



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Gernutik lortutako zelula ama
mesenkimalak (hUSC)
pseudohipoparatiroidismoaren
(PHP) terapia geniko ez-biralerako**

*Yerai Vado, Jose Luis Pedraz,
Guiomar Perez de Nanclares
eta Jon Zarate*

61-67 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.07>



Gernutik lortutako zelula ama mesenkimalak (hUSC) pseudohipoparatiroidismoaren (PHP) terapia geniko ez-biralerako

Vado, Y.^{1,2}, Pedraz, J.L.¹, Perez de Nanclares, G.², Zarate, J.¹

¹NanoBioCel Ikerketa Taldea, Farmazia eta Elikagaien Zientziak Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), BioAraba Osasun Ikerketa Institutua, Networking Research Center of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Araba, Espainia.

²Gaixotasun Arraroen Ikerketa Taldea, (Epi)Genetika Molekularreko Laborategia, BioAraba Osasun Ikerketa Institutua, Arabako Unibertsitate Ospitalea-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Araba, Espainia.

yerai.vado@ehu.eus

Laburpena

Zelula ama mesenkimalak (MSC) giza gorputzean hainbat nitxotan aurkitzen diren zelula ama heldu multipotenteak dira. Gizakien gernutik lortutako MSCak (hUSC), ohiko MSCen abantaila biologiko guztiak mantentzen dituzte eta era ez-inbaditzailean lortzen dira. Pseudohipoparatiroidismoa (PHP) gaixotasun (epi)genetiko talde heterogeneo eta arraroa da, hormona paratiroidearen (PTH) aurkako erresistentziak ezaugarritzen dituena. Ikerketa honetan hUSCak isolatzeko protokoloa garatu dugu eta niosoma deritzan bektore ez-biral lipidikoekin transfektatzeko prozedura zehaztasunez aztertu dugu, etorkizunean PHP moduko gaixotasunen terapia genikoan aplikatu ahal izateko.

Hitz gakoak: pseudohipoparatiroidismoa, hUSC, bektore ez-biralak, niosomak, terapia genikoa.

Abstract

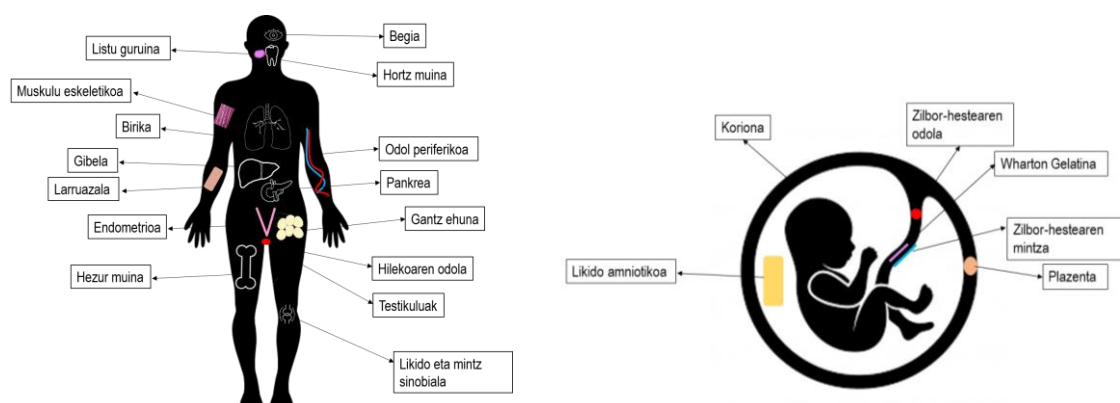
Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult multipotent stem cells that can be found in several niches. Human urine-derived mesenchymal stem cells (hUSCs) maintain the advantages of MSCs and in addition, they can be isolated in a non-invasive way from an easily accessible source. Pseudohypoparathyroidism (PHP) is a heterogeneous group of (epi)genetic disorders characterized by parathyroid hormone (PTH) resistance. In this research, we have developed and validated a protocol based on the non-viral vectors known as niosomes for transfecting hUSCs. This strategy could be used in the future with gene therapy purposes in genetic diseases such as PHP.

Keywords: pseudohypoparathyroidism, hUSC, non-viral vectors, niosomes, gene therapy

1. Sarrera eta motibazioa

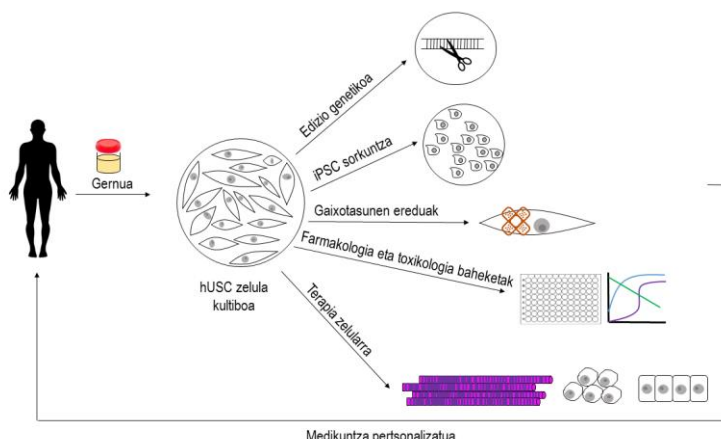
Zelula ama mesenkimalek (MSC) autoberriztapenerako gaitasuna dute, multipotenteak dira eta egonkortasun genomiko bikaina mantentzen dute kultiboan (Horwitz et al., 2005). Era berean, zelulak pazientearengandik bertatik lor daitezke, hau da, jatorri autologoa izan dezakete, eta, kasu horietan, ez dute inolako erantzun immunerik sustatzen (Chen et al., 2018).

1. Irudia. MSCak aurkitu daitezkeen nitxoak, gorputz helduan (ezkerra) eta fetuan (eskuina).



2008an, Zhang eta kideek lehen aldiz deskribatu zuten giza gernutik isolatutako zelula ama mesenkimalen (hUSC) kultiboa (Zhang et al., 2008). Gainerako MSCen erara, hUSCek ugaltzeko eta autoberritzeko gaitasun handia dute eta hainbat zelula leinutan diferentziatzeko potentziala mantentzen dute (Guan et al., 2014). Era berean, beste nitxo batzuetatik lortutako MSCekin alderatuta, hUSCak modu ez-inbaditzaile, erraz eta seguruan isolatu daitezkeenez, jatorri autologoko zelula gisa hainbat gaixotasun tratatzeko potentzial handia dute (Pavathuparambil et al., 2018). Izan ere, hUSC zelulei lotutako hainbat aplikazio kliniko aurki daitezke (2. Irudia). Adibidez, hainbat esparrutan terapia genikorako erabili dira, hala nola patologia neurologikoetan eta baita tumore-hazkundera murrizteko ere (Reiser et al., 2005).

2. Irudia. hUSCen aplikazioak. Irudi honen bidez, hUSCek gernutik jaso eta kultibatu ondoren izan ditzaketen aplikazioak eskematizatzen dira.



Pseudohipoparatiroidismo (PHP) gisa ezagutzen diren adierazpen kliniko ezberdinetan, *GNAS* genearen mailako aldaera genetikoak zein lokus mailako inprontaren alterazioak deskribatu dira (Turan eta Bastepe, 2013). PHPa hormona paratiroideoaren (PTH) aurkako erresistentziak eta hipokaltzemiak eta hiperfosfatemiak ezaugarritzen dituen gaixotasun (epi)genetiko talde heterogeneo eta arraroa da.

Azken urteotan gene-terapiari bektore ez-biralak erabili dira bektore biralen alternatiba gisa. Bektore ez-biralak fabrikatzeko errazagoak eta merkeagoak dira, eta printzipioz tamaina mugagabeko material genetikoak garraiatu dezakete. Gainera, seguruagoak dira, ez baitute erantzun immunerik sortzen (Mintzer eta Simanek, 2009). Bestalde, bektore ez-biralek duten desabantailarik handiena transfekzio-tasa baxua da, eta, aldi berean, material genetiko exogenoaren adierazpen-denbora laburra (Pezzoli et al., 2012). Bektore ez-biralen artean, gehien aztertu eta erabiltzen direnak nanopartikula lipidikoak dira, bereziki liposomak (Pezzoli et al., 2013).

Niosomak liposomen ordezkari moduan erabili daitezkeen bigeruzko lipidikoko besikula esferikoak dira. Bere egitura dela eta, material hidrofobikoak eta lipofobikoak garraiatu ditzakete (Moghassemi eta Hadjizadeh, 2014). Liposomekin alderatuta, niosomak ez dira hain toxikoak zelularentzat, hauen ekoizpena errazagoa eta merkeagoa da, maneia seguruagoa da eta, gainera, kimikoki egonkorragoak dira (Marianecchi et al., 2014). Helburua zelulan material genetiko sartzea denean, niosoma kationikoak ekoiztu eta elkarrekintza elektrostatikoen bidez azido nukleikoak mintzeko besikuletara errazago batu daiteke (Ma et al., 2007).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa taldeak zenbait urte daramatza terapia genikorako bektore ez-biralak garatzen, bereziki niosoma kationikoak (Grijalvo et al., 2019). Bektore ez-biralak MSCen bidezko terapia genikoan erabiltzeko hautagai egokiak izan daitezke. Terapiarako hautagai diren geneak garraiatzaile ez-biralen laguntzarekin MSCetan transfektatu daitezke eta dagokion transgenea adierazi daiteke zelula hauetan. Nahiz eta MSCen bidezko terapia genikoa estrategia nahiko

berria izan, zenbait gaixotasun genetikoren tratamendurako aukera oso egokia izan daiteke (Mohammadian et al., 2016). MSCak are interesgarriagoak bihurtzen dira, hUSCen kasuan bezala, gaixoarengandik modu ez-inbaditzaile, erraz, sinple eta seguruan isolatu daitezkenen.

2.1. Helburu nagusia

Ikerketa lan honetan arlo klinikoko eta unibertsitateko ikertzaileok bat egin dugu ondorengo helburu nagusia lortu nahian: PHP eragiten duten *GNAS* genearen mutazio ezagunak zuzentzea helburu duen hUSC zeluletan eta bektore ez biraletan oinarritutako terapia genikorako protokoloa diseinatzea eta balidatzea. Aukera ezberdinen artean, genetikoki manipulaturako hUSC zelula autologoak ex vivo transferitzeko estrategia daukagu begiz jota.

2.2. Azpihelburuak

- 1) Ospitaleko pazienteen gernutik hUSCak erauzi eta *in vitro* kultibatzeke prozedimendua garatzea.
- 2) Gernutik isolaturako zelulak benetan MSCak direla balidatzea.
- 3) hUSCak genetikoki manipulatzeko material genetikoaren bektore moduan erabiliko den niosoma diseinatzea eta fisikokimikoki karakterizatzea.
- 4) hUSCetan niosomaren bidezko genearen transfekzio prozesuaren ezagutza handitzea eta efizientzia neurtzea.

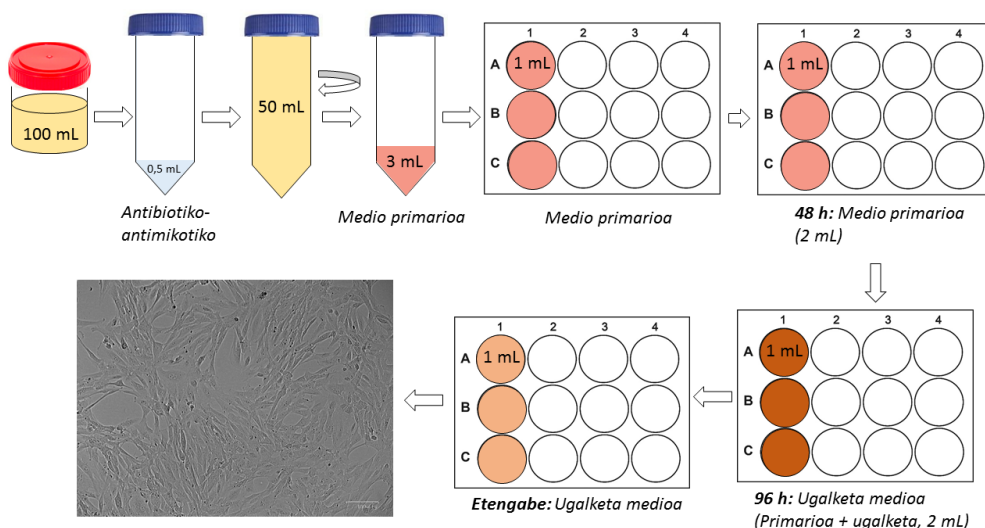
3. Ikerketaren muina

Atal honetan ikerketako helburuak betetzeko ospitalean eta laborategian buruturiko ekintzak edota entseguak eta lortutako emaitza nagusiak deskribatzen dira.

3.1. Pazienteen gernutik hUSCen erauzketa eta *in vitro* kultiboa

Zelulen isolaketarako, Chen C-Y. eta kideek (Chen et al., 2018) garaturako protokoloa jarraitu da (3. Irudia).

3. Irudia. Gernutik hUSCak erauzteko prozesua. Prozesuaren amaieran lortutako kultiboaren argazkia ageri da.



Pazienteengandik gernua jaso eta zentrifugazio eta garbiketa prozesuak burutu dira. Lehenengo, zelulak medio primario deituriko mediotan (konposaketa zehatza aurretik aipaturako erreferentzian dago) erein dira. Erein eta hiru egunetara, ugalketa medioa (Chun-

Yuan C.-ren artikuluan deskribatuta) erabili da medio primarioarekin batera. Laugarren egunetik aurrera, zelulen hazkuntzarako ugalketa medioa bakarrik erabili da. Gutxi gorabehera, laugarren egunean lehenengo zelulak ikusi dira. Zelula hauek luzangak dira eta populazio homogeneoa eraten dute.

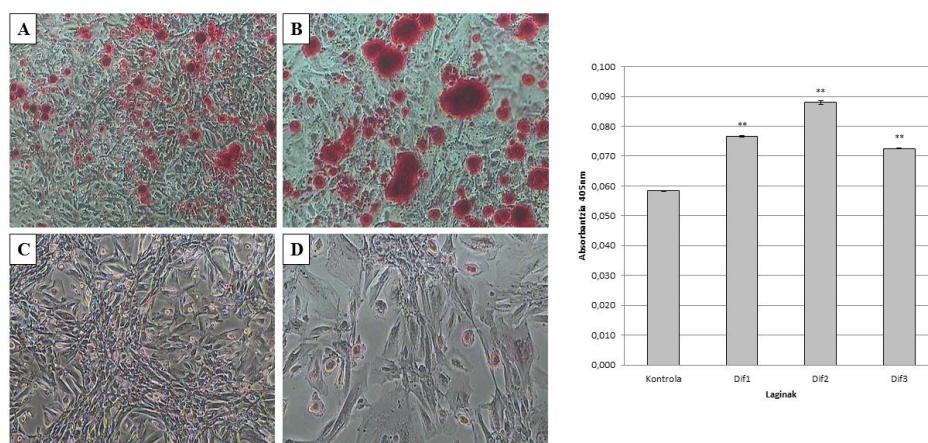
3.2 Isolatutako hUSCen balidazioa

Gernutik isolatutako zelulak benetan MSCak direla frogatzeko, bi entsegu bideratu dira.

3.2.1. Osteozitoetara diferentziazteko gaitasuna frogatzeko entsegua

hUSCek osteozitoetara diferentziazteko duten gaitasuna aztertu da “*StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit*” erabilita. Behin protokoloa burututa, *Alizarin red* tindaketarekin baieztatu da osteozitoetara diferentziazioa gertatu den edo ez. Gainera, mikroskopiorekin ikustez gain, kaltzio kuantifikatu da, kontrol negatibo batekin konparatuz.

4. Irudia. Ezkerreko irudietan, *Alizarin red* tindaketa egin eta gero diferentziazitutako zelulen (A: 4X, B: 10X) eta kontrol negatiboen (C: 4X, D: 10X) mikroskopioko argazkiak ikusi daitezke. Gorritz kaltzio pilaketak ikusten dira A eta B irudietan. Era honetan, bisualki frogatzen da tratatutako zelulak osteozitoetara diferentziatu direla. Eskuineko grafikan, kaltzioaren kuantifikazio kolorimetrikoa adierazten da (absorbantzia 405 nm). Mann-Whitney's test estatistikoa gauzatu da eta ezberdintasun esanguratsuak (** $p < 0,01$) aurkitu dira tratatutako laginen (Dif1, Dif2 eta Dif3) eta kontrolaren artean.



3.2.2. Fluxu-zitometria

Terapia Zelularrerako Nazioarteko Elkarteak (ISCT) zehazten duen moduan, zelula kultibo batean zelula mesenkimalak daudela esan ahal izateko, fluxu-zitometria bidez mintzeko markatzaile batzuk ikusi behar dira (zelulak positiboak izan behar dira horietarako) eta beste batzuen gabezia egon behar da (zelulak negatiboak izan behar dira). Gure kasuan, markatzaile positiboak CD73, CD90 eta CD105 izan dira eta negatiboak CD14, CD34 eta CD45. Entsegurako, gernutik lortutako zelulez gain, kontrol positibo gisa zelula mesenkimal komertzialak erabili dira eta kontrol negatibo gisa HEK293 zelula epitelialak.

2. Taula. Mintzeko proteina bakoitzeko lortu diren zelula positiboen portzentajea adierazten da. CD73, CD90 eta CD105 antigenoak espezifiki adierazten dira zelula mesenkimaletan eta CD14, CD34 eta CD45 ez dira adierazten. FITC, APC, PE eta AlexaFluor488 fluoroforoak erabili dira.

	Positiboak (>%95)			Negatiboak (<%2)		
	CD73-AlexaFluor488	CD90-APC	CD105-PE	CD14-FITC	CD34-APC	CD45-PE
MSC komertzialak	%63,4	%81,7	%70,1	%0,8	%1,3	%20,5
hUSCak	%78,6	%86,4	%66,1	%6,8	%13,4	%52,4
HEK293	%36,5	%0,9	%3,5	%2,8	%0,8	%11,3

Zitometroko emaitzetan ez da ISCTak ezartzen duen balio minimoa lortu (%95 markatzaile positiboetarako). Hala ere, argi ikusten da markatzaile positiboetarako portzentaje altuak lortzen direla eta negatiboetarako ez dagoela ia seinalerik. Gainera, zelula komertzialak eta laborategian isolatutako hUSCak antzeko emaitzak dituzte, batez ere markatzaile positiboetarako. Espero zen moduan, HEK293 zelulek ez dute seinalerik ematen MSC zelulen markatzaile espezifikoekin.

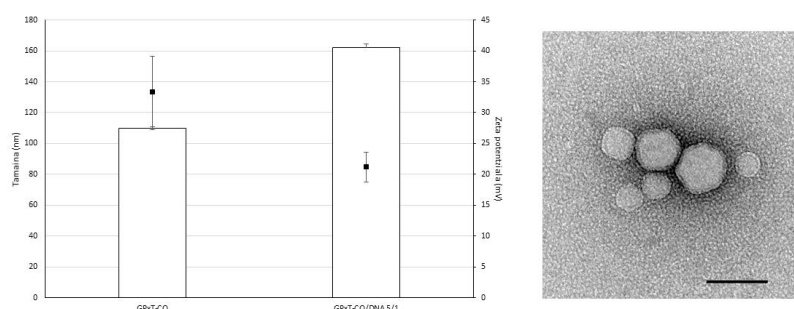
3.3. Niosomen diseinua eta karakterizazio fisikokimikoa

Niosomen sintesirako, fase lurrunketa alderantzikatua teknika erabili da. Alde batetik, disoluzio hidrofobikoa eta bestetik, disoluzio hidrofilikoa prestatu dira. Ondoren, bi disoluzioak batu eta sonikazio bidez emulsiionatu dira. Jarraian, irabiaketa mekanikoarekin disolbatzaile organikoa lurruntzen utzi eta niosomen esekidura lortu da, 1 mg/mL-ko kontzentrazioduna.

Karakterizazio fisikokimikorako *Z-sizer*-arekin partikulen tamaina eta karga (zeta potentziala) neurtu dira. Bestalde, besikulen morfologia ezagutzeko, transmisiozko mikroskopio elektronikoa (TEM) erabili da. GPxT-CQ formulazioaren niosoma/DNA proportzio desberdinak frogatu ostean, 5/1 erlazioa duten nioplexoek (niosomak eta DNA elkartzean sortzen diren konplexuak) erakutsi dituzte ezaugarri fisikokimiko onenak.

Tamainari dagokionez, espero zen moduan, tarte nanometrikoan aurkitzen dira. Niosomek biluzik 110 nm dituzte eta 162 nm-ra arte handitzen da DNA gehitzean. Niosomaren karga $+33,4 \pm 5,7$ mV-ekoa da. Karga hori $+25$ mV baino handiagoa denez, DNA arazorik gabe lotu dakioke (Hosseinkhani eta Tabata, 2006). Behin DNA gehituta, nioplexoaren zeta potentziala $+21,2 \pm 2,4$ mV-ekoa da. Mikroskopiotik behatzerakoan, besikulak forma esferikoa dute eta ez dute agregaturik erakusten. Gainera, baieztatzen da esperotako tamaina dutela (100 nm inguru).

5. Irudia. Bektore ez-biralen karakterizazio fisikokimikoa. Ezkerrean tamaina (zutabe zuria) eta zeta potentziala (lauki beltza) (n=3). Eskuinean TEM irudia (eskala barra 100 nm eta handipena 80.000X).



3.4. Transfekzio, zelulan barneratze eta banaketa *in vitro* entseguak

3.4.1. Transfekzio entseguak

Proteina berde fluoreszentea (GFP) duen plasmidoa erabili da gene erreportari gisara. Esperimentu honetan, lipido kationiko/DNA erlazio desberdinak frogatu dira eta fluxu-zitometria bidez transfekzioaren efizientzia eta zelulen bideragarritasuna neurtu dira. Transfekzioaren kontrol positibo gisa lipofektamina komertziala erabili da. Kontrol positiboarekin alderatuz, 5/1 erlazioan prestatutako GPxT-CQ nioplexoek (GPxT-CQ/DNA 5/1) izan dute emaitzarik onena: $6,81 \pm 0,8$ -ko transfekzio efizientzia eta $77,5 \pm 4,7$ -ko zelula-bideragarritasuna. Ez da oso transfekzio tasa altua, baina bibliografian deskribatu da zelula kultibo primarioak transfektatzea zaila dela (de Carvalho et al., 2018).

3.4.2. Zelulan barneratze eta banaketa entseguak

Transfekzio maila baxua ikusita, barneratze entsegua burutu da niosomak zelula barrura sartzen direla ziurtatzeko. Horretarako, kasu honetan plasmidoa FITC fluoroforoa du atxikita, nioplexoaren jarraipena gauzatu ahal izateko. Kasu honetan ere kontrol positibo gisa lipofektaminarekin osatutako lipoplexoa erabili da. GPxT-CQ/DNA 5/1 nioplexoaren

barneratzea zelulara $15,16 \pm 1,07$ -koa izan da eta zelulen bideragarritasuna $64,2 \pm 1,05$ -koa. Beraz, esan daiteke prestatutako formulazioa zelulara sartzen dela eta gainera, lipofektaminak baino toxikotasun txikiagoa erakusten du.

Behin baieztatuta nioplexoak zelulan barneratzen direla, zelulan ze bidetik sartzen diren eta behin barruan nola banatzen diren ikertu da. Kasu honetan, zelulara sartzeko dauden bide desberdinak (kabeolak, klatrinak, makropinozitosia) eta lisosomak fluoreszentiarekin gorritz markatu dira. Ondoren, niosomaren fluoreszentzia berdea ze biderekin kolokalizatzen den begiratu da mikroskopia konfokalean. Mikroskopioan kolokalizazioa ikusteaz gain, CCF funtzioa (*cross-correlation function*) erabiltu kuantifikatu da. Guzti hau eginda, ondorioztatu daiteke GPxT-CQ/DNA nioplexoa batez ere kabeolen bidetik sartzen dela zelulara. Alabaina, ez dago kolokalizaziorik lisosomekin. Honek esan nahi du nioplexoak ez direla elkartzen lisosomekin eta beraz, ez direla degradatuko zelulara sartu bezain pronto.

4. Ondorioak

Batetik, ikerketa honek hUSCak pazientetik modu ez-inbaditzaile, erraz, sinple eta seguruan isolatzeko lehen protokoloa deskribatzen du. Bestetik, ikerketa honetan garatutako nioplexoek hUSCetan trasfekzio-efizientzia txikia erakutsi duten arren, lortutako emaitzekin transfekzio prozesu konplexuaren ezagutza handitu da aurrera begira hobekuntza ekarriko duten estrategiak diseinatu ahal izateko. Azkenik, agerian gelditzen da hUSCak iturri oso interesgarriak direla biralak ez diren bektoreekin burututako terapia genikorako edota aurrerantzen aztertu beharreko beste aplikazio kliniko batzuetarako.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Oraindik fase oso goiztiarrean dauden eta optimizazioa behar duten entseguak dira lan honetan aurkeztutakoak. Hala ere, zelula hauek pazientearengandik erraz lortzen direnez, medikuntza pertsonalizaturako gaixotasun eredu zehatzak garatzeko oso interesgarriak dira. Horrez gain, zelula hauek potentzial handia izan dezakete klinikaren beste alor batzuetan, terapia zelularrean esaterako.

6. Erreferentziak

- Chen, C-Y. et al. (2018), Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis, *Theranostics*, 8(6), 1607-1623.
- Chen, L. et al. (2018), Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy of Cartilage Defects, *Stem Cells International*, 4686259.
- de Carvalho, T.-G. et al. (2018), A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells, *Biotechnology Letters*, 40, 617-622.
- Grijalvo, S. et al. (2019), Cationic Niosomes as Non-Viral Vehicles for Nucleic Acids: Challenges and Opportunities in Gene Delivery, *Pharmaceutics*, 11(2), 50-73.
- Guan, J.-J. et al. (2014), Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology, *Tissue Engineering Part A*, 20, 1794-1806.
- Horwitz, E. M. et al. (2005), Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 7, 393-395.
- Hosseinkhani, H. eta Tabata, Y. (2006), Self Assembly of DNA Nanoparticles with Polycations for the Delivery of Genetic Materials into Cells, *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2320-2328.
- Ma, B. (2007), Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 123, 184-194.
- Marianecchi, C. et al. (2014), Niosomes from 80s to present: the state of the art, *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 187-206.
- Mintzer, M.-A. eta Simanek, E.-E. (2009), Nonviral vectors for gene delivery, *Chemical Reviews*, 109, 259-302.

- Moghassemi, S. eta Hadjizadeh, A. (2015), Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review, *Journal of Controlled Release*, 185, 22-36.
- Mohammadian, M. et al (2016), Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(5), 1206-1211.
- Pavathuparambil, A.-M. et al. (2018), Urine-derived cells for human cell therapy, *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 180-191.
- Pezzoli, D. (2012), We still have a long way to go to effectively deliver genes!, *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 10, 82-91.
- , (2013), Lipid-Based Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors, *Methods in Molecular Biology*, 1025, 269-279.
- Reiser, J. et al. (2005), Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 1571-1584.
- Turan, S. eta Bastepe, M. (2013), The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene, *Hormone Research in Paediatrics*, 80, 229-2411.
- Zhang, Y. et al. (2008), Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction, *Journal of Urology*, 180, 2226-2233.

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau hainbat dirulaguntzari esker burutu ahal izan da: EITB Maratoia (BIO16/ER/005), Euskal Herriko Unibertsitatea (PIF17/29) eta Eusko Jaurlaritza (PRE_2017-1-0365). Asistentzia tekniko eta intelektuala eskertuko nahiko genioke “NANBIOSIS” plataformari, zehazki, Bioingeniaritza, Biomaterial eta Nanomedikuntza CIBER (CIBER-BBN) medikamendu formulazio unitateari (U10), Euskal Herriko Unibertsitatean. Ikerketa aurrera eramateko, idatzi honen autoreaz gain beste pertsona batzuek hartu dute parte: Myriam Sainz-Ramos eta Gustavo Puras doktorea (NanoBioCel Ikerketa Taldea), Arrate Pereda doktorea (Gaixotasun Arraroen Ikerketa Taldea), Shifa Jebari-Benslaiman eta Cesar Martin doktorea (Biofisika institutua) eta Melania Rosique eta Marian Martinez de Pancorbo doktorea (BIOMICS Ikerketa Taldea).
- Lan hau Yerai Vadoren tesirako ikerketaren atal bati dagokio. Gainera, aldizkari zientifiko batean argitaratzeko bidean dago.