

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/39677> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hartogh, S.C. den

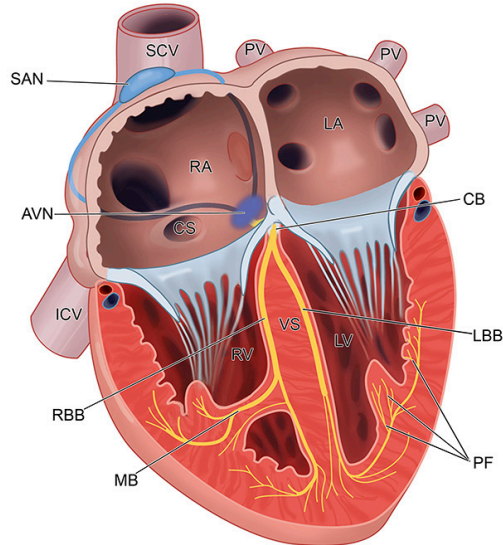
Title: Fluorescent gene reporters in human pluripotent stem cells : as model for studying human heart development and cardiomyocyte differentiation

Issue Date: 2016-05-18

SAMENVATTING

Hoe zit een hart in elkaar?

Het hart is het eerst werkende orgaan tijdens de ontwikkeling van zoogdieren, zoals de mens. Al vlak na de vorming brengt het met pulserende bewegingen de bloedstroom op gang, wat vervolgens zorgt voor de zuurstof- en voedingsstof voorziening van het gehele embryo. Een volwassen hart is complex en bestaat uit vier afzonderlijke hartkamers: twee hartboezems (*de atria*), en twee hartkamers (*de ventrikels*) (**Figuur 1**). Zuurstofrijk bloed stroomt vanuit de longen via het linkerboezem naar het linker ventrikel. Door de samentrekking van de dikke gespierde ventrikelwand, wordt dit bloed het lichaam in gepompt om de organen van zuurstof te voorzien. Zuurstofarm bloed komt vervolgens vanuit het lichaam in het rechterboezem terecht, en wordt via het rechterventrikel de longen in gepompt, zodat het bloed weer voorzien kan worden van zuurstof en terug naar het linkerboezem kan stromen. Het hart heeft een gespecialiseerd geleidingssysteem om te zorgen dat de verschillende kamers in de juiste volgorde samentrekken. De pacemakercellen van het hart geven de eerste prikkel en zorgen dat de twee boezems samentrekken. Dit signaal komt vervolgens binnen in de atrioventriculaire knoop (AV-knoop) en wordt na een korte vertraging doorgestuurd naar een bundel van vezels, die vertakt, en via Purkinje fibers verbonden is met de hartspiercellen van de ventrikels, die dan samentrekken.



Figuur 1. Het volwassen hart met het bijbehorende geleidingssysteem. SAN: sinoatrial node. AVN: Atrioventricular node. CB: Common bundle/His Bundle. RA: right atrium. SCV: superior caval vein. LBB/RBB: left/right bundle branches. PF: Purkinje Fiber network. CS: coronary sinus. IVC: inferior vena cava. LV: left ventricle. MB: moderator band. PV: pulmonary vein. RV: right ventricle. *Jongbloed et al. Differentiation 2012.*

Waarom doen we onderzoek naar de ontwikkeling van het hart?

De vorming en ontwikkeling van het hart is complex. Genetische afwijkingen spelen vaak al tijdens de vroege ontwikkeling een grote onderliggende rol in het ontstaan van hartziekten. Echter, soms komen afwijkingen pas tot uiting in een later stadium van het leven, zoals bij hevige inspanning of ouderdom. Daarnaast wordt het ontstaan van ziekten beïnvloed door omgevingsfactoren, zoals het gebruik van medicijnen. Om het ontstaan van hartziekten te kunnen voorkomen, en te genezen met de juiste medicijnen, is het van belang een gedetailleerd begrip te hebben van de ontwikkeling van het menselijk (*humane*) hart, en de reactie van het hart op specifieke fysiologische omstandigheden. Het gebruik van humane (ziekte)modellen is hiervoor een pré.

Kloppende hartcellen kweken in een schaalpje

Omdat het gebruik van humane embryo's beperkt is, en in veel landen ethisch omstreden, worden vooral proefdieren en eenvoudige cel modellen gebruikt om deze vraagstukken te beantwoorden. Echter, vaak blijkt de stap tussen mens en dier groot. Helaas liggen goede humane onderzoeksmodellen niet voor het oprapen. Het kweken van humane hartcellen (*cardiomyocyten*) uit stamcellen biedt daarom een exclusieve oplossing.

Vanuit humane pluripotente stamcellen (hPSCs) zijn we tegenwoordig in staat grote hoeveelheden cardiomyocyten te kweken. Onder hPSCs verstaan we embryonale stamcellen (hESCs) en geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs). hESCs worden, sinds 1998, geïsoleerd uit een celklompje van een gerijpte bevruchte eicel, blastocyst genaamd, wat een overblijfsel is van IVF behandelingen. hiPSCs worden, sinds 2007, verkregen uit menig celtype van een volwassen mens door deze te "induceren" met een specifieke combinatie van genen, en zijn daarom ethisch minder omstreden. Uit hPSCs kunnen we bijna elke cel van het menselijk lichaam vormen door ze in een gecontroleerde omgeving een specifieke richting op te sturen met behulp van groeifactoren of chemische moleculen.

Het kweken van cardiomyocyten uit hPSCs geeft ons een unieke kans om de embryonale ontwikkeling van het menselijke hart in een kweekschaal te kunnen bestuderen, en daarbij inzicht te krijgen in het ontstaan van aangeboren hartziekten.

Klinische toepassingen van in vitro gekweekte hartcellen

Sinds we in staat zijn hiPSCs te creëren, bieden deze *in vitro* verkregen hartcellen ook een groot potentieel voor toekomstige klinische en farmaceutische toepassingen, zoals celtransplantaties ter vervanging van beschadigd hartweefsel, en het opzetten van effectiviteits/toxiciteit-screening-experimenten (*assays*) voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen.

De ontwikkeling van een nieuw medicijn begint bij de ontdekking van nieuwe stoffen in het "drug discovery" stadium in het laboratorium. Na uitvoerige testen op cel- en proefdiermodellen, wordt een strenge selectie van medicijnen getest in klinische studies op mensen. Echter, juist in dit stadium blijken veel medicijnen niet voor elke patiënt

effectief te zijn, of voor negatieve bijwerkingen te zorgen, die in het initiële "drug discovery" stadium niet zijn opgepikt in de huidige screenings-modellen. Daarnaast zijn er momenteel veel medicijnen op de markt met negatieve bijwerkingen voor het hart, zoals veel chemotherapeutische middelen, die mogelijk in een goede toxiciteits-screening-assay uitgeselecteerd hadden kunnen worden.

De vraag naar betrouwbare assays zal daarom in de toekomst steeds groter worden, mede door de aanstelling van nieuwe wetgeving waarbij het gebruik van proefdieren verminderd zal moeten worden, en de wetgeving rondom de gevaren voor negatieve bijwerkingen van medicijnen steeds strenger wordt. Daarnaast zal de medische wereld zich, dankzij de ontwikkeling van patiënt-specifieke iPS modellen, steeds meer gaan richten op patiënt-specifieke medicatie (*personalized medicine*), wat zal kunnen leiden tot een hogere kwaliteit van zorg en een bijdrage aan de ontwikkeling van een duurzaam zorgsysteem, wat van groot toekomstig belang zal zijn in een vergrijzende maatschappij.

Dit promotieonderzoek

Voor farmaceutische toepassingen is het van belang dat de voorspellende waarde van cardiomyocyte assays zo betrouwbaar mogelijk is, waarbij het gebruik van specifieke cardiomyocyte subtypes van invloed kan zijn. Voorbeelden van subtypes zijn: hartkamer-(ventrikel) of hartboezem-(atrium) cellen, of cellen van het geleidingsstelsel, zoals pacemakercellen (**Figuur 1**). Daarnaast is gebleken uit cel transplantatie studies in dieren, dat de combinatie van de juiste celtypes van groot belang is voor vervanging van beschadigd hartweefsel. Om deze redenen is het voor zowel de academische als de farmaceutische wereld interessant om uit humane pluripotente stamcellen een zuivere populatie van specifieke subtypes hartcellen te verkrijgen. In deze thesis beschrijven we de generatie van fluorescente stamcel reporter lijnen als methode om inzicht te verkrijgen in de moleculaire signalen die een rol spelen bij de vorming van specifieke voorlopercellen en cardiomyocyte subtypes.

Hoofdstuk 1 geeft een korte inleiding in de mogelijkheden van het gebruik van pluripotente stamcellen en translationele toepassingen. We geven aan hoe kennis, verkregen uit embryonale diermodellen zoals de muis, heeft geleid tot de ontwikkeling van efficiënte *in vitro* kweekprotocollen voor het verkrijgen (*differentiëren*) van cardiomyocyten uit humane pluripotente stamcellen. We beschrijven hoe genetische netwerken* *in vivo*, op een vergelijkbare manier van belang zijn tijdens de vorming van cardiomyocyten *in vitro*, wat aangeeft hoe nauw onze *in vitro* kweekmodellen overeenkomen met *in vivo* ontwikkelingsbiologie.

*: genetische netwerken bestaan uit een netwerk van eiwitten (de producten van genen), die door complexe interacties met elkaar en met het DNA, de activiteit van andere genen kunnen beïnvloeden.

Hoofdstuk 2 geeft een uitgebreid overzicht van de tot nu toe beschreven *in vitro* fluorescente pluripotente stamcel reporter lijnen* die gebruikt zijn voor het visualiseren en verkrijgen van *in vitro* hartcellen. Daarnaast beschrijven we de potentie van fluorescente reportermodellen voor de ontwikkeling van assays op het gebied van medicijnontwikkeling, toxiciteitscreenings, en ziektemodellen, en laten we zien hoe fluorescente reporters gebruikt kunnen worden in transplantatiestudies van het hart.

*: in een fluorescente stamcel lijn is het DNA van een stamcel gemodificeerd; we vervangen de genetische code van een gen dat we willen volgen, door de genetische codering voor een fluorescent eiwit. Wanneer het specifieke gen actief wordt in een specifiek celtype, zal het fluorescente eiwit worden aangemaakt en zichtbaar worden in een cel.

Hoofdstuk 3 beschrijft de opbouw van een duale fluorescente reporter lijn: een MESP1^{mCherry/w}NKX2-5^{eGFP/w} humane embryonale stamcel lijn. Deze lijn maakt het mogelijk om tijdens *in vitro* cardiomyocyte differentiatie, de ontwikkeling van vroege voorlopercellen van het hart (en het gen MESP1 tot expressie brengen, nog voordat het hart is gevormd) te volgen, om vervolgens te bestuderen welke moleculaire mechanismen een rol spelen bij hun verdere differentiatie naar cardiomyocyten (en het gen NKX2-5 tot expressie brengen, wat aanwezig is kort voor de vorming, en in het gehele hart). De expressie van bovengenoemde genen in specifieke celtypes kan gevolgd worden doordat ze gekoppeld zijn aan de genetische codes voor fluorescente eiwitten, zoals mCherry of eGFP. Deze eiwitten worden bij een specifieke lichtlengte aangeslagen (excitatie), en zenden vervolgens een eiwit-specifiek lichtpatroon uit (emissie).

In dit hoofdstuk isoleren en karakteriseren we MESP1-mCherry positieve voorlopercellen op basis van de aanwezigheid van het mCherry eiwit. We kijken naar de expressie van celmembraan markers en naar het algehele genexpressie patroon. We identificeren specifieke verschillen met eerdere *in vitro* studies in muis, en geven daarmee het belang aan van *in vitro* studies in menselijke celtypes.

In **Hoofdstuk 4** differentiëren we geïsoleerde MESP1 voorlopercellen naar NKX2-5 positieve hartcellen en meten we genexpressie profielen op verschillende tijdstippen, waaronder dag 5, dag 7, dag 10 en dag 14. Op basis van temporale genexpressie patronen, voorspellende eiwit-eiwit interacties met huidige belangrijke transcriptionele genen, en hun DNA bindende eigenschappen, identificeren we potentiële (co-)regulators van cardiomyocyte differentiatie. Functionele experimenten zullen moeten uitwijzen wat de rol van deze potentiële regulators zal zijn.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we de opbouw van een duale TBX3e-mCherry-NKX2-5^{eGFP/w} hESC reporter line. TBX3 komt in het hart specifiek tot expressie in het geleidingssysteem.

Voor studies naar afwijkingen binnen dit systeem is het van belang om de moleculaire mechanismen die een rol spelen bij het ontstaan van conductiesysteem cardiomyocyten te begrijpen. Met behulp van deze duale reporter lijn hoopten we TBX3 positieve cardiomyocyten te verkrijgen voor verdere karakterisatie. Echter, het blijkt moeilijk te zijn om met de huidige kennis van het ontwikkelende geleidingssysteem *in vivo*, protocollen op te zetten om *in vitro* pluripotente stamcellen te differentiëren naar deze celtypes. Ook technische uitdagingen kunnen bij de afwezigheid van TBX3 positieve cardiomyocyten een rol hebben gespeeld.

Hoofdstuk 6 beschrijft de opbouw van een derde duale cardiale reporter: MYL2-T2A-mCherry-NKX2-5^{eGFP/w} hESCs. Deze reporter lijn maakt het mogelijk om specifiek ventriculaire cardiomyocyten te isoleren, door middel van co-expressie van MYL2 en NKX2-5. In deze studie laten we zien dat de ventriculaire marker MYL2 pas laat tijdens differentiatie hoog tot expressie komt, en daarom mogelijk een graadmeter is voor cardiomyocyte maturatie. Daarnaast laten we zien dat maturatie-gerelateerde factoren als dexamethason, IGF-1, en thyroid hormoon MYL2 expressie in cardiomyocyten verhogen.

In **Hoofdstuk 7** bestuderen we het delingsvermogen (proliferatie capaciteit) van MESP1 positieve voorlopercellen van het hart. Het verkrijgen van een oneindige voorraad van voorlopercellen kan van grote interesse zijn voor transplantatiestudies of voor grootschalige experimentele assays. We laten met time-lapse imaging zien hoe we de proliferatie van deze voorlopercellen kunnen visualiseren met behulp van het eiwit Aniline, wat in deze assay gekoppeld is aan het fluorescente eiwit eGFP. Daarnaast laten we zien hoe de ontwikkeling van automatische kwantificatie software, in combinatie met deze fluorescente proliferatie reporter, mogelijk interessant kan zijn voor grootschalige proliferatie-inducerende screening assays op hartvoorlopercellen of cardiomyocyten.

Hoofdstuk 8 omvat de algemene discussie van dit proefschrift. We concluderen dat de ontwikkeling van nieuwe moleculaire technieken en efficiënte differentiatie protocollen gaat bijdragen aan een beter begrip van de complexiteit van epigenetische en genetische netwerken die cruciaal zijn voor de embryonale ontwikkeling van het humane hart, bestaande uit een groot aantal subtypes hartcellen. Kennis van humane hartontwikkeling is de basis voor het verkrijgen van inzicht in het ontstaan van aangeboren en verkregen hartafwijkingen, en de ontwikkeling van voorspellende complexe fysiologisch-relevante cardiomyocyte-assays voor menselijke ziektemodellen, medicijn ontwikkeling- en testsystemen. De ontwikkeling van proefdier-vrije en hoog-voorspellende hPSC-gebaseerde cardiomyocyte assays is veelbelovend.