

(19)



LE GOUVERNEMENT
DU GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
Ministère de l'Économie

(11)

N° de publication :

LU506249

(12)

BREVET D'INVENTION**B1**

(21) N° de dépôt: LU506249

(51) Int. Cl.:
C12N, C12N 5/10, C12N

(22) Date de dépôt: 30/01/2024

(30) Priorité:

(72) Inventeur(s):
GUO Xiaoling – Chine

(43) Date de mise à disposition du public: 30/07/2024

(74) Mandataire(s):
IP SHIELD – 1616 Luxembourg (Luxembourg)

(47) Date de délivrance: 30/07/2024

(73) Titulaire(s):

THE SECOND AFFILIATED HOSPITAL OF WENZHOU
MEDICAL UNIVERSITY (YUYING CHILDREN'S HOSPITAL
OF WENZHOU MEDICAL UNIVERSITY) – Wenzhou City,
Zhejiang, (Chine)

(54) **BARTH-SYNDROM INDUZIERBARE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN SOWIE DEREN HERSTELLUNGSMETHODEN,
DIFFERENZIERUNGSKULTURMEDIEN UND ANWENDUNGEN.**

(57) Die vorliegende Erfindung offenbart induzierbare pluripotente Stammzellen für das Barth- Syndrom sowie deren Herstellungsmethoden, Differenzierungskulturmedien und Anwendungen. Es werden 150-200 ml Urin eines Patienten mit Barth- Syndrom gesammelt und durch Zentrifugation bei 2000 U/min für 10 Minuten Urinzellen gewonnen. Nach der Zellzählung werden $3,5\text{-}4 \times 10^5$ Zellen in eine mit Matrigel beschichtete und bei 37 °C für mehr als eine Stunde inkubierte 6-Loch-Kulturplatte geimpft. Nach der Passage und Kultivierung der dritten Generation von Urinzellen bis zu 80% Konfluenz, werden die Zellen mit einem Sendai-Virus infiziert, das die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC enthält, um die Reprogrammierung zu induzieren. 15 Tage nach der Virusinfektion beginnen klonale Zellgruppen zu erscheinen, die manuell ausgewählt und auf eine neue, mit Matrigel inkubierte 24-Loch-Kulturplatte übertragen werden. Nach mehreren Passagen und der Erfüllung mehrerer Kriterien wird so eine gereinigte Zelllinie von iPS-Zellen (TAZ-UiPSC) aus Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom gewonnen. Diese TAZ-UiPSC können gezielt zur Differenzierung in Kardiomyozyten induziert werden, um ein in vitro Zellmodell zu etablieren, das für die Untersuchung der Pathogenese des Barth-Syndroms und die Auswahl von zielgerichteten Medikamenten verwendet wird.

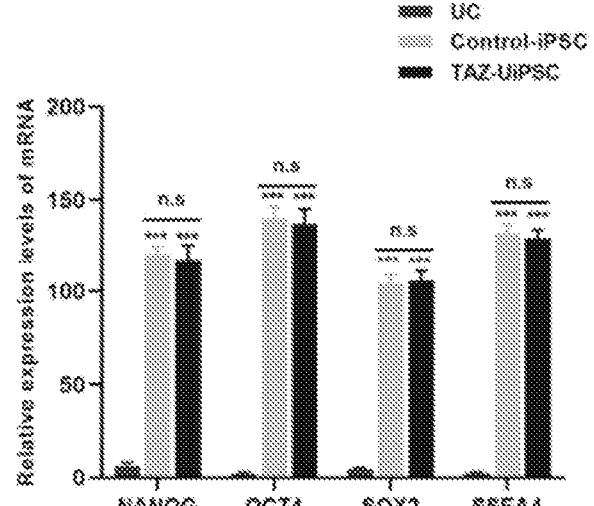


Bild 3

Barth-Syndrom induzierbare pluripotente Stammzellen sowie deren Herstellungsmethoden, Differenzierungskulturmedien und Anwendungen

Technischer Bereich

5 Diese Erfindung gehört zum Bereich der Biotechnologie und bezieht sich speziell auf induzierbare pluripotente Stammzellen für das Barth-Syndrom sowie deren Herstellungsmethoden, Differenzierungskulturmedien und Anwendungen.

Technologie im Hintergrund

10 Im Jahr 1983 wurde das Barth-Syndrom (BTHS) erstmals von Dr. Peter Barth entdeckt und wird allgemein als seltene, X-chromosomal verknüpfte, autosomal rezessive Erbkrankheit angesehen. Die Krankheit umfasst Skelettmuskelerkrankungen, Kardiomyopathie, Wachstumsverzögerungen und 3-Methylglutaconsäureurie, mit einer Inzidenz von nur 1/300.000-400.000. Die klinischen Merkmale des Barth-Syndroms umfassen hypertrophe Kardiomyopathie, dilatative Kardiomyopathie, linksventrikuläre Nichtkomplaktion, ventrikuläre Arrhythmien, Endokardfibroelastose, proximale Myopathie, plötzlicher Herztod, Neutropenie, Schläfrigkeit und Müdigkeit, Hypoglykämie, Laktatazidose, Essschwierigkeiten usw.

15 Im Jahr 1996 wurde die potenzielle Mutation des Barth-Syndroms auf dem tafazzin (TAZ)-Gen auf dem Xq28-Chromosom lokalisiert, hauptsächlich einschließlich der Deletionsmutation (c.517delG) und der Missense-Mutation (c.328T>C) des TAZ-Gens. Das TAZ-Gen ist hauptsächlich an der Biosynthese von Kardiolipin (CL) in Herzmuskelzellen beteiligt, ein Prozess, der hauptsächlich in der mitochondrialen Membran stattfindet. Kardiolipin (CL) in Herzmuskelzellen kann direkt mit verschiedenen wichtigen Proteinkomplexen wie der Atmungskette, mitochondrialen Stoffwechselträgern, Mitochondrienmorphologie-Formproteinen usw. interagieren.

20 25 Da Herzmuskelzellen des Menschen schwer zu gewinnen sind, ist dies schwierig und kostspielig.

Inhalt der Erfindung

30 Um die Probleme und Mängel der bestehenden Technik zu lösen, zielt die vorliegende Erfindung darauf ab, induzierbare pluripotente Stammzellen für das Barth-Syndrom sowie deren Herstellungsmethoden, Differenzierungskulturmedien und Anwendungen bereitzustellen, um so mehr Quellen und Anwendungswerte für induzierbare pluripotente Stammzellen zu erhalten.

35 Um die oben genannten Ziele zu erreichen, ist das erste Ziel dieser Erfindung die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom, das die folgenden Schritte umfasst:

S1: Entnahme von 150-200 ml Urin eines Patienten mit Barth-Syndrom und Gewinnung von Urinzellen durch Zentrifugation;

40 S2: Nach der Zellzählung werden $3,5-4 \times 10^5$ Zellen in eine mit Matrikel beschichtete und bei 37°C für mehr als eine Stunde inkubierte 6-Loch-Kulturplatte geimpft, und nach der Passage werden die dritte Generation von Urinzellen bis zu 80% Konfluenz kultiviert, gefolgt von der Verdauung und Passage mit EDTA-Trypsin;

S3: Die in Schritt S2 kultivierten Urinzellen werden mit Sendai-Viren infiziert, die die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC enthalten, um die Reprogrammierung zu induzieren, und nach 15 Tagen Virusinfektion beginnen klonale Zellgruppen zu erscheinen;

45 S4: Auswahl und Kultivierung der expandierten klonalen Zellgruppen und Übertragung auf

eine neue, mit Matrikel beschichtete 24-Loch-Kulturplatte, fortgesetzte Kultivierung mit E8-Kulturmedium, das nur am ersten Tag 10 Mikromol Y-27623 enthält, und täglicher Mediumwechsel, bis die klonalen Zellgruppen nach 5-7 Tagen 90% Konfluenz erreichen; kU506249

5 S5: Verdauung mit 0,5 mM EDTA und Passage in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10, um durch mehrfache Passage eine gereinigte Zelllinie von induzierbaren pluripotenten Stammzellen zu erhalten, die aus Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom stammen.

10 Das zweite Ziel dieser Erfindung ist die Bereitstellung eines Virus für die Reprogrammierung und Induktion zur Herstellung von induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom, wobei das Virus ein Sendai-Virus ist, das die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC enthält.

15 Das dritte Ziel dieser Erfindung ist eine Art von induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom, bezeichnet als TAZ-U iPSC.

20 Das vierte Ziel dieser Erfindung ist die Bereitstellung einer Anwendung der oben genannten induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom in der Differenzierungskultur von Kardiomyozyten, wobei die genannten induzierbaren pluripotenten Stammzellen in einem Kulturmedium kultiviert und über mehrere Stufen differenziert werden, um Kardiomyozyten zu erhalten.

25 Die weiteren Schritte umfassen Folgendes:

20 (1) Die genannten Barth-Syndrom induzierbaren pluripotenten Stammzellen werden auf Matrikel inkubiert und dann in E8-Kulturmedium kultiviert, wobei das Medium täglich für 2-3 Tage gewechselt wird;

25 (2) In der ersten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu RPMI+B27-Insulin mit 5 Mikromol CHIR99021 für 2 Tage gewechselt;

30 (3) In der zweiten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu RPMI+B27-Insulin mit 5 Mikromol IWR-1 für 2 Tage gewechselt;

(4) In der dritten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu normalem RPMI+B27-Insulin für 2 Tage gewechselt;

35 (5) In der vierten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu normalem RPMI+B27+Insulin gewechselt und die Kultur fortgesetzt, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wird.

40 Das fünfte Ziel dieser Erfindung ist die Bereitstellung eines Differenzierungskulturmediums für die Differenzierung von Kardiomyozyten aus den genannten Barth-Syndrom induzierbaren pluripotenten Stammzellen, das Folgendes umfasst:

45 Für die erste Differenzierungsphase ein Differenzierungskulturmedium mit RPMI+B27-Insulin und 5 Mikromol CHIR99021;

Für die zweite Differenzierungsphase ein Differenzierungskulturmedium mit RPMI+B27-Insulin und 5 Mikromol IWR-1;

Für die dritte Differenzierungsphase ein RPMI+B27-Insulin Differenzierungskulturmedium;

45 Und für die vierte Differenzierungsphase ein RPMI+B27+Insulin Differenzierungskulturmedium.

Der Vorteil dieser Erfindung liegt darin, dass sie eine nicht-invasive Methode zur Sammlung von Urinzellen des Patienten verwendet, diese dann in iPS-Zellen reprogrammiert und gezielt zu Kardiomyozyten differenziert, was von großer Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese des Barth-Syndroms und die Auswahl von zielgerichteten Medikamenten ist. Die Vorteile und positiven Effekte dieser Erfindung sind nicht darauf beschränkt und werden im Detail in den

Beispielen des Spezifikationsdokuments dargestellt.

Beschreibung der beigefügten Zeichnungen

Um die technischen Lösungen in den Ausführungsbeispielen dieser Erfindung oder der bestehenden Technik klarer zu erläutern, wird im Folgenden eine kurze Einführung in die Zeichnungen gegeben, die in der Beschreibung der Ausführungsbeispiele oder der bestehenden Technik verwendet werden. Offensichtlich sind die nachstehend beschriebenen Zeichnungen nur einige Ausführungsbeispiele dieser Erfindung. Für Fachleute auf diesem Gebiet ist es offensichtlich, dass weitere Zeichnungen, die auf der Grundlage dieser Zeichnungen ohne kreative Arbeitsleistung erstellt werden, ebenfalls zum Umfang dieser Erfindung gehören.

10 Bild 1 zeigt die Trennung, Kultur und Reprogrammierung von Urinzellen (UCs) von Patienten mit Barth-Syndrom, wobei (A) primär kultivierte Urinzellen (UCs), (B) klonale Kolonien-ähnliche induzierbare pluripotente Stammzellen iPS aus Urinzellen von Barth-Syndrom-Patienten und (C) manuell ausgewählte und kultivierte induzierbare pluripotente Stammzellen iPS aus Urinzellen von Barth-Syndrom-Patienten (TAZ-UiPSC) dargestellt sind.

15 Bild 2 zeigt die Immunfluoreszenz-Identifikation der Pluripotenz-Proteinexpression von TAZ-UiPSC, wobei (A) die Expression des Pluripotenz-Proteins OCT4 in TAZ-UiPSC durch Immunfluoreszenz identifiziert wird und (B) die Expression des Pluripotenz-Proteins SSEA4 in TAZ-UiPSC durch Immunfluoreszenz identifiziert wird.

20 Bild 3 zeigt die Echtzeit-quantitative PCR (RT-qPCR) zur Identifikation der Expression pluripotenter Gene. RT-qPCR misst die Expressionsniveaus der pluripotenten Gene NANOG, OCT4, SOX2 und SSEA4 in verschiedenen Gruppen, Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3, ***P<0.01 bedeutet statistisch signifikante Unterschiede, n.s> 0.05 keine signifikanten Unterschiede;

25 Bild 4 stellt die Chromosomen-Karyotyp-Analyse der Chromosomenstruktur von TAZ-UiPSC dar;

Bild 5 zeigt die Immunfluoreszenz-Identifikation des Differenzierungspotenzials von TAZ-UiPSC, wobei (A) die Expression des ektodermalen Markers NESTIN, (B) die Expression des mesodermalen Markers SMA und (C) die Expression des endodermalen Markers AFP durch Immunfluoreszenz identifiziert wird;

30 Bild 6 zeigt die RT-PCR-Identifikation des Differenzierungspotenzials von TAZ-UiPSC, wobei RT-PCR die Expression der Marker-Gene für die drei Keimblätter identifiziert;

Bild 7 zeigt die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung zur Identifikation von Genmutationsstellen, wobei (A) die Sequenzierungsergebnisse der Kontrollgruppe (Control-iPS) und (B) die Sequenzierungsergebnisse der Experimentalgruppe (TAZ-UiPSC) dargestellt sind;

35 Bild 8 zeigt die Immunfluoreszenz-Identifikation von aus TAZ-UiPSC differenzierten Kardiomyozyten, zur Darstellung der Immunfluoreszenz-Identifikation der Kardiomyozyten-Markerproteine cTnT und α -Actinin.

Detaillierte Beschreibung

Um die Ziele, technischen Lösungen und Vorteile dieser Erfindung klarer zu machen, wird im Folgenden in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungen eine detailliertere Beschreibung der Erfindung gegeben.

Ausführungsbeispiele

1. Isolierung und Kultivierung von Urinzellen bei Patienten mit Barth-Syndrom

Streng nach sterilen Operationsanforderungen, sammeln Sie 150-200 ml mittleren Urins von einem Patienten mit Barth-Syndrom (BTHS), zentrifugieren Sie ihn mit 2000 Umdrehungen pro

Minute für 10 Minuten, um ein Zellpräzipitat aus dem Urin zu erhalten. Waschen Sie es zweimal mit PBS, das 1% Penizillin/Streptomycin enthält. Dann resuspendieren Sie es in 1 ml speziellem Urinzellkulturmedium von der Firma Beijing Saibei (plus 2,5 ng/ml bFGF), zählen die Zellen und impfen $3,5-4 \times 10^5$ Zellen in ein Loch einer 6-Loch-Kulturplatte, die mit Matrigel beschichtet und bei 37 °C für mehr als eine Stunde inkubiert wurde. Übertragen Sie die Zellen in einen 37 °C, 5% CO₂ Zellkulturinkubator. Wechseln Sie das Medium täglich durch einen halbquantitativen Mediumwechsel.

Sobald die kultivierten Urinzellen konfluent geworden sind, führen Sie eine Passagekultur durch mit 0,25% EDTA-Trypsin.

10 **2. Erzeugung und Expansion von induzierbaren pluripotenten Stammzellen (iPS)**

Sobald die Urinzellen der dritten Generation 80% Konfluenz erreicht haben, werden sie mit einem Sendai-Virus der Firma Thermo, das die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC enthält, infiziert, um eine Reprogrammierung zu induzieren. Die infizierten Zellen werden in E6-Kulturmedium der Firma STEMCELL (zusätzlich 10 ng/ml FGF2) kultiviert, wobei das Medium täglich gewechselt wird. 15 Tage nach der Virusinfektion beginnen klonale Zellgruppen zu erscheinen, woraufhin das Kulturmedium auf E8 von STEMCELL umgestellt wird, um die Kultur fortzusetzen. Sobald die klonalen Gruppen die gewünschte Größe erreicht haben, werden sie manuell ausgewählt und auf eine neue, mit Matrigel inkubierte 24-Loch-Kulturplatte übertragen. Die Kultur wird fortgesetzt in E8-Kulturmedium, das nur am ersten Tag 10 Mikromol Y-27623 enthält, und das Medium wird täglich gewechselt. Nach 5-7 Tagen erreichen die klonalen Gruppen 90% Konfluenz, dann werden sie mit 0,5 mM EDTA verdaut und in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10 passagiert.

15 **3. Immunfluoreszenzfärbung**

Nachdem die Kultur der verschiedenen Zellgruppen konfluent geworden ist, wird die Überstand entfernt, einmal mit PBS gewaschen, und dann 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 15 Minuten zugegeben. Danach wird dreimal mit PBS gewaschen, jeweils 5 Minuten. Anschließend wird eine Lösung mit 0,1% Triton X-100 und 3% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS hinzugefügt und die Zellen bei Raumtemperatur für 1 Stunde permeabilisiert. Danach werden ohne Waschen Primärantikörper hinzugefügt: Kaninchen-Anti-OCT4-Antikörper (1:500), Maus-Anti-SSEA4-Antikörper (1:200), Maus-Anti-NESTIN-Antikörper (1:200), Maus-Anti-SMA-Antikörper (1:200), Maus-Anti-AFP-Antikörper (1:500), Kaninchen-Anti-cTnT-Antikörper (1:200) und Maus-Anti-α-Actinin-Antikörper (1:200), über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wird dreimal mit PBS gewaschen, jeweils 5 Minuten, gefolgt von der Zugabe von Sekundärantikörpern: Alexa Fluor 488-markiertem Schaf-Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (1:1000), Alexa Fluor 488-markiertem Schaf-Anti-Maus IgG-Antikörper (1:1000) und Alexa Fluor 594-markiertem Schaf-Anti-Maus IgG-Antikörper (1:1000), 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird dreimal mit PBS gewaschen, jeweils 5 Minuten, gefolgt von der Zugabe von DAPI-Färbemittel und Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zum Schluss wird dreimal mit PBS gewaschen, jeweils 5 Minuten, und dann unter einem umgekehrten Fluoreszenzmikroskop beobachtet und fotografiert.

20 **4. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) und Echtzeit-quantitative PCR (RT-qPCR) Analyse**

Mit Trizol (Invitrogen, USA) wird die Gesamt-RNA der verschiedenen Zellgruppen extrahiert und die OD gemessen, um sicherzustellen, dass das Verhältnis OD 260/OD280 der RNA

zwischen 1,8 und 2,1 liegt, was die Reinheit garantiert. Dann wird die Gesamt-RNA mit einer Reverse-Transkriptions-Kit (Toyobo, Japan) in cDNA umgeschrieben, wobei das Reaktionssystem und das Programm gemäß der Produktanleitung durchgeführt werden. Ein Teil der cDNA wird für RT-PCR verwendet, wobei die Primersequenzen sind:; L506249

5 AFP-F: AGGGAGCGGCTGACATTATT
 AFP-R: CAGAGAATGCAGGAGGGACA
 GATA6-F: AACTACCACCTTATGGCGCA
 GATA6-R: GCTGTAGGTTGTGTTGTGGG
 CDH5-F: GGATGCAGACGACCCCCACT
 10 CDH5-R: TGTGTACTTGGTCTGGGTGAAG
 PECAM-F: GACATGGCAACAAGGCTGTG
 PECAM-R: CACTGTCCGACTTTGAGGCT
 NKX2-5-F: CCACGCCCTCTCAGTCAA
 NKX2-5-R: TAGGCACGTGGATAGAAGGC
 15 PAX6-F: GCCAGACCTCCTCATACTCC
 PAX6-R: GCCAGACCTCCTCATACTCC
 TUBB-F: GGTAAACAACGGGCCAAAGG
 TUBB-R: GCTGATAAGGAGAGTGCCCA
 ALB-F: TGTTGCATGAGAAAACGCCA
 20 ALB-R: TGCTCTTTGTTGCCTTGGG
 GADPH-F: GGCAAATTCCATGGCACCG
 GADPH-R: GTTCACACCCATGACGAACA

Das Reaktionssystem basiert auf dem SYBR-Kit (Takara, Japan). Nach der Vorbereitung erfolgt die PCR-Reaktion bei 94 °C für 2 Minuten zur Denaturierung, gefolgt von 35 Zyklen der 25 Reaktion (94 °C für 30 Sekunden, 59 °C für 30 Sekunden, 72 °C für 30 Sekunden). 6 µL des Reaktionsprodukts werden mit 2 µL des 6×Loading Buffers gemischt und dann mittels 2% Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und fotografiert. Ein weiterer Teil der cDNA wird für RT-qPCR verwendet, wobei die Primersequenzen sind:

30 NANOG -F: CAGCCAAATTCTCCTGCCAG
 NANOG -R: CACGTCTTCAGGTTGCATGT
 OCT4 -F: AATTGTTCCCTGCAGTGCC
 OCT4 -R: CTCTCGTTGTGCATAGTCGC
 SOX2-F: GACAGTTACGCGCACATGAA
 SOX2-R: GTTCATGTAGGTCTGCGAGC
 35 SSEA4-F: GGACAAGGCAGTCACAGATC
 SSEA4-R: CAGGCTAGTTTCACGCTGG
 GADPH-F: GGCAAATTCCATGGCACCG
 GADPH-R: GTTCACACCCATGACGAACA

Das Reaktionssystem basiert auf dem SYBR-Kits (Takara, Japan). Nach der Vorbereitung 40 startet die PCR mit einer Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen (95 °C für 10 Sekunden, 60 °C für 30 Sekunden). Nach der Reaktion erfolgt die statistische Analyse basierend auf den Ct-Werten, die Erstellung einer Standardkurve und die quantitative Analyse unter Verwendung der Ct-basierten Methode (2- $\Delta\Delta Ct$).

5.Embryoidkörper-Formationstest

45 Der Differenzierungspotenzial der reprogrammierten iPS-Zellen wird mittels

Embryoidkörper-Formationstests analysiert. Jeder Embryoidkörper wird durch das Kultivieren von 5000 iPS-Zellen in 50 µl E8-Kulturmedium mittels Tropfenkultur für 3 Tage gebildet. Anschließend werden die Embryoidkörper in einer Suspension aus 50% E8-Kulturmedium und 50% Differenzierungsmedium kultiviert. Dieses 50% Differenzierungsmedium enthält DMEM-F12, 20% fetales Kälberserum, 1% Penizillin/Streptomycin, 1× nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA), 2 mM L-Glutamin und 0.1 mM β-Mercaptoethanol. Die suspendierten Embryoidkörper werden dann auf eine nicht-haftende Kulturplatte für 2 Tage übertragen. Anschließend werden die Embryoidkörper auf eine mit Matrigel inkubierte 24-Loch-Kulturplatte übertragen und dort 14 Tage lang kultiviert. Einige Zellen werden danach für die RNA-Extraktion und RT-PCR-Analyse gesammelt, während andere Zellen nach Fixierung mit 4% Paraformaldehyd einer immunfluoreszenzytologischen Färbungsanalyse unterzogen werden.

6.Chromosomen-Karyotyp-Analyse

Die Chromosomenstabilität der iPS-Zellen wird mittels Chromosomen-Karyotyp-Analyse überprüft. Die Zellen werden mit 10 µg/ml Colchicin bei 37 °C für 60 Minuten behandelt. Anschließend werden sie mit Trypsin behandelt, um einzelne Zellen zu gewinnen, und dann mit 0.075 M hypotonischer Kaliumchloridlösung behandelt. Danach werden sie mit Carnoy's Fixiermittel (3:1 Mischung aus Methanol und Essigsäure) fixiert. Schließlich wird eine Bildanalyse der Chromosomen im Mitosestadium und der G-Bänder durchgeführt.

7.Mutationsanalyse

Genomische DNA der Zellen wird mit dem Genom-Extraktionskit von Thermo extrahiert, und die Proben werden zur Sanger-Sequenzierung an Qingke Biologie gesendet, um die Mutationsstellen zu bestätigen.

8.Induktion der Differenzierung von iPS-Zellen aus Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom in Kardiomyozyten

iPS-Zellen werden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Loch in eine mit Matrigel beschichtete und bei 37 °C für mehr als eine Stunde inkubierte 6-Loch-Kulturplatte geimpft. Die Zellen werden mit E8-Kulturmedium kultiviert, wobei das Medium täglich für 2-3 Tage gewechselt wird, bis die Zellen 70% Konfluenz erreichen, um dann mit der Differenzierung zu beginnen. In der ersten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu RPMI+B27+Insulin mit 5 Mikromol CHIR99021 für 2 Tage gewechselt; in der zweiten Differenzierungsphase wird es zu RPMI+B27+Insulin mit 5 Mikromol IWR-1 für 2 Tage gewechselt; in der dritten Differenzierungsphase wird es zu normalem RPMI+B27+Insulin für 2 Tage gewechselt; in der vierten Differenzierungsphase wird es zu normalem RPMI+B27+Insulin gewechselt und die Kultur fortgesetzt, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wird. Sobald schlagende Kardiomyozyten erscheinen, können sie mit Accutase-Enzym verdaut und passagiert werden, gefolgt von einer immunfluoreszenzytologischen Identifikation der Zellen.

Experimentelle Ergebnisse

1. Isolierung, Kultivierung und Reprogrammierung von Urinzellen

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die isolierten primären Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom gut wachsen, eine kurze spindelförmige Morphologie aufweisen und anhaftend wachsen, wobei sie innerhalb von 5 Tagen eine 70% Konfluenz erreichen (Abbildung 1A). Nachdem die Urinzellen vollständig gewachsen sind, werden sie mit 0.25% EDTA-Trypsin verdaut und passagiert. Die Zellen der dritten Generation mit 80% Konfluenz werden dann mit einem kommerziellen Sendai-Virus infiziert, das die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC für die Reprogrammierung enthält. 15 Tage nach der Virusinfektion beginnen

klonale Zellgruppen zu erscheinen, und sobald diese klonalen Gruppen die gewünschte Größe erreichen, können sie klonal ausgewählt werden (Abbildung 1B). Die klonalen Zellen werden manuell ausgewählt und auf eine neue, mit Matrigel inkubierte 24-Loch-Kulturplatte übertragen. Die Kultur wird fortgesetzt in E8-Kulturmedium, das nur am ersten Tag 10 Mikromol Y-27623 enthält, und das Medium wird täglich gewechselt. Nach 5-7 Tagen erreichen die klonalen Gruppen 90% Konfluenz, dann werden sie mit 0,5 mM EDTA verdaut und in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10 passagiert (Abbildung 1C).

2. Immunfluoreszenzidentifikation der Expression von Pluripotenzproteinen

Um die Expression von Pluripotenzproteinen in klonalen Zellgruppen nach mehreren Passagen zu identifizieren, wurde die Immunfluoreszenzmethode verwendet, um die Expression der Pluripotenzproteine OCT4 (Abbildung 2A) und SSEA4 (Abbildung 2B) zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Pluripotenzproteine positiv exprimiert werden und die Expression mit der Position des Zellkerns überlappt.

3. Echtzeit-quantitative PCR (RT-qPCR) zur Identifikation der Expression von Pluripotenzgenen

Um die Expression von Pluripotenzgenen in klonalen Zellgruppen nach mehreren Passagen zu identifizieren, wurde die Echtzeit-quantitative PCR (RT-qPCR) verwendet, um die Expressionsniveaus der Pluripotenzgene NANOG, OCT4, SOX2 und SSEA4 zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsebene dieser Pluripotenzgene in den reprogrammierten iPS-Zellen (TAZ-UiPSC) vergleichbar mit der positiven Kontrollgruppe (Control-iPSC) ist, ohne signifikante Unterschiede, und signifikant höher als in der negativen Kontrollgruppe (UC) (Abbildung 3).

4. Chromosomen-Karyotyp-Analyse

Um die Chromosomenstruktur-Stabilität der reprogrammierten Zellen zu identifizieren, wurde eine Chromosomen-Karyotyp-Analyse an induzierbaren pluripotenten Stammzellen iPS (TAZ-UiPSC) aus Urinzellen eines männlichen Patienten mit Barth-Syndrom durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Zellchromosomen-Karyotyp normal ist (46, XY) (Abbildung 4).

5. Zelluläre Immunfluoreszenz zur Identifikation des Differenzierungspotenzials der Zellen

Um das Differenzierungspotenzial der reprogrammierten iPS-Zellen (TAZ-UiPSC) zu identifizieren, wurde eine Embryoidkörper-Formationstest in Kombination mit Differenzierungsinduktion verwendet, um TAZ-UiPSC in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Nach der Immunfluoreszenzfärbung der Zellen zeigten die Ergebnisse, dass die differenzierten TAZ-UiPSC-Zellen positiv für das Ektodermmarkerprotein NESTIN (Abbildung 5A), das Mesodermmarkerprotein SMA (Abbildung 5B) und das Endodermmarkerprotein AFP (Abbildung 5C) exprimieren.

6. RT-PCR zur Identifizierung des Differenzierungspotenzials der Zellen

Um das Differenzierungspotenzial der reprogrammierten iPS-Zellen (TAZ-UiPSC) weiter zu identifizieren, wurde eine Embryoidkörper-Formationstest in Kombination mit Differenzierungsinduktion verwendet, um TAZ-UiPSC in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. RT-PCR-Ergebnisse zeigen, dass die differenzierten TAZ-UiPSC-Zellen positiv für Endodermmarker-Gene AFP und AGTA6, Mesodermmarker-Gene CDH5, PECAM, NKX2-5 und Ektodermmarker-Gene PAX6, TUBB, ALB exprimieren (Abbildung 6).

7. Identifizierung von Mutationsstellen

Um zu bestätigen, dass die reprogrammierten iPS-Zellen (TAZ-UiPSC) Mutationsstellen

enthalten, wurde eine Sanger-Sequenzierung der reprogrammierten iPS-Zellen (TAZ-UiPSC^{U506249}) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kontrollgruppe (Control-iPS) eine normale Gensequenz aufweist (Abbildung 7A), während TAZ-UiPSC eine Deletionsmutation (c.517delG) im TAZ-Gen von Patienten mit Barth-Syndrom enthält (Abbildung 7B).

5 8. Induktion der Differenzierung von iPS-Zellen aus Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom in Kardiomyozyten

Mit spezifischen Differenzierungsmedien RPMI+B27+Insulin und RPMI+B27+Insulin und der Zugabe von 5 Mikromol CHIR99021 und 5 Mikromol IWR-1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten wird die Differenzierung induziert, und in der vierten Differenzierungsphase erscheinen schlagende Kardiomyozyten. Die immunfluoreszenzzytologische Identifizierung der differenzierten Kardiomyozyten zeigt, dass die aus Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom differenzierten iPS-Zellen positiv für die Kardiomyozytenmarker cTnT und α -Actinin exprimieren (Abbildung 8).

Die oben offenbarten Beispiele sind lediglich bevorzugte Ausführungsformen dieser Erfindung und sollen nicht als Einschränkung des Umfangs dieser Erfindung angesehen werden. Daher fallen äquivalente Änderungen, die auf den Ansprüchen dieser Erfindung basieren, immer noch in den Umfang dieser Erfindung.

Ansprüche

LU506249

1. Ein Verfahren zur Herstellung von induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom, durch gekennzeichnet folgende Schritte:

5 S1: Sammeln von 150-200 ml Urin eines Patienten mit Barth-Syndrom und Gewinnung von Urinzellen durch Zentrifugation;

10 S2: Nach Zellzählung werden $3,5-4 \times 10^5$ Zellen in eine mit Matrikel beschichtete und bei 37°C für mehr als eine Stunde inkubierte 6-Loch-Kulturplatte geimpft; Nach der Passage werden die dritte Generation von Urinzellen bis zu 80% Konfluenz kultiviert, gefolgt von Verdauung und Passage mit EDTA-Trypsin;

15 S3: Die in Schritt S2 kultivierten Urinzellen werden mit einem Sendai-Virus, das die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC enthält, infiziert, um die Reprogrammierung zu induzieren; 15 Tage nach der Virusinfektion beginnen klonale Zellgruppen zu erscheinen;

20 S4: Auswahl und Kultivierung der expandierten klonalen Zellgruppen und Übertragung auf eine neue, mit Matrikel beschichtete 24-Loch-Kulturplatte; Die Kultur wird fortgesetzt in E8-Kulturmedium, das nur am ersten Tag 10 Mikromol Y-27623 enthält, und das Medium wird täglich gewechselt; Nach 5-7 Tagen erreichen die klonalen Gruppen 90% Konfluenz, dann werden sie mit 0,5 mM EDTA verdaut und in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10 passagiert;

25 S5: Durch mehrfache Passage wird eine gereinigte Zelllinie von induzierbaren pluripotenten Stammzellen gewonnen, die aus Urinzellen von Patienten mit Barth-Syndrom stammen.

2. Ein für die Herstellung von induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom verwendeter, zur Reprogrammierung induzierender Virus, dadurch gekennzeichnet, dass der Virus ein Sendai-Virus ist, das die vier Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC enthält.

3. Induzierbare pluripotente Stammzellen für das Barth-Syndrom, hergestellt nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1.

4. Eine Anwendung der gemäß Anspruch 3 hergestellten induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom in der Differenzierungskultur von Kardiomyozyten, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten induzierbaren pluripotenten Stammzellen in einem Kulturmedium kultiviert und über mehrere Stufen differenziert werden, um Kardiomyozyten zu erhalten.

35 5. Die Anwendung der gemäß Anspruch 2 hergestellten induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom in der Differenzierungskultur von Kardiomyozyten, durch gekennzeichnet folgende Schritte:

(1) Die genannten induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom werden in Matrikel inkubiert und dann in E8-Kulturmedium kultiviert, wobei das Medium täglich für 2-3 Tage gewechselt wird;

40 (2) In der ersten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu RPMI+B27-Insulin mit 5 Mikromol CHIR99021 für 2 Tage gewechselt;

(3) In der zweiten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu RPMI+B27-Insulin mit 5 Mikromol IWR-1 für 2 Tage gewechselt;

(4) In der dritten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu normalem RPMI+B27-Insulin für 2 Tage gewechselt;

45 (5) In der vierten Differenzierungsphase wird das Kulturmedium zu normalem

RPMI+B27+Insulin gewechselt und die Kultur fortgesetzt, wobei das Medium alle zwei Tage LU506249 gewechselt wird.

6. Ein Differenzierungskulturmedium zur Differenzierung von Kardiomyozyten aus induzierbaren pluripotenten Stammzellen für das Barth-Syndrom gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungskulturmedium Folgendes umfasst:

Ein Differenzierungskulturmedium für die erste Differenzierungsphase mit 5 Mikromol CHIR99021 in RPMI+B27-Insulin;

Ein Differenzierungskulturmedium für die zweite Differenzierungsphase mit 5 Mikromol IWR-1 in RPMI+B27-Insulin;

10 Ein Differenzierungskulturmedium für die dritte Differenzierungsphase mit RPMI+B27-Insulin;

Und ein Differenzierungskulturmedium für die vierte Differenzierungsphase mit RPMI+B27+Insulin.

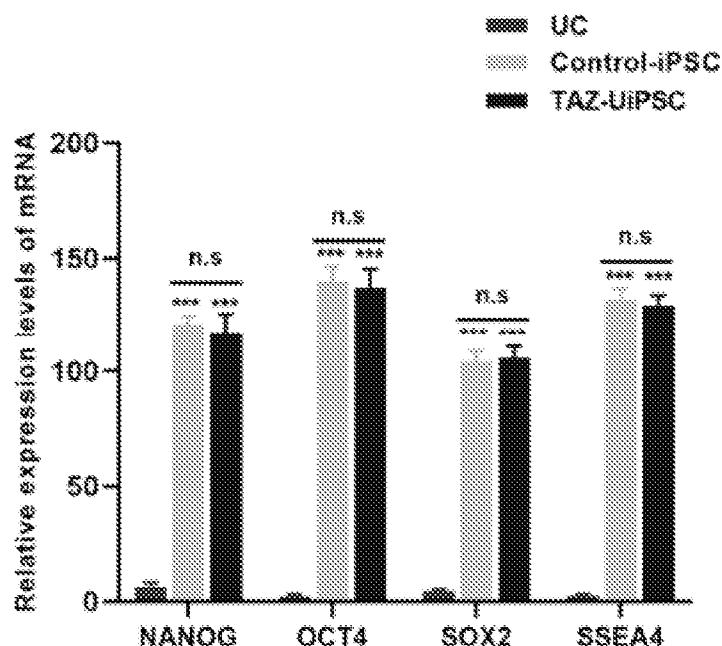


Bild 3

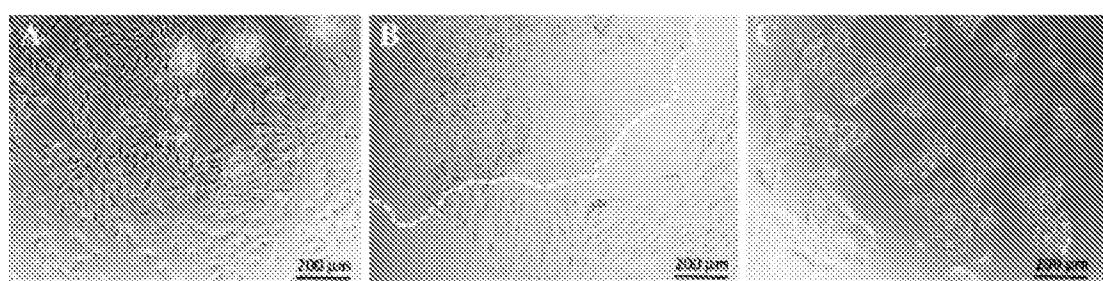


Bild 1

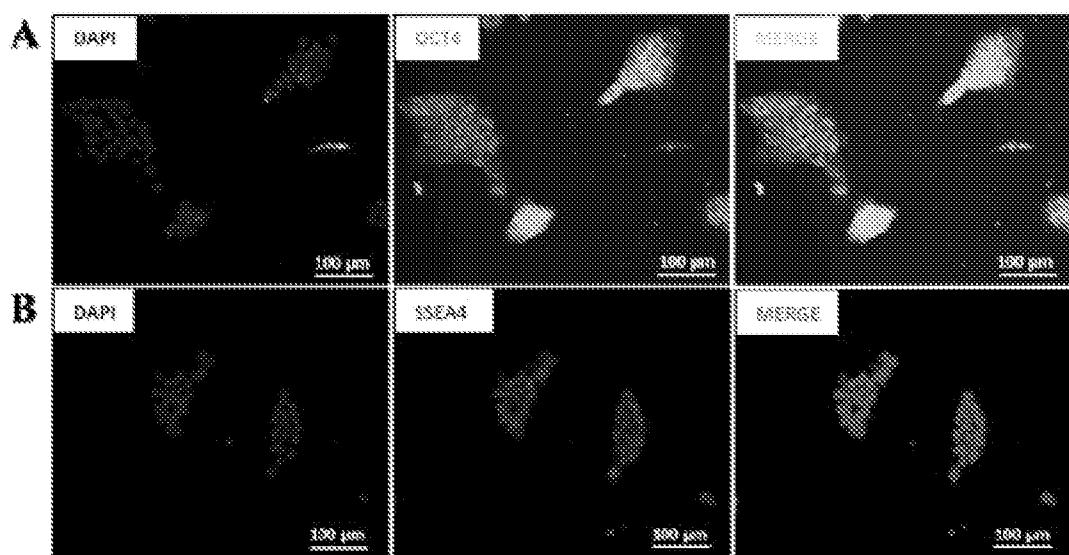


Bild 2

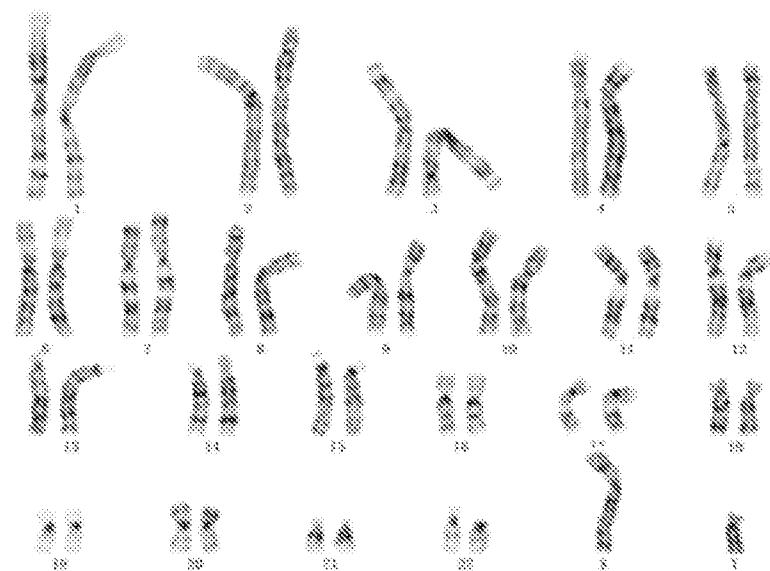


Bild 4

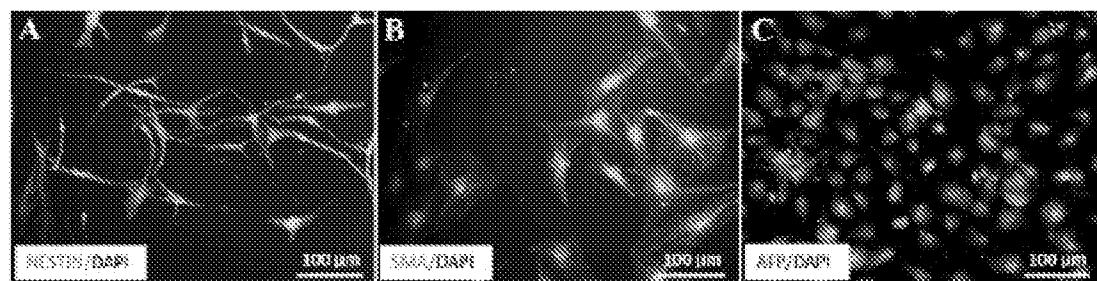


Bild 5

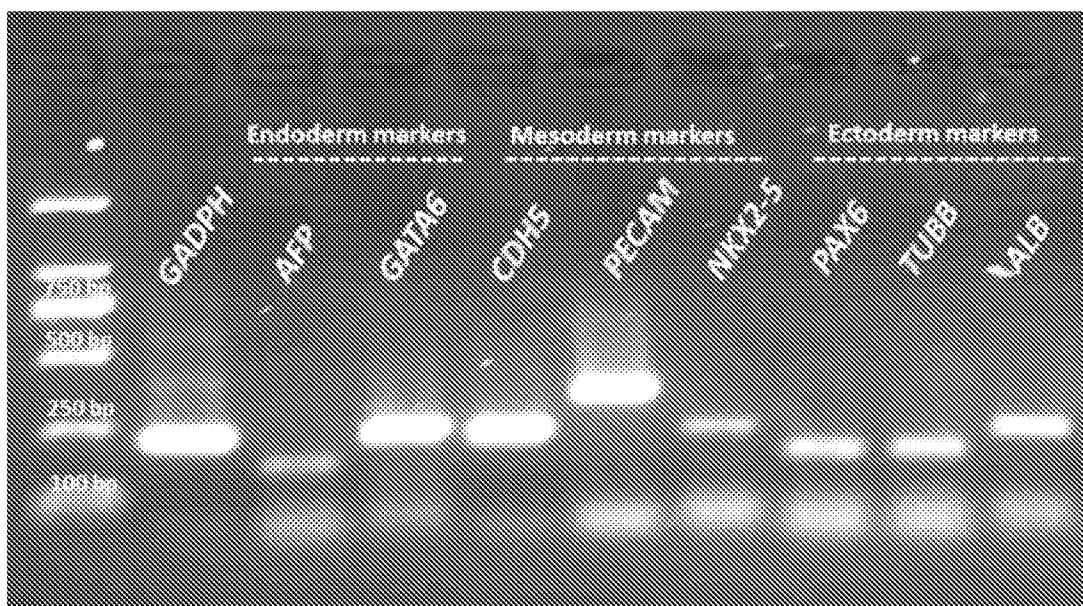


Bild 6

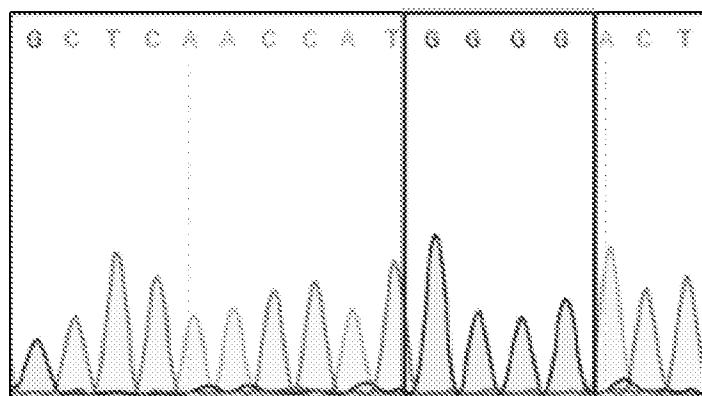
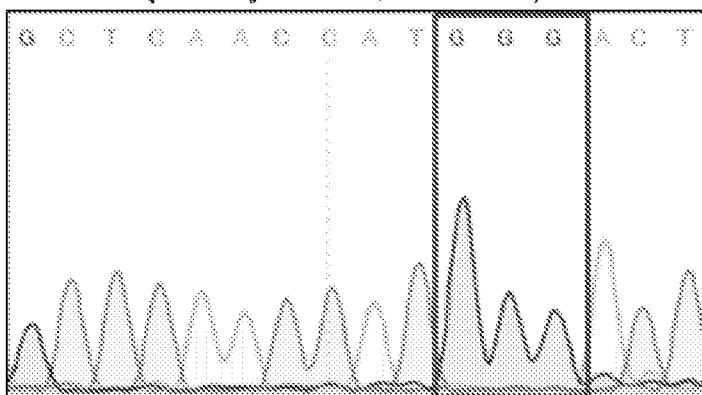
A Control**B Patient (Barth syndrome, c.517delG)**

Bild 7

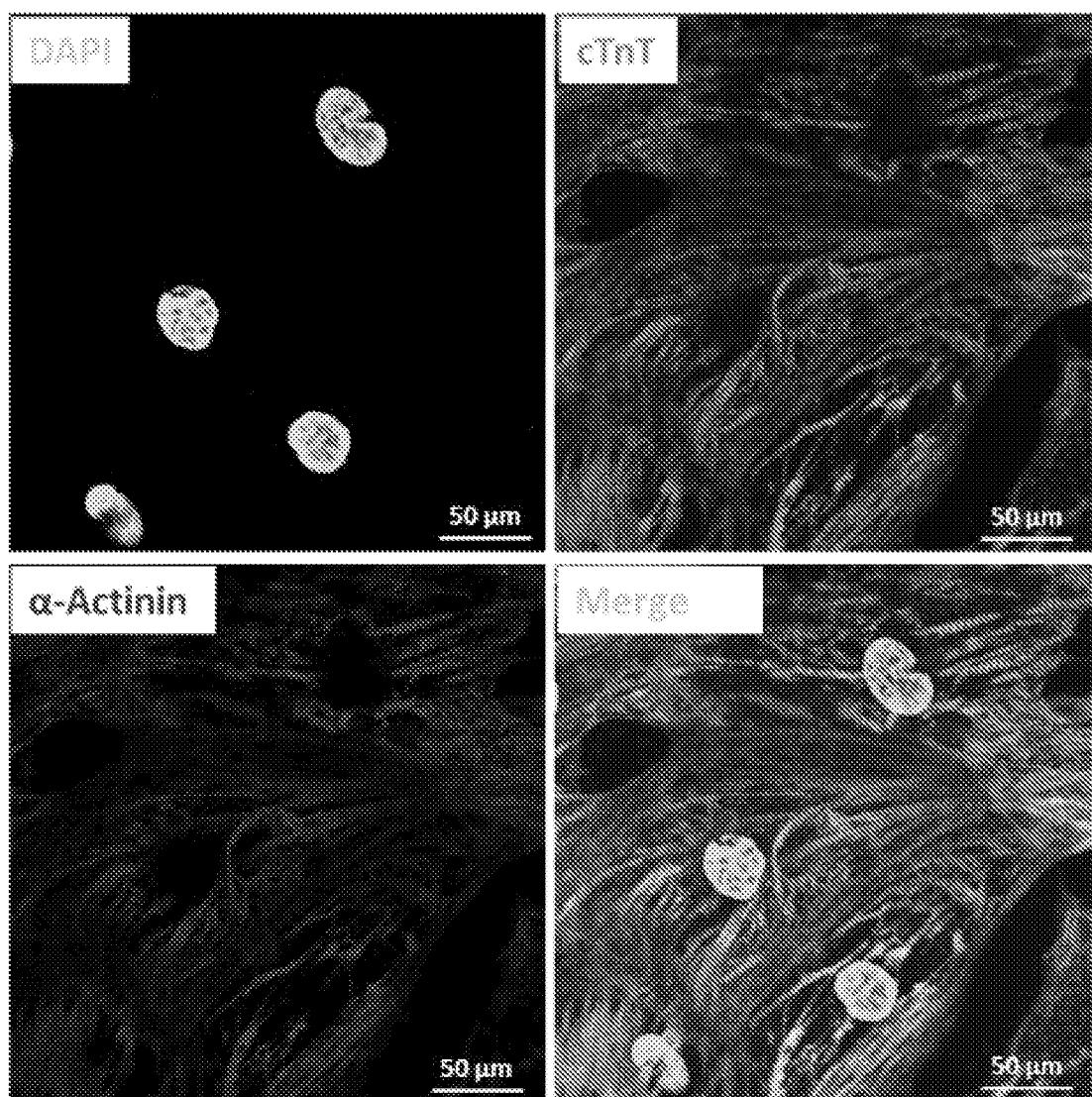


Bild 8