

# Charakterisierung humaner duodenaler und ilealer Organoide in Langzeitkultur und erste Organoid-Anwendung

Leandra Zürcher, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Mukosale Immunologie, DBMR

## 1. Zusammenfassung

In diesem Projekt werden Organoide, Miniaturversionen von Organen, welche als *in vitro* Modelle zur Erforschung der Interaktion zwischen Mikrobiota, Ernährung und Darmepithel dienen, verwendet. Zunächst wird untersucht, ob murines und humanes *ex vivo* Darmgewebe dieselben charakteristischen Genexpressionen aufweisen und ob diese Eigenschaften nach zweimonatiger Kultur der humanen Darmorganoide erhalten bleiben. In der ersten Anwendung der Organoide wird die Barrieregenexpression nach Exposition mit humaner Muttermilch untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass murine und humane Charaktereigenschaften verschieden sind. Die Eigenschaften bleiben aber nach zweimonatiger Kultur noch erhalten. Zudem zeigt sich, dass die Milchproben keinen signifikanten Einfluss auf die Barrieregenexpression haben. Das Experiment sollte mit einer höheren Muttermilchkonzentration wiederholt werden.

## 2. Einleitung

Humane intestinale Organoide entstehen aus adulten multipotenten Stammzellen. Unter Einfluss des Differenzierungsmediums entstehen Organoide mit allen Darmzelltypen. Differenzierte Organoide, auch Enteroid genannt, werden für Experimente genutzt [1]. Die Dünndarmabschnitte Duodenum und Ileum weisen durch ihr unterschiedliches Resorptionsverhalten verschiedene Charaktereigenschaften auf. Murines Gewebe exprimiert charakteristische Gene wie folgt:

Tabelle 1: Charakteristische Eigenschaften von murinem Duodenum und Ileum

Charaktergen	<i>Cybrd1</i>	<i>Slc40a1</i>	<i>Gata4</i>	<i>Ostb</i>	<i>Slc10a2</i>
Funktion	Eisenstoffwechsel	Eisenstoffwechsel	Regulation Apoptose, Zellwachstum	Gallensäurestoffwechsel	Gallensäurestoffwechsel
Duodenum	x	x	x		
Ileum				x	x

Die humanen Eigenschaften werden in diesem Projekt bestimmt. Zudem wird festgestellt, ob die humanen duodenalen und ilealen Darmabschnitte ihre Charaktereigenschaften nach zweimonatiger Kultur behalten und somit die Resultate aus zukünftigen Experimenten mit Langzeit-Organoid-Kulturen noch mit *in vivo* vergleichbar sind.

Als erste Anwendung der Enteroide wird die Wirkung der Muttermilch auf die Expression folgender Gene, welche wichtig für die Aufrechterhaltung der Schutzbarriere im Darmtrakt sind, überprüft:

Tabelle 2: Barrieregene und ihre Funktion

Barrieregen	<i>ZO1</i>	<i>REG3A</i>	<i>IL1b</i>	<i>MUC2</i>
Codiert für...	Tight Junctions	Antimikrobielle Peptide	Interleukin 1 Beta	Muzine

## 3. Ziele und Fragestellungen

**Ziel 1:** Charakterisierung humaner Organoide aus duodenalen und ilealen Biopsien

**Fragestellung 1 zu Ziel 1:** Hat humanes *ex vivo* Material die gleichen charakteristischen Eigenschaften wie murines *ex vivo* Material?

**Fragestellung 2 zu Ziel 1:** Behalten humane duodenale und ileale Organoide ihre aus der Biopsie bestimmten spezifischen charakteristischen Eigenschaften, nachdem sie zwei Monate in Kultur gehalten wurden?

**Ziel 2:** Durchführung einer ersten Anwendung der Organoide mit Muttermilchexposition

**Fragestellung 1 zu Ziel 2:** Gibt es interindividuelle Unterschiede in der Muttermilch in Bezug auf die Barrieregenexpression nach Exposition der Organoide mit Muttermilchproben bei sechs bzw. 24-stündiger Inkubation?

## Referenzen

[1] Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., van den Brink, S., Geurts, V., Beumer, J., & Clevers, H. (2020). Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *Current Protocols in Immunology*, 130(1), Article 1. <https://doi.org/10.1002/cpim.106>

## 4. Material, Methodik, Vorgehen

Zehn humane duodenale und ileale Biopsien werden gesammelt. Die Zellen werden daraufhin in Kultur genommen. Aus Biopsieteilstücken und aus Enteroiden, welche in Kulturwoche 2 und 8 (Duodenum) und in Kulturwoche 4 und 8 (Ileum) gesammelt werden, wird die charakteristische Genexpression mittels quantitativer Polymerasenkettenreaktion mit reverser Transkription (RT-qPCR) bestimmt. Für das Milchexperiment werden in Kulturwoche 3 fünf Milchproben zu zwei duodenalen Kulturen gegeben und für sechs bzw. 24 Stunden inkubiert. Danach folgt die RT-qPCR für die Barrieregenbestimmung.

## 5. Ergebnisse/ Resultate

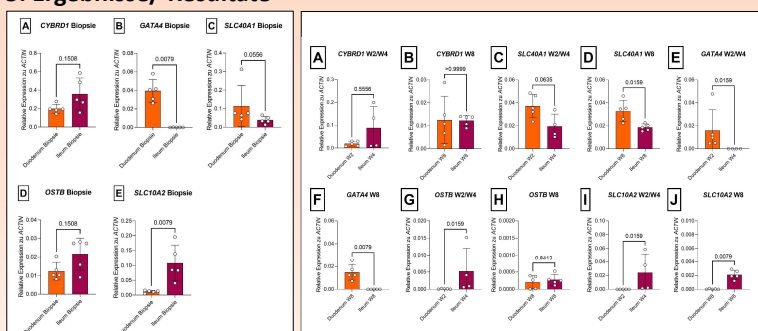


Abb. 1: Relative Expression der Charakterisierungsgene der Biopsieteilstücke. Statistik: Mann-Whitney (Zürcher, 2023) Abb. 2: Relative Expression der Charakterisierungsgene in Organoiden nach zwei- bzw. vier- und achtwöchiger Kultur. Statistik: Mann-Whitney (Zürcher, 2023)

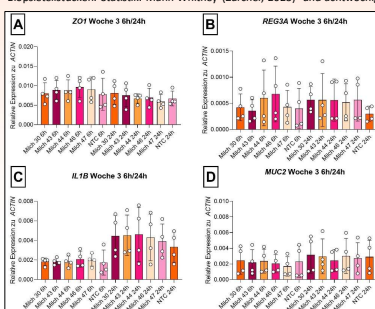


Abb. 3: Relative Expression der Barrieregene nach sechs- bzw. 24-stündiger Exposition der fünf Milchproben. Statistik: Kruskal Wallis (Zürcher, 2023)

- *GATA4*- und *SLC10A2*-Expression signifikant (P-Wert < 0.05) in den Biopsieteilstücken (Abb. 1 B,E) und auch nach achtwöchiger Kultur (Abb. 2 F,J)
- Keine Signifikanz Milchexperiment (Abb. 3)

## 6. Diskussion

Die Charakterisierung der humanen duodenalen und ilealen Enteroide konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die murinen charakteristischen Eigenschaften decken sich nicht vollständig mit den humanen Eigenschaften. *GATA4* ist spezifisch für humanes Duodenum, *SLC10A2* für humanes Ileum. Diese beiden Gene sind daher für die Überprüfung des Erhalts der charakteristischen Eigenschaften geeignet. Diese charakteristischen Genexpressionen bleiben über die achtwöchige Kulturdauer erhalten, auch wenn die Expression von *SLC10A2* abnimmt. Das Ziel einer ersten Organoid-Anwendung war nicht erfolgreich. Alle fünf Milchproben haben zwar die gleiche Wirkung auf die Barrieregenexpression, aber im Vergleich zur No Template Control (NTC) ist ersichtlich, dass die Milchproben eigentlich keinen Effekt auf die Barrieregenexpression haben. Der Versuch sollte mit höheren Milchkonzentrationen wiederholt werden.

### Abbildungen

Abb. 1 Zürcher, L. (2023). Relative Expression der Charakterisierungsgene der Biopsieteilstücke. Statistik: Mann-Whitney.

Abb. 2 Zürcher, L. (2023). Relative Expression der Charakterisierungsgene in Organoiden nach zwei bzw. vier- und achtwöchiger Kultur. Statistik: Mann-Whitney.

Abb. 3 Zürcher, L. (2023). Relative Expression der Barrieregene nach sechs- bzw. 24-stündiger Exposition der fünf Milchproben. Statistik: Kruskal Wallis.

### Tabellen

Tab. 1: Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D. L., Wijngaarden, S., Clevers, H., & Nieuwenhuis, E. E. S. (2014). Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsicly Programmed with Their Location-Specific Function. *Stem Cells*, 32(5), Article 5. <https://doi.org/10.1002/stem.1655>

Tab. 2: (Fanning et al., 1998), (Hansson, 2020), (Liszt et al., 2022), (Majid Jameel & Kassem Khalil, 2022)