sygnałowych zaangażowanych w ten proces. Modulacja poszczególnych ścieżek sygnalizacyjnych odbywa się z użyciem związków drobnocząsteczkowych i czynników wzrostu. Aktualnie największą efektywność różnicowania osiąga się używając protokołów 3D, w których komórki tworzą organoidy zawieszane w medium różnicującym. Pierwszym etapem jest zróżnicowanie hPSC do endodermy (DE, ang. definitive endoderm) poprzez aktywację kanonicznego szlaku WNT i TGF β . CHIR99021 poprzez inhibicję GSK3 β aktywuje kanoniczny szlak WNT. Aktywacja szlaku TGF β odbywa się zazwyczaj poprzez białko aktywinę A. Efektywność różnicowania na tym etapie wynosi około 90–95% (*D'Amour et al., 2005, Nat Biotechnol, 23(12), 1534–1541*), (*Borowiak & Melton, 2009, Curr Opin Cell Biol, 21(6), 727–732*), (*Takenaga, Fukumoto, & Hori, 2007, J Cell Sci, 120(Pt 12), 2078–2090*).

Po osiągnięciu stadium DE ma miejsce aktywacja ścieżki FGF poprzez dodanie czynnika wzrostu keratynocytów (KGF, ang. keratinocyte growth factor). Aktywacja ścieżki FGF prowadzi dalszą specyfikację do komórek endodermy przedjelitowej (PGT, ang. primitive gut tube), czyli prekursorów dla przełyku, żołądka, wątroby oraz trzustki (*D'Amour et al., 2006, Nat Biotechnol, 24(11), 1392–1401*), (*Kroon et al., 2008, Nat Biotechnol, 26(4), 443–452*), (*Russ et al., 2015, EMBO J, 34(13), 1759–1772*). Następnym stadium osiąganym przez komórki podczas różnicowania są komórki progenitorowe (PP, ang. pancreatic progenitors). Dodanie do pożywki różnicującej kwasu retinowego (RA, ang. retinoic acid) indukuje ekspresję markerowego genu *PDX1*, czynnika transkrypcyjnego niezbędnego do formowania się trzustki (*Johannesson et al., 2009, PLoS One, 4(3), e4794*). Dodatkowo, kombinacja embrionalnego czynnika wzrostu (EGF, ang. embryonic growth factor) i nikotynamidy zwiększa efektywność różnicowania *in vitro* ludzkich PSC do komórek β poprzez aktywację ekspresji specyficznego czynnika transkrypcyjnego *NKX6-1* już na etapie komórek PP. *NKX6-1* jest niezbędny do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania komórek β (*McGaugh & Nostro, 2017, J Vis Exp(121)*). Markerem wyróżniającym komórki PP jest również *SOX9*. Na tym etapie różnicowania osiąga się efektywność około 70%. Kolejnym etapem różnicowania *in vitro* jest nabycie przez komórki cech progenitorów endokrynych (EP, endocrine progenitors). Inhibicja szlaku Notch jest niezbędna do aktywacji *NGN3* i rozpoczęcia powstawania komórek EP (*Murtaugh, Stanger, Kwan, & Melton, 2003, Proc Natl Acad Sci USA, 100(25), 14920–14925*), (*Zhang et al., 2021, Cell Death Dis, 12(10), 867*). Ponadto, zahamowanie szlaku TGF β przez dodanie inhibitora receptora ALK5 (receptor TGF β typu I) wspomaga różnicowanie endokrynych komórek trzustki (*Nostro et al., 2011, Development, 138(5), 861–871*), (*Rezania et al., 2012, Diabetes, 61(8), 2016–2029*). Stadium komórek EP charakteryzuje się ekspresją genów takich jak, *CHGA* i *NGN3*, a efektywność różnicowania wynosi około 60%. Końcowym stadium jest dojrzewanie komórek EP i specjalizacja w kierunku funkcjonalnych komórek β . Jednakże wciąż niewystarczająco poznane są mechanizmy kierujące procesami dojrzewania EP i ich różnicowania w stronę komórek β . Podczas różnicowania *in vitro* nadal problem stanowi niska i zmienna efektywność uzyskiwania funkcjonalnych komórek β , jest to około 20–50% komórek. Po osiągnięciu stadium wczesnych niedojrzałych komórek β następuje ich dojrzewanie, czyli nabieranie cech charakterystycznych dla dojrzałych funkcjonalnych komórek β , takich jak ekspresja specyficznych genów (*INS, NKX6-1, PDX1, CHGA, PCSK1*) oraz zdolność sekrecji INS w odpowiedzi na zwiększony poziom glukozy.

Patenty dotyczące protokołów mających na celu otrzymanie komórek β powstałych w procesie różnicowania z hPSC.

D'Amour et al. opisuje wytwarzanie wzbogaconych kultur endodermy właściwej (ang. definitive endoderm – DE) pochodzącej z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych (ES) w obecności wysokiego stężenia aktywiny i niskiego poziomu surowicy (D'Amour et al., 2005, *Nat Biotechnol*, 23(12), 1534–1541), co zostało zilustrowane w patencie USA nr 7704738. Przeszczepienie tych komórek pod torebkę nerkową myszy spowodowało różnicowanie w bardziej dojrzałe komórki o cechach tkanki endodermalnej co omawia patent USA nr 7704738.

Komórki endodermy pochodzące z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych można dalej różnicować w komórki prekursorowe trzustki (ang. pancreatic progenitors – PPs) z ekspresją czynnika transkrypcyjnego PDX1 po dodaniu FGF-10 i kwasu retinowego (USA nr 2005/0266554A1). Późniejsza transplantacja komórek PPs do poduszki tłuszczowej myszy z niedoborem odporności spowodowała utworzenie funkcjonalnych komórek endokrynnych trzustki po 3–4-miesięcznej fazie dojrzewania. Problem został zilustrowany w patencie USA nr 7993920 i w patencie USA nr 7534608).

Fisk i in. opisują system wytwarzania komórek wysp trzustkowych z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych przedstawione w patencie USA nr 7033831. W tym przypadku ścieżkę różnicowania podzielono na trzy etapy. Ludzkie embrionalne komórki macierzyste najpierw różnicowano do endodermy przy użyciu kombinacji maślanu sodu i aktywiny A omówione w patencie USA nr 7326572. Komórki następnie hodowano z antagonistami BMP, takimi jak Noggin, w połączeniu z EGF lub betaceluliną w celu wytworzenia komórek pozytywnych pod względem PDX1. Końcowe różnicowanie zostało wywołane przez nikotynamid.

Zastosowanie ligandów efryny i sfingozyno-1-fosforanu, jako regulatorów różnicowania pluripotentjalnych komórek macierzystych do komórek endokrynnych zostało zilustrowane w patencie US 10066210B2.

Najnowsze prace prezentujące protokoły do różnicowania hPSC w kierunku komórek β trzustki:

- Bars by T. et al., Differentiating functional human islet-like aggregates from pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* 2022 Dec 16;3(4): 101711. Epub 2022 Sep 21. PMID: 36136756; PMCID: PMC9508476. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101711>.
- Nair, G. G. et al. Author Correction: Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived beta cells. *Nat Cell Biol* 21, 792 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0316-3>
- Velazco-Cruz, L, et al., Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Reports*, 12(2), 351–365 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.012>
- Rezania, A et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 32, 1121–1133 (2014). <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>
- Pagliuca, F. W. et al. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell* 159, 428–439 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>

Stan techniki dotyczący białka SPOCK2:

SPOCK2 to wydzielany wielodomenowy proteoglikan należący do rodziny białek BM-40/SPARC, który jest częścią macierzy zewnątrzkomórkowej (Viloria et al., 2016, *Sci Rep*, 6, 37839.) (Hartmann & Maurer, 2001, *Matrix Biol*, 20(1), 23–35). SPOCK2 ulega ekspresji między innymi w komórkach śródbłonka mózgu i neuronach (Vannahme et al., 1999, *J Neurochem*, 73(1), 12–20) jak również w komórkach β trzustki i ich progenitorach endokrynnych (EP) (Atlasy sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek: <https://eolaniru.shinyapps.io/shinyapp/>; <http://singlecell.charite.de/cellbrowser/pancreas/>). Gen SPOCK2 koduje pełnej długości białko o długości 424 aminokwasów, zawierające tyreoglobulinę-1, domenę pęcherzykopodobną i domenę wiążącą wapń (Viloria et al., 2016, *Sci Rep*, 6, 37839). Obecnie niewiele badań funkcjonalnych skupia się na SPOCK2. Jak dotąd wykazano, że SPOCK2 jest powiązany z: gruczolakorakiem przewodowym trzustki (Aghamaliyev et al., 2023, *J Cancer Res Clin Oncol*, 149(11), 9191–9200), gruczolakorakiem płuc (Zhao et al., 2020, *Front Genet*, 11, 588499), rakiem prostaty (Liu, Ren, & Song, 2019), rakiem jajnika (Lou et al., 2019, *Peer J*, 7, e7163.) i dysplazją oskrzelowo-płucną (Hadchouel et al., 2011, *Am J Respir Crit Care Med*, 184(10), 1164–1170) i może stać się potencjalnym kandydatem na marker prognostyczny. W niedawnych badaniach asocjacyjnych obejmujących cały genom (GWAS, ang. genome wide association study) dotyczących bólu wykazano, że gen SPOCK2 może przyczyniać się do przewlekłego, ale nie ostrego bólu pleców (Freidin et al., 2019, *Pain*,

160(6), 1361–1373), (Bortsov *et al.*, 2022, *Pain Rep*, 7(5), e1018.). Pokazano, że SPOCK2 moduluje ból neuropatyczny poprzez interakcję z metaloproteinazą MT1-MMP (MMP 14) w celu regulacji aktywacji metaloproteinazy macierzy 2 (MMP 2) w astrocytach szczurów (Wang *et al.*, 2024, *J Neuroinflammation*, 21(1), 57). Jak dotąd, nie została poznana rola SPOCK2 w procesie różnicowania i dojrzewania komórek β .

Istotą wynalazku jest zastosowanie SPOCK2, jako regulatora różnicowania ludzkich pluripotentnych komórek macierzystych w kierunku komórek β trzustki.

Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskano następujące efekty techniczno-użytkowe :

- Komórki β uzyskane z ludzkich pluripotentnych komórek macierzystych (hPSC) stanowią źródło komórek do przeszczepów u pacjentów z cukrzycą. Aktualne protokoły generacji tych komórek pozostawiają wciąż wiele do życzenia pod względem ilości funkcjonalnych komórek SC- β . Mimo, że pewne mitogeny mogą być wykorzystane do namnażania komórek β , dorosłe komórki β replikują się wyjątkowo rzadko. W wynalazku zastosowano komórki β pochodzące z hPSC i zidentyfikowano białko macierzy zewnątrzkomórkowej – SPOCK2, jako inhibitor proliferacji wczesnych komórek SC- β . Obniżenie poziomu SPOCK2 przyczyniło się do znacznego wzrostu proliferacji, podczas gdy aktywacja SPOCK2 hamowała ekspansję komórek SC- β . Dodatkowo, brak SPOCK2 podczas różnicowania hPSC w kierunku komórek SC- β już na etapie ich progenitorów przyspieszał ten proces, co skutkowało efektywniejszym ich różnicowaniem. Ludzkie komórki SC- β ze zwiększoną proliferacją w następstwie obniżenia poziomu SPOCK2 charakteryzowały się zwiększonym wydzieleniem insuliny *in vitro* i *in vivo*, stymulowanym glukozą, porównywalnym do ludzkich komórek β wysp trzustkowych.
- Poprawa funkcjonowania komórek β w cukrzycy.
- Regulacja, różnicowanie i proliferacja komórek SC- β .
- Możliwości rozwoju leków i ukierunkowanych terapii mających na celu zwiększenie masy i funkcjonalności komórek SC- β .
- Funkcjonalność *in vivo* i sukces przeszczepu:
- Skuteczny przeszczep komórek SC- β z delecją SPOCK2 pod torebką nerkową myszy, prowadzący do poprawionej sekrecji insuliny stymulowanej glukozą i utrzymania euglikemii, podkreśla zastosowanie *in vivo* i potencjalny sukces strategii regeneracyjnych.
- Potencjalne zastosowanie terapeutyczne w cukrzycy:
- Możliwość zwiększenia masy i funkcjonalności komórek β u pacjentów z cukrzycą.
- Poprawa skuteczności leczenia cukrzycy

Zatem sposób hodowli komórkowej sterowany inhibicją SPOCK2 oferuje realne podejście do zwiększenia ilości i jakości komórek β pochodzących z hPSC, co może stanowić solidne źródło funkcjonalnych komórek do przeszczepienia.

Przykłady:

Sposób hodowli i proces różnicowania wszystkich użytych w przykładach linii hPSC w kierunku komórek β trzustki przeprowadzono w następujący sposób: Komórki hPSCs hodowano w pożywce StemFlex (Thermo Fisher Scientific) na płytkach pokrytych witronektyną (rh VTN; Thermo Fisher Scientific) w temperaturze 37°C, w atmosferze zawierającej, 5% CO₂. Komórki pasażowano, co 3–4 dni za pomocą PBS-EDTA, kiedy ich konfluencja osiągała ~80%. Przed różnicowaniem komórki zdysocjowano za pomocą TrypLE (Thermo Fisher Scientific) w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek. Różnicowanie w kierunku komórek β trzustki przeprowadzono w formie organoidów 3D, płytka przez cały czas różnicowania była na wytrząsarce orbitalnej. Przed rozpoczęciem różnicowania organoidy przepłukano pożywką DMEM/F12. Pożywkę różnicującą do dnia 20 zmieniano codziennie, po dniu 20 co dwa dni według protokołu Nair i inni (Nair *et al.*, 2019, *Nat Cell Biol*, 21(6), 792) z niewielkimi zmianami. Szczegółowy skład podstawowych pożywek przedstawiono w tabeli 1 poniżej.

Tabela 1

Odczynnik	Dzień 1-3 (pożywka S1)	Dzień 4-6 (pożywka S2)	Dzień 7-12 (pożywka S3)	Dzień 13-19 (pożywka S5)	Dzień 20-26 (pożywka ESFM)
Pożywka MCDB131	1×	1×	1×	1×	1×
Suplement Glutamax (100×	1×	1×	1×	1×	1×
Penicylina/Streptomycyna (10.000 U/mL, 100×	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml	1×, 100 U/ml
Glukoza	2,44 mM	2,44 mM	2,44 mM	20 mM	2,6 mM
Wodorowęglan sodu	29 mM	13 mM	13 mM	18,5 mM	-
Rozwór aminokwasów (NEAA, 100×	-	-	-	-	1×
BSA	2%	2%	2%	2%	2,1%
ITS-X	2 µl/100 ml	2 µl/100 ml	500 µl/100 ml	500 µl/100 ml	-
Siarczan cynku	-	-	-	260 nM	1,04 µM
Siarczan heparyny	-	-	-	-	10 mg/l
Pierwiastki śladowe A (1000×	-	-	-	-	1×
Pierwiastki śladowe B (1000×	-	-	-	-	1×

Związki niskocząsteczkowe i białka kierunkujące różnicowanie dodawano każdego dnia do odpowiedniej objętości podstawowej pożywki różnicującej. Szczegółowy skład pożywki różnicującej używanej podczas różnicowania podano poniżej. W nawiasie zapisano stężenie końcowe związku niskocząsteczkowego lub białka.

- Dzień 1: podstawowa pożywka S1, CHIR99021 (3 µM), aktywina A (100 ng/ml), witamina C (250 µM).
- Dzień 2–3: podstawowa pożywka S1, aktywina A (100 ng/ml), witamina C (250 µM).
- Dzień 4–6: podstawowa pożywka S2, KGF (50 ng/ml), witamina C (250 µM), IWP2 (1,25 µM).
- Dzień 7: podstawowa pożywka S3, KGF (50 ng/ml), kwas retinowy (2 µM), PdBu (500 nM), SANT-1 (250 nM), LDN193189 (200 nM), witamina C (250 µM), Y-27632 (10 µM).
- Dzień 8–12: podstawowa pożywka S3, aktywina A (5 ng/mL), KGF (50 ng/ml), kwas retinowy (100 nM), SANT-1 (250 nM), witamina C (250 µM), Y-27632 (10 µM), IWP2 (1,25 µM), EGF (100 ng/mL), nikotynamida (10 mM), 216
- Dzień 13–19: podstawowa pożywka S5, kwas retinowy (100 nM), SANT-1 (250 nM), LY-411575 (1 µM), hormon T3 (1 µM), inhibitor Alk5 (10 µM), betacelulina (20 ng/mL), witamina C (250 µM).
- Dzień 20–26: podstawowa pożywka ESFM.

Protokół został przedstawiony na Fig. 1, która ilustruje etapy różnicowania *in vitro* z ludzkich PSC w kierunku komórek β trzustki. Na schemacie zaznaczono poszczególne stadia (hPSC – SC-β), dzień różnicowania, w którym osiąga się dane stadium oraz związki niskocząsteczkowe (np. CHIR, IWP2, T3), białka (np. Aktywina A – AA, KGF, EGF, Betacelulina) wpływające na osiągnięcie przez różnicowane komórki określonego stadium.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe trzy przykłady.

Przykład 1: Identyfikacja i weryfikacja roli SPOCK2, jako inhibitora procesu różnicowania komórek β trzustki z hPSC.

W celu identyfikacji i weryfikacji roli SPOCK2, jako inhibitora procesu różnicowania komórek β trzustki z hPSC wykorzystano dwie linie hPSC: typ dziki (WT) oraz linię hPSC z delecją białka SPOCK2 (SPOCK2 KO lub KO). Na etapie komórek pluripotencjalnych, zastosowano technologię CRISPR/Cas9 do inaktywacji genu *SPOCK2*, co w efekcie spowodowało brak powstawania białka SPOCK2 w tych komórkach. W trakcie różnicowania pierwszą istotną zmianę zaobserwowano już na etapie wczesnych PPz z dnia 10. Komórki SPOCK2 KO PPz wykazały wyższą niż w komórkach WT PP ekspresję NKX6-1

i PDX1 (Figura 2). Figura 2 przedstawia reprezentatywne obrazy z mikroskopu konfokalnego komórek WT i SPOCK2 KO z dnia 10 (stadium wczesnych PP) oraz kwantyfikacja sygnałów fluorescencji komórek wybarwionych przeciwciałami przeciwko CHGA (zielony) i NKX6-1 (czerwony) i PDX1 (biały). DAPI (niebieski) oznacza jądra komórkowe. Skala = 100 μ m. Zastosowano test t-Studenta. Dane przedstawiono, jako średnie \pm SD. N = 3 replikacje biologiczne.

W dniu 13, w stadium późnych PP, ekspresja NKX6-1 i PDX1 utrzymywała się nadal na wyższym poziomie w SPOCK2 KO PP. Co więcej, ekspresja CHGA – markera komórek endokrynych była również istotnie podwyższona w komórkach SPOCK2 KO aniżeli w komórkach WT PP (Figura 3 i Figura 4), jak wykazała analiza barwienia immunofluorescencyjnego. Figura 3 przedstawia reprezentatywne obrazy z mikroskopu konfokalnego komórek WT i SPOCK2 KO z dnia 13 (stadium późnych PP) oraz kwantyfikacja sygnałów fluorescencji komórek wybarwionych przeciwciałami przeciwko NKX6-1 (zielony) i PDX1 (czerwony) i SOX9 (biały). Podobnie, Figura 4 pokazuje komórki WT i SPOCK2 KO z dnia 13 (stadium późnych PP) oraz kwantyfikację sygnałów fluorescencji komórek wybarwionych przeciwciałami przeciwko PDX1 (zielony) i CHGA (czerwony). W obu przypadkach DAPI (niebieski) oznacza jądra komórkowe. Skala = 100 μ m. Zastosowano test t-Studenta. Dane przedstawiono, jako średnie \pm SD. N = 3 replikacje biologiczne.

Analiza sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (scRNA-seq) jak również barwienia immunofluorescencyjnego wykazały, że wczesne SPOCK2 KO SC- β , z dnia 21, charakteryzowały się wyższą aniżeli w WT ekspresją markerów komórek β takich jak C-PEP, NKX6-1 i PCSK1 (Ryciny 5–8) sugerując, że komórki SPOCK2 KO SC- β są bardziej dojrzałe na tym etapie różnicowania. Figura 5 przedstawia reprezentatywne obrazy z mikroskopu konfokalnego komórek WT i SPOCK2 KO z dnia 21 (stadium komórek β) oraz kwantyfikacja sygnałów fluorescencji komórek wybarwionych przeciwciałami przeciwko C-PEP (zielony) i NKX6-1 (czerwony). Podobnie Figura 6 pokazuje komórki WT i SPOCK2 KO z dnia 21 (stadium komórek β) oraz kwantyfikację sygnałów fluorescencji komórek wybarwionych przeciwciałami przeciwko C-PEP (zielony) i PCSK1 (czerwony). W obu przypadkach DAPI (niebieski) oznacza jądra komórkowe. Skala = 100 μ m. Zastosowano test t-Studenta. Dane przedstawiono, jako średnie \pm SD. N = 3 replikacje biologiczne. Figura 7 przedstawia wykres względnej ekspresji wybranych genów, markerów EP, natomiast Figura 8 przedstawia wykres względnej ekspresji markerów komórek β , w komórkach SPOCK2 KO i WT z dnia różnicowania 21. Rozmiar kropki reprezentuje procent komórek wykazujących ekspresję genu. Czerwony oznacza regulację w górę, a niebieski oznacza regulację w dół ekspresji genów. Dodatkowo, analiza scRNA-seq uwidoczniała znaczące różnice w proporcjach między komórkami WT i SPOCK2 KO SC- β . Populacje komórek EP i endokrynych były znacząco podwyższone w SPOCK2 KO SC- β (Figura 9). Figura 9 przedstawia oszacowanie procentowe proporcji komórek PP, EP i endokrynych wśród komórek zróżnicowanych do dnia 21 (SC- β stadium) przy użyciu danych dotyczących scRNA-seq dla WT i SPOCK2 KO.

Wnioski:

Podsumowując, różnice pomiędzy SPOCK2 KO i WT podczas różnicowania wskazują, że brak SPOCK2 przyspiesza proces różnicowania już na etapie PP a co za tym idzie w ostatecznej puli komórek SC- β mamy więcej komórek produkujących INS, charakteryzujących się wyższą ekspresją markerów komórek β w porównaniu do komórek WT, co sugeruje, że komórki SPOCK2 KO SC- β są bardziej funkcjonalne (Przykład 3).

Przykład 2: Identyfikacja i weryfikacja roli SPOCK2, jako inhibitora proliferacji komórek β trzustki powstałych w procesie różnicowania z hPSC.

W celu identyfikacji i weryfikacji roli SPOCK2, jako inhibitora proliferacji komórek β trzustki powstałych w procesie różnicowania z hPSC wykorzystano linie hPSCs KO oraz WT wspomniane już w przykładzie 1. Dodatkowo użyto linię z 70% obniżoną ekspresją SPOCK2 (SPOCK2 KD lub KD) powstałą przy użyciu systemu lentiwirusowej (shRNA) na etapie EPs. Ponadto, w celu zwiększenia ilości białka SPOCK2 (SPOCK2 GoF) zastosowano rekombinowany ludzki SPOCK2 (rh SPOCK2) (R&D Systems), rh SPOCK2 w zakresie stężeń 0–250 ng/ml był bezpośrednio dodawany do pożywki różnicującej na etapie EPs przez 2–7 dni. Wszystkie hPSCs hodowano i różnicowano do komórek SC- β tak jak w opisanym powyżej Przykładzie 1 i jak przedstawiono na Rycinie 1. Następnie komórki poddano różnorodnej analizie pod kątem ich zdolności proliferacyjnych.

Wykazano, że białko rh SPOCK2 hamuje proliferację komórek SC- β . Komórki SC- β wzbogacono przy użyciu przeciwciał przeciwko antygenowi CD49a i TM4SF4, które są odpowiednio markerami powierzchniowymi ludzkich komórek β i komórek α . Odsortowane komórki SC- β (CD49a+/TM4SF4-) po traktowaniu 100 ng/ml lub 250 ng/ml rh SPOCK2, powodując 44% spadek ekspresji markera proliferacji

pHH3 przy najwyższym stężeniu rh SPOCK2, jak wykazała analiza cytometrii przepływowej (Figura 10). Figura 10 przedstawia analizę FACS komórek β pochodzących z hPSC wybarwionych przeciwciałami przeciwko markerowi powierzchniowemu komórek β , CD49a skoniugowanemu z GFP-A (oś x) oraz markerowi powierzchniowemu komórek α – TM4SF4 skoniugowanemu z APC-A (y-osi) pokazujący procent komórek β (bramka P4) i komórek α (bramka P5). Kwantyfikacja komórek proliferujących (pHH3+) wśród komórek β (CD49a+ i TM4SF4-) traktowanych białkiem rh SPOCK2 przez siedem dni. Dane normalizowano w stosunku do nietraktowanej kontroli. W celu określenia wartości p zastosowano test ANOVA Dane przedstawiono, jako średnie \pm SD. N = 5 replik biologicznych.

Zastosowano system lentiwirusowy do dostarczenia shRNA anty-SPOCK2 lub pustego plazmidu GIPZ, co doprowadziło do 70% obniżenia poziomu ekspresji SPOCK2 i jednocześnie do 55% i 77% wzrostu komórek SC- β z ekspresją pHH3 i C-PEP (ang. C-peptide, będący produktem ubocznym dojrzewania INS i markerem komórek β) dla SPOCK2 KD, odpowiednio w stosunku do WT lub GIPZ, jak wykazała analiza barwienia immunofluorescencyjnego (Figura 11). Figura 11 przedstawia kwantyfikację proliferujących komórek SC- β . Przyrównano komórki C-PEP+/pHH3+ do komórek C-PEP+/WT, GIPZ lub SPOCK2 KD. Większą liczbę komórek SPOCK2 KD SC- β z ekspresją pHH3 w porównaniu z komórkami kontrolnymi pokazano w %. W celu określenia wartości p zastosowano test ANOVA Dane przedstawiono, jako średnie \pm SD. N = 5 replik biologicznych.

Aby zbadać proliferację komórek SPOCK2 KO SC- β , zprofilowano transkrypcyjnie ~6400 WT i ~5500 komórek KO przy użyciu technologii scRNA-seq. Po przeprowadzeniu odpowiednich normalizacji i identyfikacji klastrów komórkowych oraz genów o zmienionej ekspresji wykazano, że powstało dwa razy więcej komórek z ekspresją INS i NKX6-1 w SPOCK2 KO aniżeli w WT SC- β (Figura 12). Figura 12 prezentuje wykres UMAP przedstawiający rozmieszczenie oraz procent komórek z współekspresją INS oraz NKX6-1 dla WT (po lewej) i SPOCK2 KO (po prawej). Kolorem niebieskim zaznaczono komórki z ekspresją NKX6-1 natomiast czerwonym te pozytywne na INS.

Następnie przeprowadzono ocenę cyklu komórkowego przy użyciu pakietu Seurat w celu identyfikacji proliferujących komórek SC- β . 19% komórek SC- β z SPOCK2 KO w porównaniu z 12% komórek WT SC- β , z ekspresją INS lub INS/NKX6-1, znajdowało się w aktywnych fazach cyklu komórkowego: S i G2/M (Figura 13). Figura 13 pokazuje proporcje (%) SPOCK2 KO i WT SC- β komórek (określanych, jako INS+/NKX6.1+) w fazie G1, S lub G2M cyklu komórkowego.

Wnioski:

Podsumowując, konsekwentnie obserwowano, że SPOCK2 hamuje proliferację ludzkich niedojrzałych komórek β . Zastosowano kilka podejść do manipulowania ekspresją SPOCK2 i dwie niezależne linie hPSC-HUES8 i H1 w celu uzyskania komórek β , wskazując, że wpływ SPOCK2 na proliferację ludzkich komórek β nie ogranicza się do konkretnej linii hPSC.

Przykład 3: Identyfikacja i weryfikacja roli SPOCK2, jako inhibitora wydzielania insuliny, zależnej od glukozy, przez komórki β trzustki powstałe w procesie różnicowania z hPSC.

W celu identyfikacji i weryfikacji roli SPOCK2, jako inhibitora wydzielania insuliny (INS), zależnej od glukozy, przez komórki β trzustki powstałe w procesie różnicowania z hPSC wykorzystano linie hPSCs WT oraz linię z przejściową ekspresją SPOCK2 (KD) powstałą przy użyciu technologii lentiwirusowej (shRNA) na etapie EPs. hPSCs WT i KD hodowano i różnicowano do komórek SC- β tak jak w opisanym powyżej Przykładzie 1 i jak przedstawiono na Rycinie 1. Następnie komórki poddano analizie wydzielania insuliny stymulowanej glukozą (ang. glucose stimulated insulin secretion, GSIS) w celu oceny funkcji SC- β z niedoborem SPOCK2.

Komórki inkubowano przez 1 godzinę w buforze Krebsa (128 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,7 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0,1% BSA), następnie inkubowano w buforze Krebsa z niską zawartością glukozy (2,8 mM D-(+)-glukozy) i wysoką zawartością glukozy (16,7 mM D-(+)-glukozy) przez 30 minut w każdym etapie. Po każdym etapie inkubacji zbierano supernatanty. Komórki następnie zdysocjowano za pomocą TrypLE w celu uzyskania zawiesiny pojedynczych komórek i policzono (Countess, Invitrogen). Insulinę ludzką zmierzono z supernatantów przy użyciu testu ELISA (Merckodia), zgodnie z instrukcjami producenta.

Komórki kontrolne WT i komórki SPOCK2 KD wykazywały minimalne wydzielanie INS w odpowiedzi na 2,8 mM glukozy, ale po ekspozycji na 16,7 mM glukozy komórki SPOCK2 KD SC- β wydzielały średnio 5,5 μ IU/ml INS, co stanowi wzrost o 85% (Figura 14). Wskaźnik stymulacji INS (SI), zdefiniowany jako stosunek wydzielania INS indukowanej wysokim poziomem glukozy do niskiego poziomu glukozy, był znacząco wyższy dla komórek SPOCK2 KD SC- β niż dla WT (Figura 14). Figura 14 przedstawia wykres z pomiaru wydzielania insuliny przy użyciu testu ELISA w komórkach SC- β WT lub

SPOCK2 KD po potraktowaniu niską glukozą (2,8 mM) lub wysoką glukozą (16,7 mM) znormalizowaną do całkowitej liczby komórek. Wskaźnik stymulacji insuliną komórek WT i SPOCK2 KD SC- β w porównaniu z ludzkimi pierwotnymi wyspami, obliczony, jako stosunek wydzielania insuliny w odpowiedzi na 16,7 mM vs. 2,8 mM glukozy. Do określenia wartości p przedstawionych na wykresie zastosowano jednoczynnikową analizę ANOVA dla wielokrotnych porównań. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD. N = 4 repliki biologiczne. Warto zauważyć, że wydzielanie INS w odpowiedzi na 16,7 mM glukozy i INS SI dla komórek SPOCK2 KD SC- β były porównywalne do poziomów dla ludzkich pierwotnych wysp trzustkowych.

Wnioski:

Obniżenie poziomu ekspresji SPOCK2 w komórkach różnicujących w kierunku komórek β spowodowało wyraźną ekspansję komórek SC- β *in vitro* oraz znacząco zwiększyło wydzielanie przez nie insuliny stymulowanej glukozą.

Zastrzeżenie patentowe

1. Zastosowanie SPOCK2, jako regulatora *in vitro* różnicowania ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku komórek β trzustki.

Rysunki

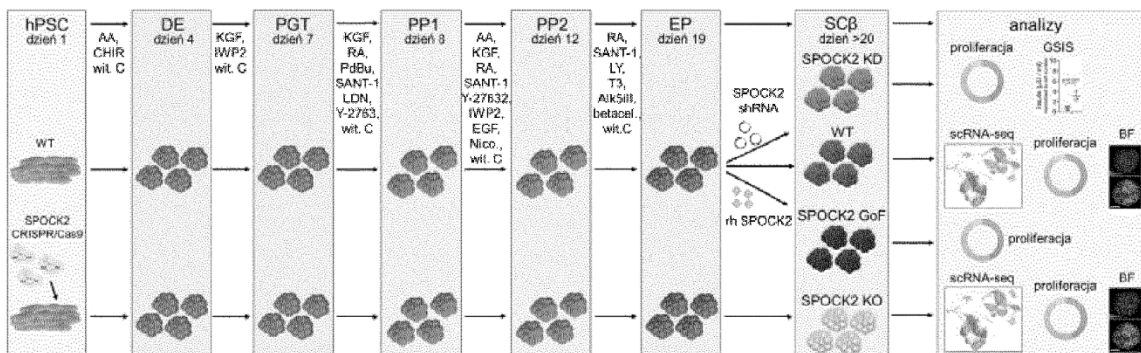


fig 1

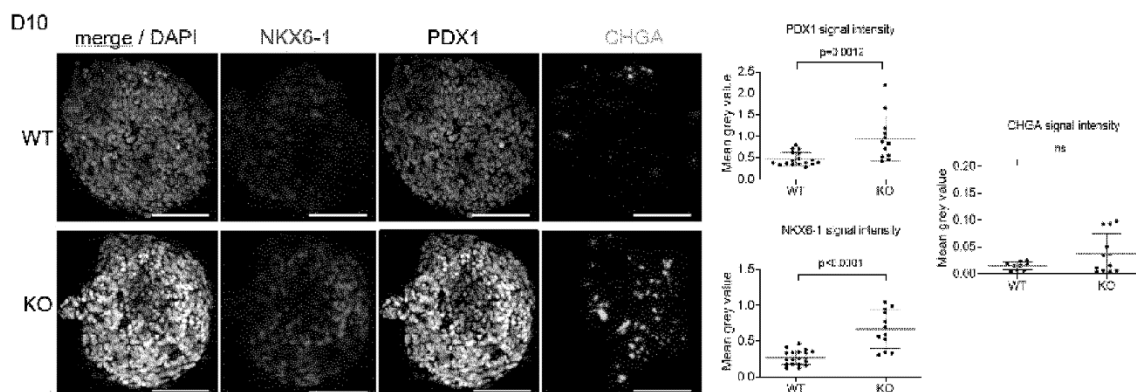


fig 2

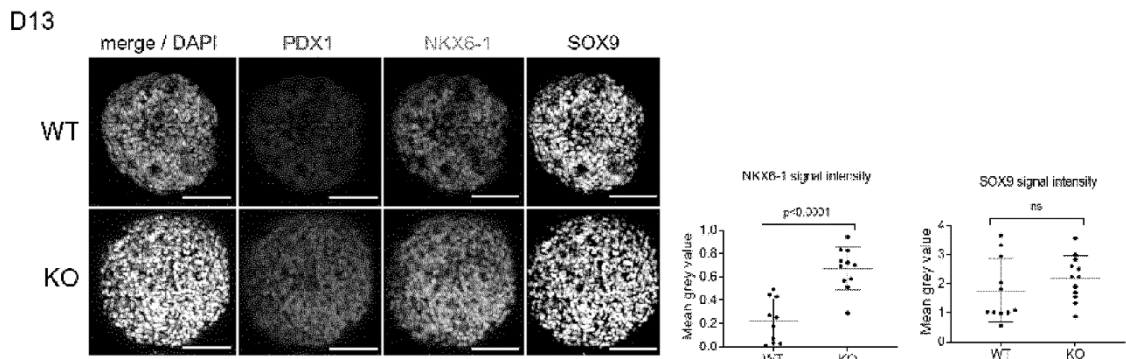


fig 3

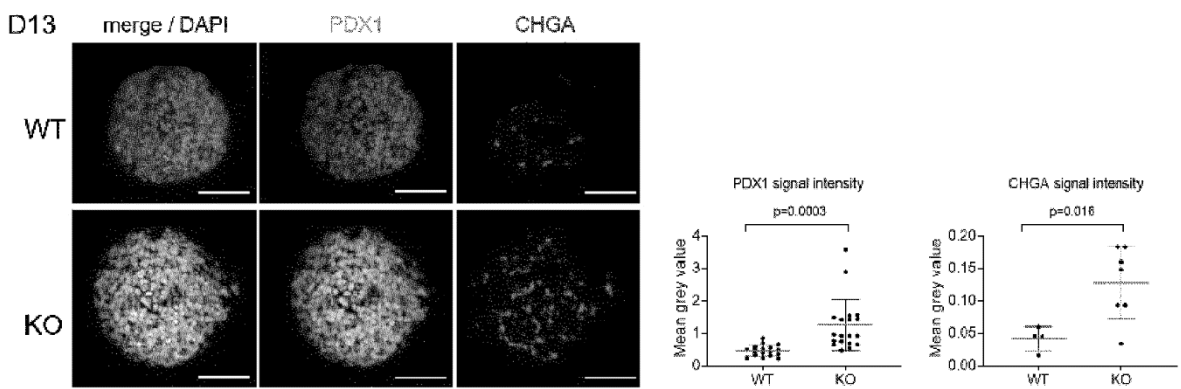


fig 4

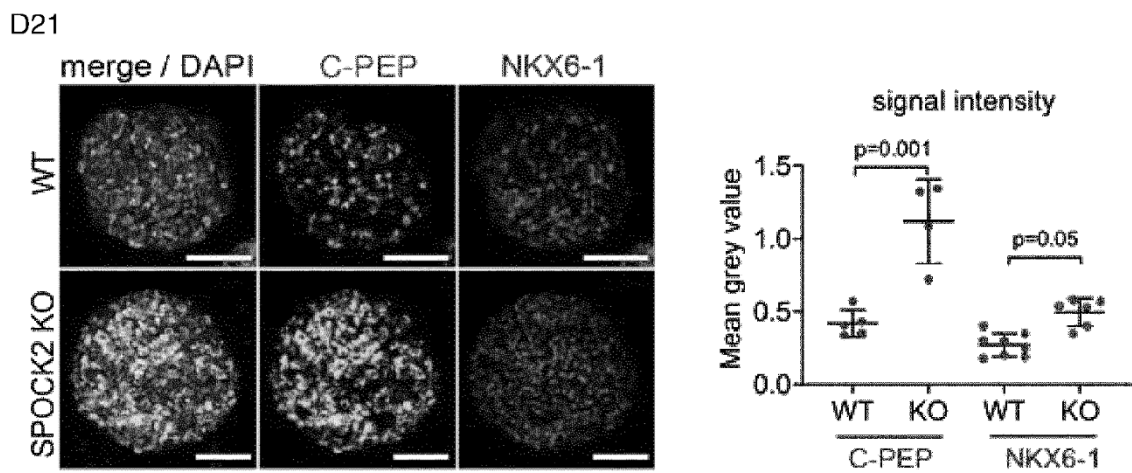


fig 5

D21

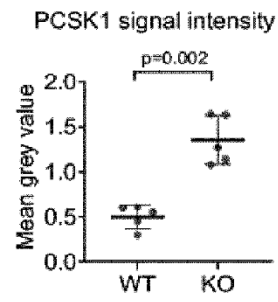
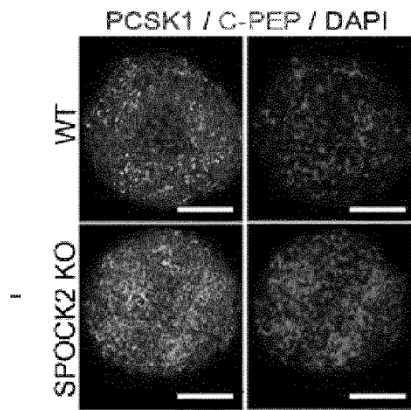


fig 6

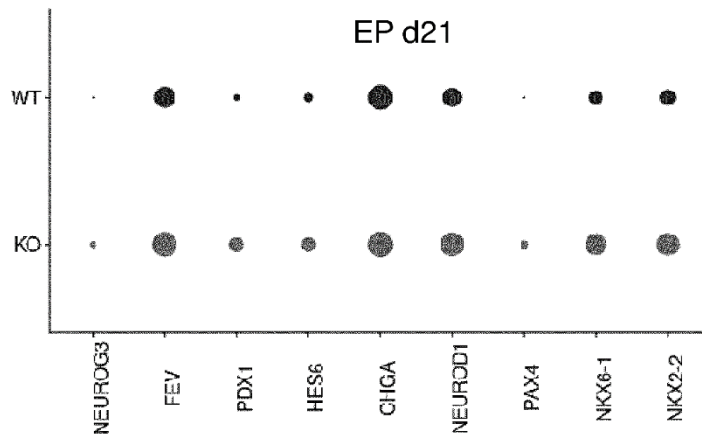


fig 7

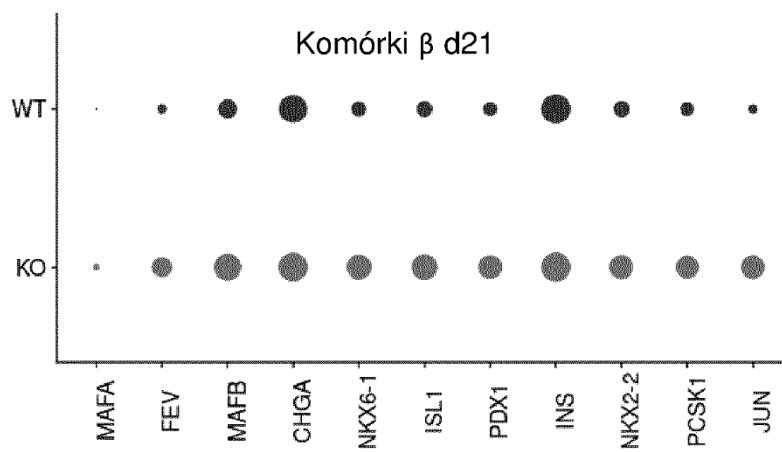


fig 8

D21

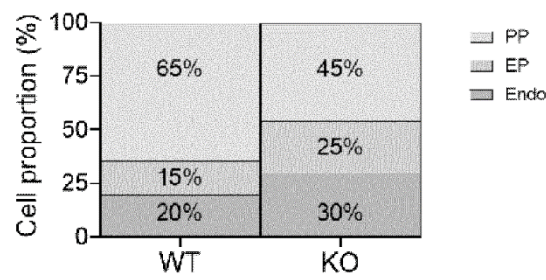


fig 9

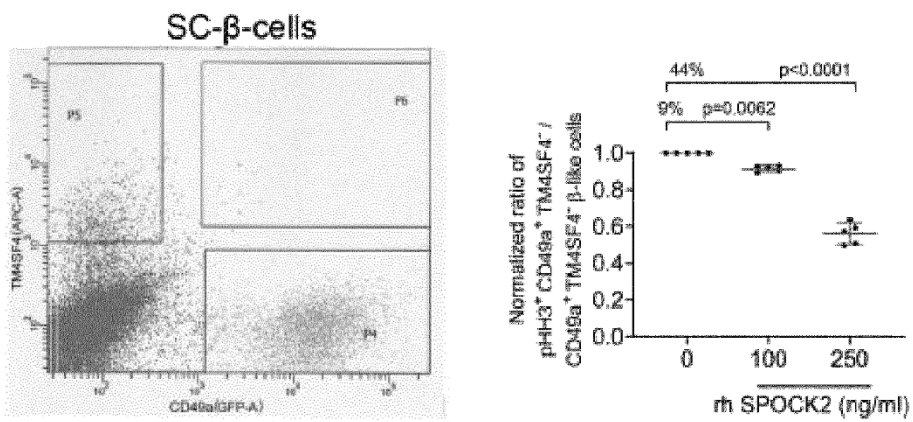


fig 10

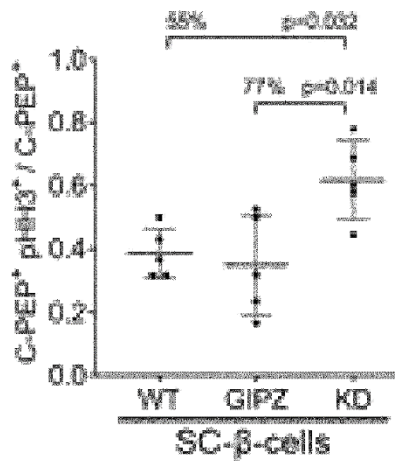


fig 11

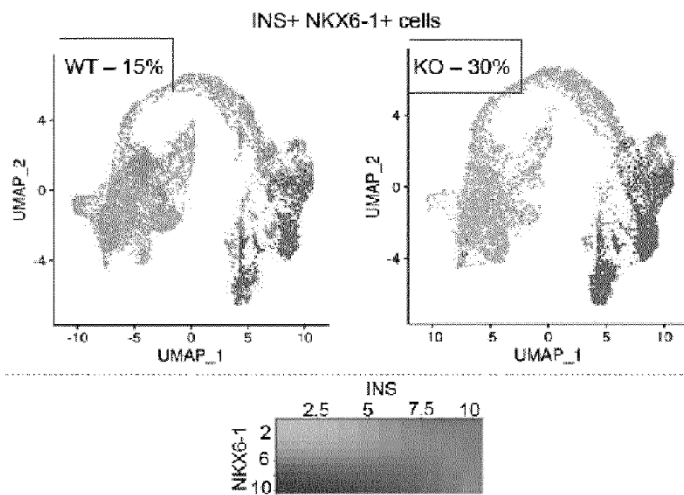


fig 12

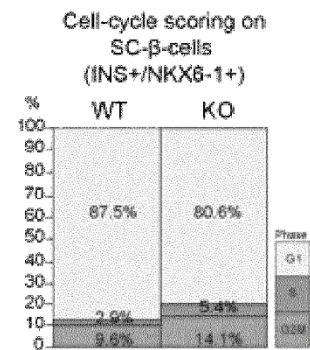


fig 13

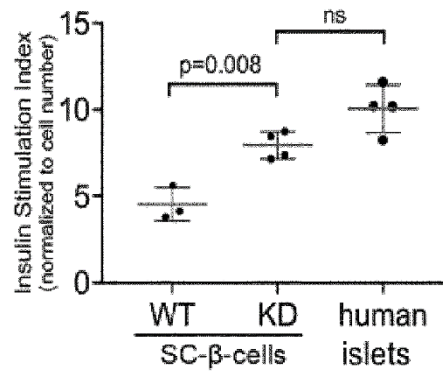
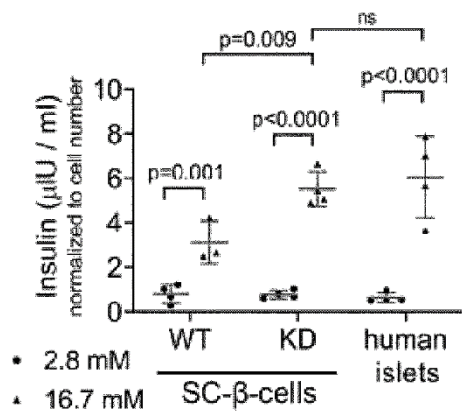


fig 14