



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cellular modifications and interventions for the damaged heart

Engels, M.C.

Citation

Engels, M. C. (2016, May 11). *Cellular modifications and interventions for the damaged heart*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/39392>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/39392>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

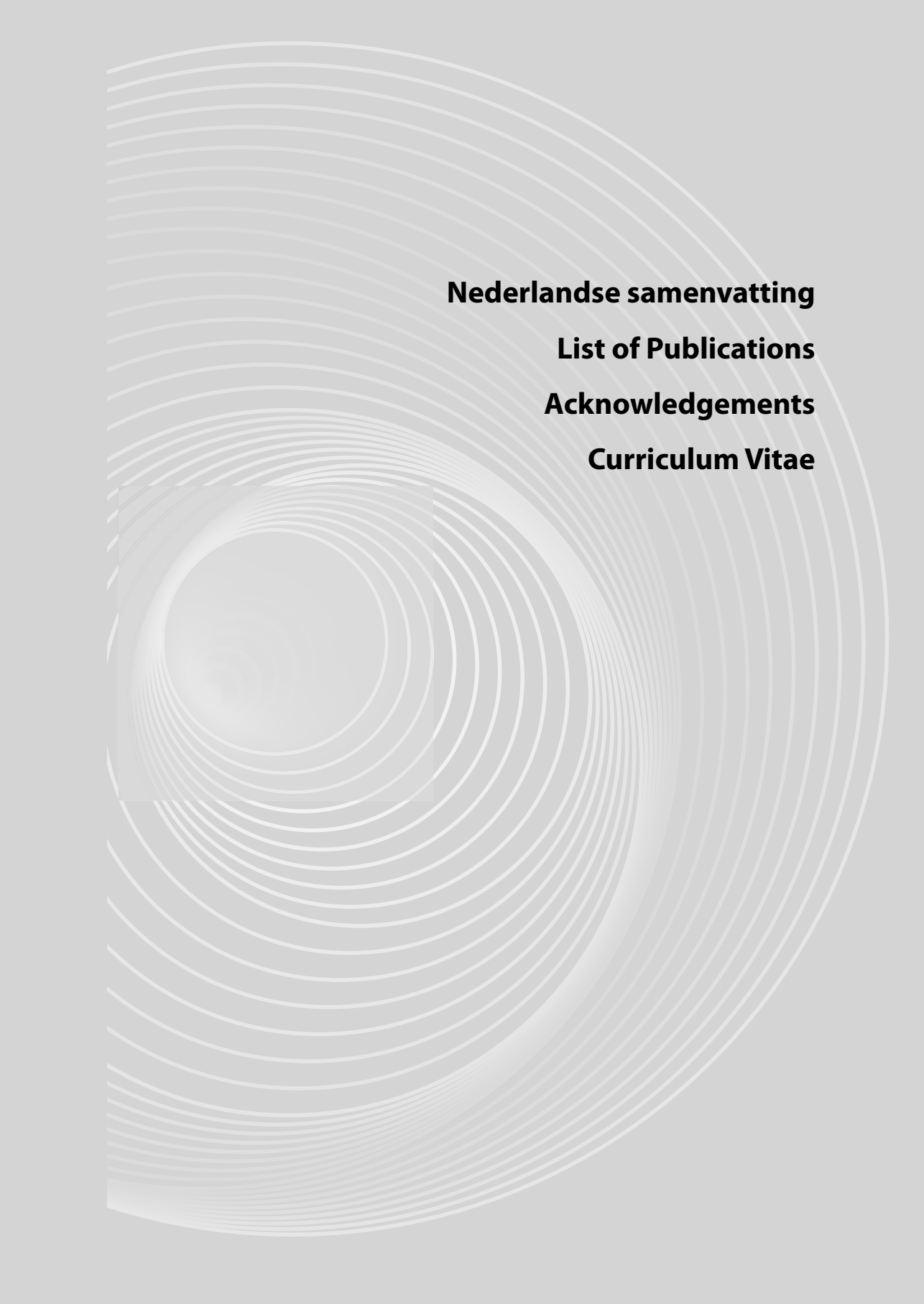


The handle <http://hdl.handle.net/1887/39392> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Engels, Marc Christian

Title: Cellular modifications and interventions for the damaged heart

Issue Date: 2016-05-11



Nederlandse samenvatting

List of Publications

Acknowledgements

Curriculum Vitae



Nederlandse samenvatting

De algemene introductie van dit proefschrift, **Hoofdstuk 1**, beschrijft de normale hartfunctie en in meer detail, de mechanismen van actie potentiaal initiatie en propagatie in het gezonde hart. Verder worden de effecten van ischemische hartziekten beschreven, de huidige behandelopties en hun beperkingen, gevolgd door de mogelijkheden van regeneratieve therapieën voor hartziekten, alsmede de huidige status en problemen die dienen te worden opgelost om deze behandelingsmogelijkheden een stap dichterbij de klinische praktijk te brengen. Het doel van dit proefschrift was het vanuit een mechanistisch oogpunt onderzoeken van celmodificatieprocessen die betrokken zijn bij hartziekten, alsmede de toepassing van celmodificatie voor de behandeling en preventie van schadelijke ziekteprocessen op het electrofysiologisch functioneren van het hart.

Hoofdstuk 2 geeft een uitgebreide beschrijving van het genereren van geïnduceerde pluripotente stam cellen (iPSCs) met fibroblasten (bindweefselcellen) als uitgangscellen, voor vier verschillende soorten, namelijk muis, rat, varken en mens. Om gebruik te kunnen maken van het potentieel die applicaties met pluripotente stamcellen bieden, zoals patiënt-specifieke ziektemodellen of regeneratieve therapieën, is het van cruciaal belang om iPSCs te kunnen generen van hoge kwaliteit en efficiëntie. We kozen daarom vier veelgebruikte diersmodellen en beschreven een efficiënte methode voor het ontwikkelen van iPSC lijnen van hoge kwaliteit.

In **Hoofdstuk 3** worden de resultaten beschreven van een systematische studie naar cytokines en signaleringsmoleculen die betrokken zijn bij de specificatie van de cardiale cellijn. Hiervoor werd een transgene embryonale stam cel (ESC) lijn uit muizen gebruikt. Deze ESC lijn was genetisch gemodificeerd met een basepromotor en cardiale enhancer regio van de Nkx2.5 transcriptie factor gekoppeld aan eGFP, zodat de cellijn kon worden gebruikt als reporterlijn. Een serie van 44 cytokines, groeifactoren en signaleringsmoleculen werden onderzocht door de cellen systematisch te behandelen met verschillende doses. Cardiale differentiatie werd onderzocht door kwantificatie van eGFP⁺ cellen middels flow cytometrische techniek. Deze cellen waren Nkx2.5⁺ cardiale voorlopercellen (cardiac progenitor cells; CPCs). Deze studie identificeerde insulin-like growth factors (IGF1, IGF2, insuline) als regulatoreiwitten die betrokken zijn bij cardiale differentiatie. Verdere analyse toonde dat tijdelijke stimulatie met IGF resulteerde in selectieve proliferatie van de Brachyury⁺ vroege mesodermale celpopulatie, waardoor selectief cardiale voorlopercelpopulatie werd vermeerderd. Dit effect was niet aanwezig bij gelijktijdige inhibitie van Akt of mTOR, bekende signaleringsmoleculen die actief zijn in de latere IGF signaleringscascade. Het ophelderen van de complexe processen van de activatie en inactivatie van signaleringscascades is belangrijk, omdat het kan worden

nagebootst tijdens het dynamische proces van cellijnspecificatie. Vroege tijdelijke activatie van de IGF signaleringcascade dirigeert cellen richting een cardiaal fenotype, en kan uiteindelijk leiden tot efficiëntere cardiale differentiatie. Het kunnen controleren van robuuste differentiatie van pluripotente stamcellen tot hartspiercellen is, gezien de grote vraag naar transplantiecellen, een vereiste voor regeneratieve therapieën.

In **Hoofdstuk 4** worden de electrofysiologische effecten van gedirigeerde celfusie onderzocht van humane ventriculaire littekencellen (human ventricular scar cells; hvSCs) met neonatale rat-hartspiercellen (neonatal rat ventricular myocytes; NRVMs). Littekencellen werden geïsoleerd uit post-myocard infarct littekens van humane linker ventrikels en gekarakteriseerd middels immunocytologische onderzoeken. Gekweekte hvSCs waren voornamelijk (myo-)fibroblasten en ongeveer 40% toonden karakteristieke α -SMA striatie patronen. Co-kweken bestaande uit hvSCs en NRVMs (20%/80%) toonden actie potentiaal duur (APD) verlenging, toename van APD dispersie en significant meer vroege na-depolarisaties (early after-depolarisations; EADs) tijdens 1 Hz elektrische stimulatie, vergeleken met kweken bestaande uit NRVMs, maar geen hvSCs. Genetische transductie van hvSCs met fusogeen *vesicular stomatitis virus-G* (VSV-G) faciliteerde een deels controleerbare celmembraanfusie van de hvSCs met omliggende cellen. Dit resulteerde in fusie producten bestaande uit celclusters die waren ontstaan uit hvSCs en NRVMs (heterokaryons). Heterokaryons toonden meer expressie van Connexine 43 (Cx43) dan ongefuseerde hvSCs, wat kan duiden op betere elektrische koppeling met omliggende cellen. Heterokaryons waren electrofysiologisch verschillend van zowel NRVMs als hvSCs en toonden verminderde exciteerbaarheid vergeleken met NRVMs. Patch-clamp metingen lieten een grote repolarisatie capaciteit zien, alsmede een grotere K_v stroom in heterokaryons vergeleken met NRVMs en hvSCs. Gefuseerde hvSC/NRVM co-kweken hadden een electrofysiologisch gunstiger fenotype dan niet-gefuseerd hvSC/NRVM co-kweken (vermindering van APD prolongatie en dispersie en verminderd aantal EADs). Deze studie biedt een nieuw concept, namelijk dat gedirigeerde celfusie in staat is om de schadelijke arrhythmogene condities tegen te gaan, die het gevolg zijn van de aanwezigheid van fibroblastische cellen, zoals tijdens fibrose. Of gedirigeerde celfusie ooit een therapeutische entiteit wordt blijft onwaarschijnlijk. Echter, fusie van electrofysiologisch verschillende celtypes, leidt tot verschillende processen die het arrhythmogene substraat tegengaan, zoals verbeterde cellulaire koppeling, afname van de intercellulaire weerstanden, en toename van exciteerbaarheid en repolariserend vermogen. Hierdoor is het een interessant model voor het verkrijgen van nieuwe inzichten in hartritmestoornissen op basis van fibrotische processen.

In **Hoofdstuk 5** worden de resultaten van complementaire *in silico* en *in vitro* modellen gepresenteerd voor het bestuderen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan

het ontstaan en de ontwikkeling en dynamiek van een bepaalde ritmestoornis (re-entry) in geremodelleerd hartweefsel. Een veelvoorkomend gevolg van hartspierschade is remodellering van het weefsel, met name (lokale) geleidingsvertraging (b.v. door afregulatie van Cx43) en fibrose. Om dit te onderzoeken werden er co-kweken gemaakt bestaande uit NRVMs met 30% fibroblasten en cellen werden genetisch gemodificeerd middels transductie met lentivirale vectoren die coderen voor inhibitoire RNAs (short-hairpin RNAs), gericht tegen Cx43 in verschillende doseringen. De mate van Cx43 inhibitie was omgekeerd gecorreleerd met de geleidingssnelheid. Middels snelle stimulatie werd APD alternans waargenomen, wat discordant was in ruimte (ruimte-discordante APD alternans). Deze ruimte-discordante APD alternans organiseerde zich als discrete gebieden in het weefsel, zogenaamde alternans fase eilanden (alternans phase islands; APIs). Golfbreuken ontstonden op de grens tussen APIs van tegengestelde polariteit (APIs met lang-kort conformatie; L-K, die direct naast APIs met kort-lang conformatie; K-L lagen. De mate van geleidingsvertraging correleerde met API formatie en uiteindelijk re-eentry complexiteit. Deze studie biedt mechanistische inzicht in het ontstaan van ritmestoornissen, alsmede hun dynamiek, in een model van geleidingsvertraging en fibrose.

In **Hoofdstuk 6** wordt een nieuwe benadering beschreven voor het termineren van re-eentry als het eenmaal ontstaan is. Hiervoor werden atriale hartspiercellen geïsoleerd uit neonatale ratten en gekweekt en getransduceerd met lentivirale vectoren die coderen voor CatCh, een licht-gevoelig ion-kanaal. Deze licht-gevoelige ion-kanalen waren oorspronkelijk geïsoleerd uit algen en zijn recent veel toegepast in de optogenetica, wat zich toelegt op het moduleren van eiwitkarakteristieken middels stimulatie met licht. Dit biedt grote controle in tijd en ruimte. Korte lichtpuls (10 ms blauw licht, 470 nm golflengte) waren in staat om genoeg depolariserende stroom te genereren zodat actie potentialen konden worden opgewekt. Nadat stabiele re-entry inductie werd bewerkstelligd middels snelle elektrische stimulatie, werden cellen gestimuleerd met een korte 500 ms-durende blauwe lichtpuls, welke resulteerde in snelle re-entry terminatie in 100% van de gevallen in CatCh-getransduceerde kweken, maar in 0% van de gevallen in eGFP-getransduceerde controle kweken. Mechanistisch gezien was er sprake van expansie van de rotor kerngrootte, waardoor de fase singulariteit werd gedestabiliseerd, wat leidde tot driften en collisie met de kweekgrenzen of fase singulariteiten van tegengestelde chiraliteit. Deze resultaten demonstreren de mogelijkheid van ritmestoornis terminatie middels optogenetische modificatie van hartspiercellen, waardoor deze cellen worden uitgerust met ion-kanalen die goed controleerbaar zijn, en waardoor ze na toediening van een extern signaal, in staat zijn een intrinsieke stroom op te wekken die in staat is om een ritmestoornis te doen eindigen.

Toekomstperspectieven

Enorme inspanningen zijn tot nu toe geleverd voor het dichterbij brengen van regeneratieve therapieën, zoals cellulaire en genetische interventies naar de klinische praktijk. Deze studies hebben aangetoond dat veel hindernissen dienen te worden genomen alvorens dit belangrijke doel nagestreefd kan worden. Op de eerste plaats moeten differentiatietechnieken en –protocollen verder worden uitgewerkt voor het bereiken van hartspiercelgeneratie uit pluripotente stencellen, die efficiënt en reproduceerbaar is. Veel kan hierbij geleerd worden van cardiale cellijn specificatie en maturatie in het ontwikkelende embryo. Hartontwikkeling is een complex proces, bestaande uit verschillende stadia, waarin cellen afwisselend worden blootgesteld aan moleculaire signalen. Dit resulteert in een precies getimede activatie van specifieke signaleringscascades, die leiden tot de inductie van een specifieke combinatie van transcriptie factoren. Het ontrafelen van de exacte volgorde in plaats en tijd van de activatie en inhibtie van de signaleringscascades en latere latere transcriptie factoren, kan inzicht geven in cardiale cellijn specificatie, welke kan worden nagebootst *in vitro* door precieze toediening van signaleringsmoleculen aan stamcellen die aan het differentiëren zijn, zodat cardiale ontwikkeling gereguleerd kan worden. Gezien de complexiteit van dit proces, is een simpelere, maar bewerkelijke benadering het uitvoeren van een gedetailleerde systematisch screenend onderzoek voor het identificeren van signaleringmoleculen die betrokken zijn bij cardiale differentiatie. Aangezien signaleringscascades kunnen worden geactiveerd tijdens kortdurende ontwikkelingsstappen, is het belangrijk om met hoge resolutie cellijn-specifieke markereiwitten te identificeren, die specifiek zijn voor intermediaire ontwikkelingsstadia. Dit kan de moleculaire begeleiding van cellen naar mature hartspiercellen verbeteren. Deze studies kunnen mogelijk ook leiden tot een verbeterde combinatie van factoren die tot overexpressie dienen te worden gebracht voor het bereiken van directe reprogrammering naar hartspiercellen, die niet te onderscheiden zijn van native cellen uit het werkende hart. Dit is ook belangrijk voor het verkrijgen van cardiale cellen die matuur zijn, zowel uit electrofysiologisch als uit mechanisch oogpunt (in termen van contractiliteit). Voorts zijn verbeterde lokalisatie van getransplanteerde cellen in het zieke substraat, alsmede verbeterde overleving van de graft noodzakelijk voor het bereiken van langdurige transplantatie effecten. Cellulaire begeleiding en organisatie en inbedding in het bestaande cardiale syncytium zorgt voor optimale graft functie en leidt tegelijkertijd tot verminderde ritmestoornissen geassocieerd met het implantaat. Verdere studies moeten meer inzicht geven in cel-integratie in het ontvangende weefsel, een proces dat ook verstoord is in cardiale fibrose. Het arrhythmogene substraat van cardiale fibrose heeft waarschijnlijk overeenkomstige kenmerken met getransplanteerde cellen, aangezien deze ook slecht ingebed en niet optimaal geïntegreerd zijn. Controle over begeleide cellulaire inbedding zou kunnen worden bereikt middels moleculaire gradiënten,

gelijkaan in het ontwikkelende embryo, of door gebruik van een weefsel met een steunstructuur van extracellulaire matrix. Hierop kunnen cellen worden ingebed in de juiste richting middels micro-patronen. Gedetailleerde weefselarchitectuur van het ontvangende orgaan kan worden gevisualiseerd middels 3-dimensionale afbeeldingstechnieken. Deze afbeeldingen kunnen vervolgens worden gereconstitueerd in het laboratorium door middel van 3-dimensionale print-technieken van steunstructuren, om hiermee een exacte pas maat te vinden voor de getransplanteerde cellen. Micro-chirurgische technieken kunnen worden gebruikt voor het transplanteren van een optimaal geïntegreerd transplantatie-weefsel.

Getransplanteerde cellen dienen goed verbonden te zijn met omliggende cellen, een proces dat waarschijnlijk wordt verbeterd door optimale inbedding. Suboptimale verbinding en koppeling kan leiden tot geleidingsvertraging in het geval van de voortgeleiding van het elektrische signaal door het hart, waardoor er een kwetsbaar substraat ontstaat voor re-entry initiatie, bijvoorbeeld door het ontstaan van APD alternans fase eilanden (APIs). Toekomstig onderzoek zou zich moeten richten op de moleculaire mechanismen die zijn gerelateerd aan het ontstaan van APIs. Als, bijvoorbeeld, het ontstaan van APIs zijn gerelateerd aan veranderingen in ion-stromen, dan zouden de betrokken ion-kanalen een mogelijk doelwit kunnen zijn voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen voor de voorkoming van hartritmestoornissen die gebaseerd zijn op re-entry.

Tot slot, celtransplantaten zouden kunnen worden beschermd tegen de schadelijke gevolgen van ritmestoornissen door ze uit te rusten met een intrinsieke defibrillator. De meest elegante oplossing hiervoor zou zijn als de cellen in staat zouden zijn om zelf op te kunnen ontdekken wanneer er een ritmestoot optreedt, en hierop kunnen reageren door activatie van een ion-kanaal, waardoor een defibrillerende stroom geactiveerd wordt. Hoewel er studies zijn die een bewijs van het concept leveren voor het principe dat cellen een intrinsieke defibrillerende stroom kunnen opwekken, zijn er nog veel stappen die genomen dienen te worden om te komen tot een hartcel met de kunstmatige intelligentie voor zelf-terminatie van hartritmestoornissen. Het is waarschijnlijk dat een complex moleculaire uitrusting van cellen een oplossing kan vormen. Hierbij zou een bestaand of transgeen ingebouwd ion-kanaal in staat zijn om waar te nemen dat er een ritmestoot is ontstaan (bijvoorbeeld door waarneming van hoog-frequente membraan potentiaal veranderingen), en hierna zichzelf of een ander ion-kanaal kan activeren, welke in staat is om een stroom te activeren die sterk genoeg is om de ritmestoot te termineren. Cellulaire en genetische interventies voor hartziekten is tot nog toe een moeizaam proces gebleken, waardoor snelle translatie naar de klinische praktijk grotendeels is uitgebleven. Recente ontwikkelingen hebben veel nieuwe inzichten geleverd van problemen die dienen te worden overwonnen, maar bieden tegelijkertijd nieuwe hoop voor individuele therapieën op cellulair of moleculair niveau.

List of Publications

Full papers

Engels MC[†], Majumder R[†], de Vries AA[†], Panfilov AV[†], Pijnappels DA[†]. Islands of spatially discordant APD alternans underlie arrhythmogenesis by promoting electrotonic dyssynchrony in models of fibrotic rat ventricular myocardium. *Sci. Rep.*, 2016;6:24334.

Engels MC[†], Askar SF[†], Jangsangthong W, Bingen BO, Majumder R, Feola I, Liu J, Versteegh MI, Braun J, Klautz RJ, Zeppenfeld K, Ypey DL, Schalij MJ, de Vries AA[†], Pijnappels DA[†]. Forced fusion of human ventricular scar cells with cardiomyocytes suppresses arrhythmogenicity in a co-culture model. *Cardiovasc Res.* 2015;107:601-612.

Bingen BO[†], Engels MC[†], Schalij MJ, Jangsangthong W, Neshati Z, Feola I, Ypey DL, Askar SF, Panfilov AV, Pijnappels DA[†], de Vries AA[†]. Light-induced termination of spiral wave arrhythmias by optogenetic engineering of atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2014;104:194-205.

Sturzu AC, Rajarajan K, Passer D, Plonowska K, Riley A, Tan TC, Sharma A, Xu AF, Engels MC, Feistritzer R, Li G, Selig MK, Geissler R, Robertson KD, Scherrer-Crosbie M, Domian IJ, Wu SM. Fetal mammalian heart generates a robust compensatory response to cell loss. *Circulation.* 2015;132:109-121.

Engels MC, Rajarajan K, Feistritzer R, Sharma A, Nielsen UB, Schalij MJ, de Vries AA, Pijnappels DA, Wu SM. Insulin-like growth factor promotes cardiac lineage induction in vitro by selective expansion of early mesoderm. *Stem Cells.* 2014;32:1493-1502.

Chen JX, Krane M, Deutsch MA, Wang L, Rav-Acha M, Gregoire S, Engels MC, Rajarajan K, Karra R, Abel ED, Wu JC, Milan D, Wu SM. Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res.* 2012;111:50-55.

Rajarajan K[†], Engels MC[†], Wu SM. Reprogramming of mouse, rat, pig, and human fibroblasts into iPS cells. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;Chapter 23:Unit 23.15.

[†] These authors contributed equally to this work.

Selected peer-reviewed abstracts

Engels MC, Askar SFA, Jangsangthong W, Neshati Z, Feola I, Ypey DL, Klautz RJM, Schalij MJ, De Vries AAF, Pijnappels DA. Heterocellular fusion of human ventricular scar cells with neonatal

rat cardiomyocytes ameliorates pro-arrhythmia through APD shortening and MDP lowering by enhanced outward potassium current. *Eur Heart J.* 2014;34:1045.

Engels MC, Rajarajan K, Feistritzer R, Sharma A, Nielsen UB, Schalij MJ, de Vries AA, Pijnappels DA, Wu SM. IGF promotes Cardiac Lineage Induction by Selective Expansion of Mesoderm in vitro. *Circulation.* 2013;128:A17539.

Engels MC, Rajarajan K, Feistritzer R, Sharma A, Nielsen UB, Schalij MJ, de Vries AA, Pijnappels DA, Wu SM. IGF promotes cardiac lineage induction by selective expansion of cardiogenic mesoderm in vitro. *Eur Heart J.* 2013;310,P5037.

Acknowledgements

Many people have contributed to this thesis in various ways and I would like to thank all of them. Prof. dr. Schalijs, dank voor uw onafgebroken steun vanaf het allereerste moment. Daniël, ik ben er heel erg trots op dat ik bij jou heb mogen werken. Dank je wel voor alles. Twan, jouw onuitputtelijke kennis en kunde, gekoppeld aan jouw gevoel voor humor hebben meer voor mij betekend dan je waarschijnlijk kan vermoeden. Dick, hartelijk dank voor jouw onbeperkte enthousiasme en jouw aanstekelijke liefde voor de wetenschap. Minka, dank je wel voor het altijd klaar staan om te helpen en voor jouw zorg voor de mensen in het lab. Cindy, samen hadden we de grootste lol. Dank voor jouw relativerend vermogen. Margreet, we hadden aan een half woord genoeg. Ik bewonder jouw moed en kracht.

I'd like to thank all my former co-workers from the lab: Annemarie, Jia, Iolanda, Yoke, Sasha (kid), Emile, Niels, Zeinab, Saïd, Brian, Masaya and Ivan. Rupa, I had a great time working together with you. Thank you for being such a good friend. Arti, ik kon altijd bij jou terecht voor raad en advies (en een kleine aanmoediging).

Sean, it all started in your lab, thank you for giving me the opportunity to come to the US and for introducing me to the world of science. Boston friends, especially Raja, Ahmed, Kenta, Anke, Arvind, Nick (India man!), Emil, Maxine, Dani, JW, Peter-Paul, Travis, Anthony, Silvia, Lei, Xiaolin, Wen-Pin, Markus, Marcus-André, Jenny, Lisa, thank you for everything. Stanford friends: Guang, Arun, Wen-Po, I enjoyed spending time in California with you guys.

Dank aan al mijn familie en vrienden in Nederland en op Curaçao. Pano Maria, Walter Palm, Diane Eikelboom, onze vriendschappen zijn mij bijzonder dierbaar.

Ramón en Ivonne, jullie hebben mij opgevangen als jullie eigen kind toen ik in Nederland aankwam. Jullie nemen een speciaal plekje in mijn leven in.

A special thank you to the Feistritzer family for making me feel right at home: Dick, Nancye, Scott, Mary Kate, Jenna, Tim, Sara, Andy, Jack and Addy, Porter, Smitty, Lucy and Banjo.

Charla en Ludo, jullie hebben het allemaal van dichtbij meegemaakt. Charla, ik hoop dat ik net zo'n grote steun voor jou kan zijn als jij voor mij bent.

Pap en mam, zonder jullie onvoorwaardelijke liefde en steun was dit allemaal niet mogelijk geweest.

Becca, I started my PhD thinking I would make a big discovery. I did. I can't wait to explore the future together.

Curriculum Vitae

Marc C. Engels was born on May 17th, 1984 in Willemstad, Curaçao where he attended the Peter Stuyvesant College and graduated as the overall Valedictorian of the former Netherlands Antilles. He moved to the Netherlands in 2002 and completed his propedeutical exam in Life Science & Technology *cum laude* before attending medical school at Leiden University. After graduating, he joined the laboratory of Dr. Sean M. Wu at the Cardiovascular Research Center of the Massachusetts General Hospital (Harvard University, Boston, MA, USA) and later at Stanford University (Palo Alto, CA, USA) as a visiting PhD student. During his time in the Wu lab, he focussed on cardiac differentiation of embryonic stem cells. He moved back to the Netherlands to continue his PhD training at the Laboratory of Experimental Cardiology at Leiden University Medical Center under supervision of Prof. Dr. Martin J. Schalij, Dr. Daniël A. Pijnappels and Dr. Antoine A.F. de Vries. At Leiden University, he worked on electrophysiological aspects of cell and gene therapy for heart disease. The results of this work are presented in this thesis. Marc will start with clinical training in July 2016 at the Emory University School of Medicine internal medicine residency program in Atlanta, GA, USA (program director: Dr. Lorenzo Di Francesco).

