



THE MATRIX RELOADED:
CREATING LIVER TISSUE USING MATRIX AND ORGANOIDS



Jorke Willemse

Samenvatting proefschrift J. Willemse

“The matrix reloaded - Creating liver tissue using matrix and organoids”

**Promotie: 16 maart 2022
Erasmus Universitair MC**

Promotor:
Prof. dr. L.J.W. van der Laan

Copromotor:
Dr. ing. M.M.A. Verstegen
Dr. J. de Jonge

Levertransplantatie is de enige behandelingsoptie voor patiënten met eindstadium leverfalen. Helaas is er een tekort aan donororganen en voor 20% van de patiënten komt er niet tijdig een geschikt donororgaan beschikbaar. Het kweken van functioneel weefsel in het laboratorium (tissue engineering) zou een alternatieve oplossing voor het tekort aan donororganen kunnen zijn. Dit gekweekte leverweefsel kan vervolgens gebruikt worden om hepatobiliaire ziektes te bestuderen of voor het transplantatiedoeleinden. Om leverweefsel in het laboratorium te kunnen kweken is er een structuur (scaffold) nodig die de levende cellen kan ondersteunen. Decellularizatie is een veelbelovende methode om weefsel-specifieke acellulaire scaffolds te verkrijgen voor regeneratieve tissue engineering applicaties. The extracellulaire matrix (ECM) bestaat uit een complexe mix van eiwitten en proteoglycanen. Deze componenten zijn in een zeer weefsel-specifieke manier terug te vinden in de lever en beïnvloeden het gedrag van de cellen. Het doel van decellularizatie is om alle cellen uit een weefsel te verwijderen en tegelijkertijd de ECM, inclusief de architectuur van het orgaan, te behouden. De ECM van de lever kan vervolgens gebruikt worden om lever weefsel te creëren door cellen te introduceren (recellularizatie) in de acellulaire matrix. Het merendeel van de functies van de lever wordt uitgevoerd door hepatocyten. Deze cellen metaboliseren verschillende substanties, maar produceren ook substanties als eiwitten, koolhydraten en gal. Het geproduceerde gal wordt afgevoerd via steeds groter wordende galwegen. Omdat het gal toxisch is, moet de lever beschermd worden tegen gal. Deze taak wordt vervuld door de cholangiocyten, die te vinden zijn in de galwegen. Andere benodigde cel types zijn endotheelcellen (bloedvaten), stroma cellen en Kuppfer cellen. Deze cellen moeten worden geëxpandeerd in het laboratorium voordat ze kunnen worden gebruikt om de lege ECM te recellulariseren. Isolatie en expansie van hepatocyten en cholangiocyten is uitdagend en lange termijn kweek is nagenoeg onmogelijk als er gebruik wordt gemaakt van traditionele celkweek methodes. Cholangiocyte organoiden zijn een aantrekkelijke alternatieve bron van menselijk cholangiocyten.



De organoiden kunnen worden geïnitieerd vanuit relatief kleine biopten, maar kunnen door hun hoge en stabiele proliferatie capaciteit wel grote hoeveelheden cellen opleveren.

Het doel van dit proefschrift was het uitzoeken of gedecellularizeerde lever ECM en cholangiocyte organoiden kunnen worden gebruikt om lever weefsel te kweken in het laboratorium. In dit proefschrift wordt beschreven hoe decellularizatie protocollen voor menselijke en varkens levers worden opgezet om scaffolds te verkrijgen van lever weefsel (**deel 1**). Vervolgens, wordt er ook onderzocht of cholangiocyte organoiden worden gebruikt om lever ECM (**deel 1**) en extrahepatische galweg ECM (**deel 2**) te recellulariseren. In **deel 3** wordt gekeken of hydrogels afgeleid van lever ECM kunnen worden gebruikt als weefselspecifieke en klinisch relevante kweek substraten voor de initiatie en expansie van organoiden.

Hoofdstuk 1 geeft een korte uitleg over de concepten van tissue engineering, lever decellularizatie en cholangiocyte organoiden. Dit hoofdstuk legt ook uit waarom deze concepten van belang zijn voor dit proefschrift. Dezelfde concepten worden verder uitgediept en besproken in **hoofdstuk 2**. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe een protocol gebaseerd op perfusie voor de decellularizatie van hele human levers wordt opgezet. In totaal werden er 11 levers volledig gedecellulariseerd. Dit werd bevestigd op basis van histologische kleuringen en kwantificatie van de hoeveelheid overgebleven RNA en DNA. De architectuur van levers werd behouden. Dit hoofdstuk laat ook de recellularizatie van de lever ECM zien met human mesenchymale stromale cellen en endotheelcellen uit de navelstreng. De resultaten laten zien dat herpopulatie van de bloedvaten met deze cellen mogelijk is. Het decellularizatie protocol is verder geoptimaliseerd in **hoofdstuk 4** door te veranderen van een protocol met een vaste stroomsnelheid naar een protocol met druk gestuurd stroomsnelheden. Het druk gestuurde protocol reduceerde de tijd benodigd voor het complete decellulariseren van lever weefsel van 4 tot 6 dagen naar 20 uur voor humane levers. In dit hoofdstuk laten we ook zien dat het gebruik van Triton-X-100 als detergentia voor het decellulariseren van varkenslevers meer collageen en gesulfideerde glycosaminoglycanen behoudt dan wanneer een combinatie van Triton-X-100 en sodium dodecyl sulfate wordt gebruikt. Gedecellularizeerde lever segmenten kunnen worden herbevolkt met een cellijn afgeleid van een hepatocellulair carcinoom (HepG2). De recellularizatie efficiëntie van intrahepatische cholangiocyte organoiden (ICO) op kleine ECM-schijven (Ø8mm, dikte: 200µm) gemaakt van gedecellularizeerde levers werd getest in **hoofdstuk 5**. De ICO konden het oppervlakte van de lever ECM-schijven bedekken, maar de cellen groeiden niet de ECM in. De cellen hadden een cholangiocyte-achtig uiterlijk na 21 dagen in kweek op de lever ECM-schijven. Ook brachten de cellen volwassen cholangiocyte markers tot expressie. De aanwezigheid van de lever ECM zorgde voor een verhoogde expressie van de hepatocyte marker CYP-3A4. Deze expressie was 546x hoger nadat de cellen richting hepatocyten werden gedifferentieerd dan bij cellen die in controle condities werden gedifferentieerd. Daarentegen was de expressie van andere hepatocyte markers niet significant verhoogd.



De cholangiocyte organoiden worden doorgaans geïnitieerd van cellen uit weefsel biopsies, zoals lever biopsies (ICO) of extrahepatisch galwegweefsel (extrahepatische cholangiocyte organoiden, ECO).

Hiervoor moeten echter wel invasieve en mogelijk gevaarlijke biopsies worden genomen. In gal monsters kunnen ook losse circulerende cholangiocyten worden gevonden. In **hoofdstuk 6** wordt de mogelijkheid om deze circulerende cholangiocyten te gebruiken om cholangiocyte organoiden (BCO) te initiëren verder onderzocht. Deze organoiden zijn vervolgens vergeleken met cholangiocyte organoiden van dezelfde donor welke zijn geïnitieerd vanuit weefsel biopsies. BCO brengen regio-specifieke genen tot expressie en het is aannemelijk dat de cellen van extrahepatische origine zijn. De cellen afkomstig van de BCO konden vervolgens gebruikt worden om humane extrahepatische gal weg scaffolds te herbevolken. In **hoofdstuk 7** wordt het succesvol verwijderen van cellen van de extra-hepatische galwegen beschreven. Vervolgens wordt de herpopulatie efficiëntie van verschillende type cholangiocyte organoiden (ICO, ECO en BCO) onderzocht op deze extrahepatische gal weg scaffolds.

De organoiden zijn veelbelovende bronnen van galweg cellen voor tissue engineering applicaties, maar de directe klinische toepassingen van deze cellen worden gelimiteerd door het gebruik van materialen die niet voldoen aan de richtlijnen van Good Manufacturing Practice (GMP). Deze materialen, basaalmembraan extracten (BME), worden gebruikt als kweek substraat voor de initiatie en expansie van organoiden. **Hoofdstuk 8** gaat dieper in op de potentiële klinische toepassingen van de cholangiocyte organoiden. Hier wordt ook de noodzaak van andere klinisch relevante kweek substraten besproken. Weefsel-specifieke ECM-extracten vormen een interessant alternatief, omdat deze bestaan uit bioactieve en weefsel-specifieke ECM-componenten. Deze ECM-extracten worden bereid van gedecellulariseerde varkens en human levers. In **hoofdstuk 9** worden deze extracten gebruikt om hydrogelen te maken en worden deze hydrogelen uitgetest om te bepalen of deze kunnen dienen als kweek substraat voor de expansie van organoiden. ICO zijn succesvol overgebracht naar deze lever ECM hydrogelen. Dit had geen significant effect op de expressie van cholangiocyte markers, maar de proliferatie was wel lager dan in BME-controles. In dit hoofdstuk laten we ook zien dat BME niet nodig is voor de initiatie van organoiden. BME kan succesvol worden vervangen door de lever ECM hydrogelen. De aanwezigheid van weefsel-specifieke lever ECM-componenten was niet van invloed op de differentiatie capaciteit van ICO naar hepatocyte-achtige cellen. Lever ECM-extracten konden ook worden gebruikt in een dynamische kweek opstelling voor de expansie van ICO.

Hoofdstuk 10 is een algemene discussie en er wordt ook naar de toekomst van decellularisatie en recellularisatie technieken van human levers gekeken. Het kweken van functioneel lever weefsel in het laboratorium is een aantrekkelijke aanpak om betere ziekte modellen te ontwikkelen voor het bestuderen van verschillende hepatobiliaire ziekten of om grote functionele en transplanteerbare stukken lever weefsel te creëren.