



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Steps toward pre-clinical iPSC-derived kindey organoids

Wiersma, L.E.

Citation

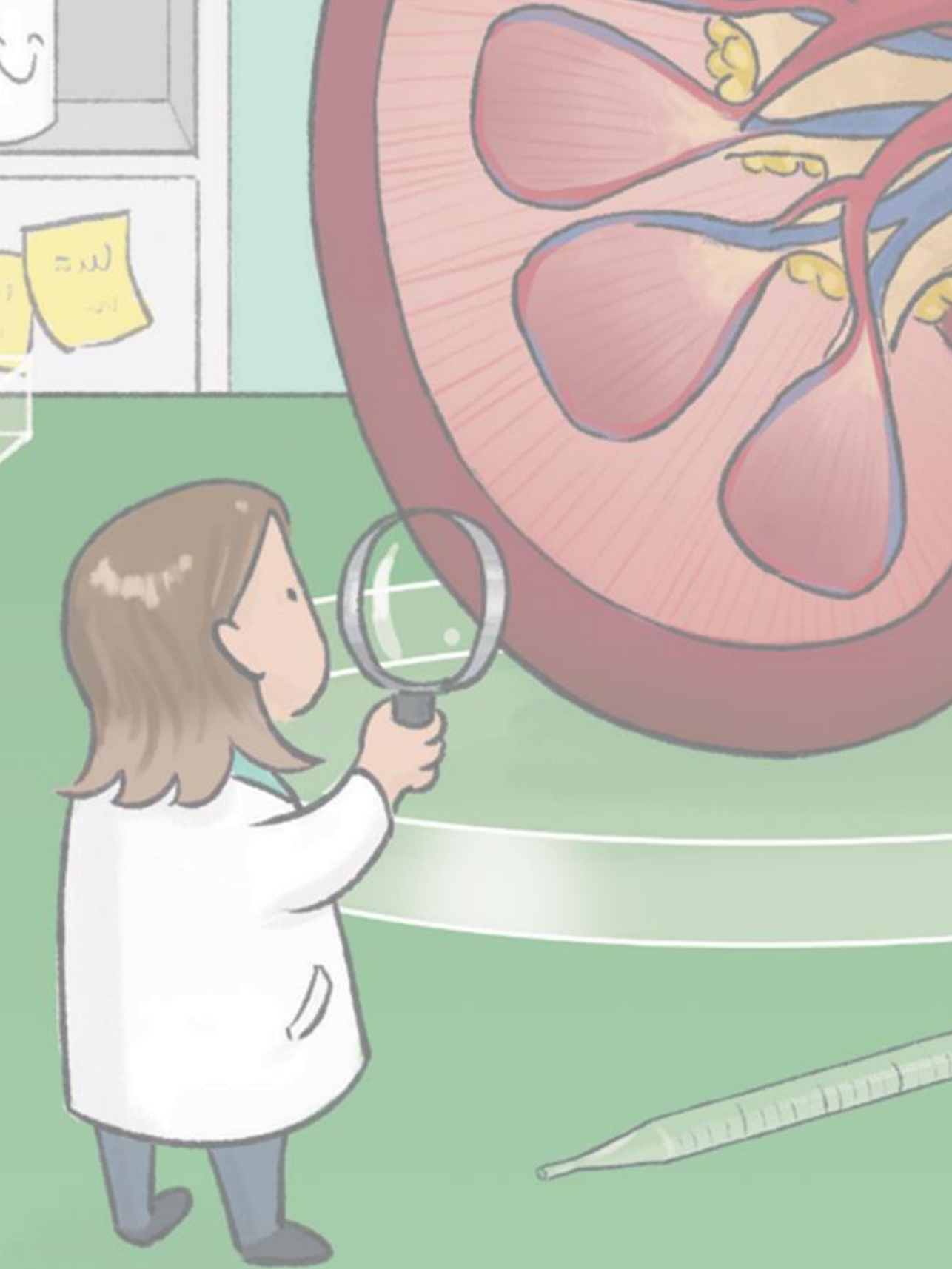
Wiersma, L. E. (2026, February 24). *Steps toward pre-clinical iPSC-derived kindey organoids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4292616>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4292616>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Addendum

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Dankwoord

Nederlandse Samenvatting

Nieren zijn complexe organen welke een belangrijk rol spelen bij de huishouding van het lichaam, bijvoorbeeld door afvalstoffen uit het bloed te filteren. Nefronen in de nier zijn hiervoor verantwoordelijk en gemiddeld heeft een nier 1 miljoen van deze filtereenheden. De opmaak van een nefron is als volgt: bloedvaten gaan het lichaampje van Malpighii (renal corpuscle) in dat bestaat uit het kapsel van Bowman en de glomerulus. De (glomerulaire) bloedvaten en de podocyten van de glomerulus zijn onderdeel van de filtratiebarrière om het bloed te filteren. Het gevormde filtraat gaat vanuit het kapsel van Bowman door naar de niertubuli waar het verder bewerkt wordt. De tubuli worden aangeduid als de proximale tubulus, lis van Henle, distale tubulus, verbindende tubulus, en de verzamelbuis welke de urine naar het nierbekken en uiteindelijk naar de blaas leidt. Elk buissegment heeft zijn eigen specifieke functie om het filtraat te bewerken.

Het goed functioneren van de nieren en hun nefronen is van groot belang voor de gezondheid. Slecht functioneren van de nier kan van acute of chronische aard zijn waar in sommige gevallen de nierschade hersteld kan worden. Wereldwijd lijdt naar schatting één op de tien mensen aan een nierziekte, waarbij vergrijzing, obesitas en hart- en vaatziekten belangrijke risicofactoren vormen. Chronische nierziekten worden geclassificeerd op basis van het functioneren (filteren) van de nieren. In het laatste stadium, stadium 5, zijn dialyse of niertransplantatie de enige behandelopties. Dialyse neemt slechts gedeeltelijk de functie van de nier over en patiënten moeten meerdere keren per week langdurige behandelingen ondergaan. Transplantatie van een donornier geeft doorgaans een betere kwaliteit van leven, maar door de schaarste van donornieren moeten patiënten lang wachten tot een orgaan beschikbaar is.

Vanwege de huidige tekortkomingen in nierfunctie vervangende behandelingen wordt er gekeken naar alternatieve behandelmethoden. Eén benadering richt zich op het maken van nieuw nierweefsel welk bestaand weefsel kan repareren, vervangen, en/ of ondersteunen. Om dit te kunnen realiseren, wordt er gekeken naar het gebruik van stamcellen. Stamcellen zijn een speciaal type cel met het vermogen zich te ontwikkelen tot elk type cel van het lichaam. Deze eigenschap staat bekend als pluripotentie. Zo zijn stamcellen in een vroeg ontwikkelend embryo van nature pluripotent. Tegenwoordig kunnen onderzoekers in het laboratorium ook pluripotente stamcellen maken van bijvoorbeeld een huidcel of bloedcel. Dit noemen we herprogrammeren en deze nieuwe stamcellen heten geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs). Deze stamcellen kunnen worden gedifferentieerd om bijvoorbeeld nieuwe niercellen te maken. Deze stap vergroot de toegankelijkheid van dit soort weefsels voor onderzoek en therapieën.

Het gebruik van iPSCs is veelbelovend voor de regeneratieve geneeskunde, echter moeten er nog meerdere stappen worden gezet voordat deze cellen gebruikt kunnen worden in klinische therapieën. Voor het ontwikkelen van gericht en veilig nierweefsel uit iPSCs, wordt

er gebruik gemaakt van de kennis van embryonale orgaanontwikkeling. Op basis van deze kennis kunnen uit iPSCs nier organoïden worden gemaakt. Organoïden zijn meercellige, zelf-organiserende weefsels welke de architectuur en samenstelling van een orgaan nabootsen. Tegenwoordig zijn er verschillende methoden om nier organoïden te maken in een laboratorium. Ondanks deze ontwikkelingen zijn er nog steeds veel uitdagingen voordat nier organoïden kunnen worden gebruikt om mensen met nierfalen te helpen. Denk hierbij aan de ontwikkelingsfase waarin de nier organoïden zich bevinden, afwezigheid van functionele bloedvaten, de mate van functionaliteit van de nefronen in de nier organoïden en de mogelijkheid de nier organoïden op humane schaal te gebruiken. Daarnaast is de veiligheid van het weefsel van groot belang, waarbij gewaarborgd moet worden dat de nier organoïde zich niet ontwikkelt tot ongewenst weefsel.

In dit proefschrift worden verschillende aspecten van nier organoïden uit iPSCs beschreven voordat zij kunnen worden gebruikt als (ondersteunend) therapeutisch materiaal. **Hoofdstuk 2** richt zich op de opschaling van deze nier organoïden, omdat de organoïden vaak een afmeting hebben van slechts een paar millimeter groot en een relatief laag aantal nefronen bevatten in vergelijking met de menselijke nier. Voor opschaling kan gewerkt worden aan veel kleine organoïden (scale-out), of zoals in **hoofdstuk 2** het groter maken van een organoïde (scale-up) naar een 'nefron sheet' door de organoïde te verbreden. Zo'n grote 'sheet' behoudt de verdeling van zijn nefron segmenten waardoor er meer nefron structuren aanwezig zijn dan in de kleinere nier organoïden. Door het hogere aantal nefron structuren zouden een paar van deze 'sheets' een mogelijke therapie kunnen zijn om dialyse, of niertransplantatie uit te stellen, mits alle nefronen functioneel worden na transplantatie en even effectief zijn als de 'normale' nefronen.

Het werken met iPSCs ('kweken') en het maken van de nier organoïden zijn tijdrovende processen. In **hoofdstuk 2** en **hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat de ontwikkelende cellen tijdens de differentiatie van stamcellen naar nier organoïden (ook wel progenitorcellen genoemd) kunnen worden opgeslagen bij zeer lage temperaturen (cryopreservatie). Na ontdooien, ontwikkelen deze progenitorcellen zich verder tot nier organoïden. Deze weefsels zijn overeenkomstig aan hun niet ingevroren tegenhangers. **Hoofdstuk 3** behandelt het belang van de kwalitatieve evaluatie van de nier organoïden. Voor het gebruik van deze weefsels in een klinische omgeving moet het hele proces voldoen aan 'Goede Manier van Producenten' (GMP) om de kwaliteit te kunnen waarborgen. Er bestaan nog geen standaard protocollen om de nier organoïden te evalueren, maar in **hoofdstuk 3** worden drie aspecten besproken die een onderdeel kunnen vormen van de kwalitatieve evaluatie. Zo hebben we gekeken naar het percentage levende progenitorcellen voor en na cryopreservatie, dat hoge en gelijkwaardige resultaten laat zien. Verder wordt het gebruik van de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass Spectrometry Imaging (MSI) voorgesteld om de kwaliteit van de organoïden te beoordelen. Deze techniek maakt foto's van honderden moleculen in weefsels waarvan de architectuur nog intact is. Met

MALDI-MSI kan men objectieve vergelijkingen maken in en tussen verschillende weefsels. Organoïden met en zonder cryopreservatie lijken sterk op elkaar: ze hebben dezelfde celtypen en de verdeling van de verschillende nefron segmenten is gelijk.

Een dergelijke meetbare evaluatie van de kwaliteit in de organoïden is van belang om te garanderen dat nefron structuren aanwezig zijn en goed ontwikkelen. Daarnaast is het belangrijk dat de nefron segmenten verder ontwikkelen. In het laboratorium ontwikkelen de weefsels niet volledig zoals in een volwassen orgaan. Transplantatie van nier organoïden in proefdieren zorgt ervoor dat deze structuren wel verder ontwikkelen (matureren). Eén van de belangrijke aspecten van maturatie is de morfologische ontwikkeling van de verschillende nefron segmenten. Dit wordt in **hoofdstuk 4** onderzocht door in muizen getransplanteerde nier organoïden te bestuderen met behulp van transmission electron microscopy (TEM). Transplantatie zorgt ervoor dat bloedvaten in de organoïde groeien en dat de filtratie barrière verder ontwikkelt. Met TEM kunnen zeer scherpe, gedetailleerde foto's gemaakt worden waarin de morfologie en inhoud van individuele cellen geanalyseerd kan worden. De morfologie van een cel is belangrijk voor zijn functie en geeft een indicatie over de staat van maturatie. **Hoofdstuk 4** kijkt gedetailleerd naar elk nefron segment na transplantatie. Door deze ultrastructurele karakterisatie kunnen we de cellen en matrix van de filtrerende structuur goed bestuderen. In de tubulaire structuren zijn ook verschillende morfologische ontwikkelingen te ontdekken, zoals de microvilli in de proximale tubulus en gespecialiseerde cellen in de verbindende tubulus. Ook zijn tubulaire structuren te zien die waarschijnlijk voorlopers zijn van de lis van Henle en/of distale tubulus.

Het verder matureren van functionele nier organoïden is erg belangrijk voor de verdere ontwikkeling van dit weefsel als klinische therapie. Het bestuderen van de organoïde na langdurige transplantatie zou veel inzichten kunnen opleveren. Deze verlengde transplantatie studies worden echter gehinderd door de aanwezigheid van 'off-target' cellen/structuren. Onder off-target cellen verstaan we cellen die van nature niet in het orgaan voorkomen en de beoogde functie van de organoïde negatief beïnvloeden. In ons onderzoek hebben we ontwikkelend kraakbeen(cellen) aangetroffen als een off-target populatie. **Hoofdstuk 5** beschrijft een preliminaire studie om deze kraakbeencellen te reduceren. De oorsprong van deze cellen is nog onbekend, maar deze cellen zijn zowel in het laboratorium als na transplantatie aangetroffen. Het toevoegen van een specifieke stof, hier een TGF β blokker, blijkt effectief in het tegengaan van kraakbeenvorming. Ondanks het succes van kraakbeen vermindering is verder onderzoek noodzakelijk. Technieken zoals MALDI-MSI en single cell RNA sequencing kunnen worden ingezet om een geoptimaliseerd protocol te ontwikkelen en de off-target cellen volledig te elimineren.

In dit proefschrift is er onderzoek gedaan naar het gebruik van nier organoïden gemaakt uit iPSCs. De nadruk ligt op het manipuleren van de grootte van de organoïden, het vermogen om progenitorcellen van de nier organoïden in te vriezen en het gebruik van MALDI-MSI als

techniek om de kwaliteit te beoordelen. Daarnaast wordt de morfologische maturatie van de organoïde na transplantatie en de vermindering van off-target cellen beschreven. Het toekomstig potentieel van nier organoïden is groot en vervolgend onderzoek zou zich moeten richten op het verfijnen van het nier organoïde protocol specifiek het proces van inductie, maturatie, vascularisatie, en veiligheid. Focus op nauwkeurige beoordelingsmethoden en GMP (tijdens de differentie van) organoïden kan leiden tot een betrouwbaarder protocol met een grotere kans op goed ontwikkelde organoïden. Verbetering op deze punten kan de mogelijkheid creëren de organoïden te bestuderen bij verlengde transplantatie studies. Met nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen nier organoïden in de toekomst verder ontwikkeld worden als een betrouwbaar en effectief therapeutisch weefsel voor patiënten met nierfalen.

