



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cellular and genetic approaches to myocardial regeneration

Tuyn, J. van

Citation

Tuyn, J. van. (2008, January 9). *Cellular and genetic approaches to myocardial regeneration*. Department of Cardiology and Department of Molecular Cell Biology (MCB), Faculty of Medicine, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12548>

Version: Corrected 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/1887/12548>

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

Chapter

8

Samenvatting, conclusies en
vervolgonderzoek

Samenvatting en conclusies

Het doel van dit proefschrift was het ontwikkelen van nieuwe op gen- en celtherapie gebaseerde methoden om schade in het hart te genezen. Celtherapie is het injecteren van (stam) cellen in de bloedbaan of lokaal op de plaats van de schade waar deze cellen een positief effect hebben op het beschadigd weefsel en mogelijk bijdragen aan het genezingsproces. Omdat de capaciteit voor genezing van het menselijke hart zeer beperkt is, heeft weefselregeneratie van het hart na bijvoorbeeld een hartinfarct veel potentieel voor therapeutische toepassing en wordt momenteel in verschillende klinische omstandigheden getest. Het is bewezen dat (stam) celtherapie een gunstig effect heeft op de functie van het hart, echter daadwerkelijke regeneratie van het hart met aanmaak van nieuwe hartspiercellen treedt praktisch niet op. In dit proefschrift hebben we twee verschillende strategieën om hartregeneratie te verbeteren onderzocht. De eerste strategie was het induceren van hartspierdifferentiatie door de cellen zo genetisch te manipuleren dat ze het gen coderend voor myocardin tot expressie brengen. Myocardin is een transcriptiefactor die centraal staat in het genetische netwerk dat hartspierdifferentiatie reguleert. Als tweede strategie trachtten we hartspierregeneratie te verbeteren door bij celtherapie gebruik te maken van cellen die een ondersteunende functie hebben bij de ontwikkeling van het hart in het embryo. Voor deze strategie onderzochten we de eigenschappen van cellen die tijdens de hartspierontwikkeling uit het epicard (de buitenste laag van het hart) ontstaan, de zogenaamde EPDC's. Tijdens de ontwikkeling van het hart induceren EPDC's de ontwikkeling van het compacte myocard en vormen de gladdespiercellen en het omliggend bindweefsel van de kransslagaderen alsmede de bindweefselcellen in het hart.

De mesenchymale stamcel (MSC) is een veel gebruikte stamcel voor celtherapie voor het hart. Het is echter gebleken dat MSC's zich slechts sporadisch tot nieuwe hartspiercellen ontwikkelen na inspuiten in het hart. Daarom testten we of de differentiatie tot hartspiercellen geïnduceerd kon worden door MSC's te transduceren met een permanent actieve vorm van het gen dat codeert voor myocardin. Myocardin is een recentelijk geïdentificeerde transcriptiefactor die een centrale rol speelt in de ontwikkeling van zowel gladdespiercellen als hartspiercellen. Het was onze hypothese dat het activeren van *myocardin* expressie zou leiden tot een spiercelfenotype in niet-spiercellen. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat expressie van *myocardin* in MSC's leidt tot de vorming van verscheidene componenten van het contractiel apparaat van hartspiercellen, verschillende transcriptiefactoren en het hormoon ANP behorende bij een hartspiercel. Dit suggereert dat er een hartspierfenotype geïnduceerd werd door myocardin, maar de cellen gingen echter niet spontaan kloppen, wat erop duidt dat de differentiatie incompleet is. Naast het activeren van hartspier-specifieke genen werden door myocardin ook verschillende gladdespiercel genen geactiveerd, wat impliceert dat myocardin tegelijkertijd zowel gladdespiercel differentiatie als hartspiercel differentiatie induceert. Ook vonden we dat myocardin hartspiergenen activeert in fibroblasten uit de huid, wat suggereert dat de functionaliteit van myocardin niet beperkt is tot stamcellen.

Als alternatieve strategie voor het verbeteren van de functie van een beschadigd hart, overwogen we de (her)introdactie van celtypen die ondersteunende functies vervullen tijdens de embryonale ontwikkeling van het hart. Tijdens de embryogenese ontstaan uit de buitenste laag van het hart (het epicard) multipotente cellen (EPDC's). EPDC's vormen zowel de bindweefselcellen in het hart als de bindweefselcellen en de gladdespiercellen van de kransslagaderen. EPDC's induceren ook de ontwikkeling van het Purkinje systeem en het verdikken van het myocardium. Een eerste vereiste voor therapeutische toepassing van deze cellen was vast stellen dat ze aanwezig zijn in het epicard van een volwassen persoon en dat ze daaruit geïsoleerd kunnen worden. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat de mesotheliale cellen van het volwassen epicard, evenals hun embryonale tegenhangers, zich kunnen ontwikkelen tot fibroblast-achtige cellen *in vitro*. Vervolgens kunnen deze cellen, mits ze bloot gesteld worden aan de juiste cytokines, zich ontwikkelen tot gladdespiercellen. We concludeerden dat EPDC's van volwassen personen gedeeltelijk nog het differentiatievermogen bezitten van embryonale EPDC's. De in dit PhD project ontwikkelde EPDC kweken zijn een ideaal modelsysteem om de biologische eigenschappen en het therapeutisch potentieel van deze cellen te onderzoeken.

De vorming van littekenweefsel in het hart (bijvoorbeeld na een hartinfarct) vermindert de hartfunctie door verstarring en vergroting van het hart en door belemmering van de elektrische geleiding over het hart. Het lokaal transdifferentiëren van littekenfibroblasten tot hartspiercellen zou een elegante methode zijn om regeneratie van het hart te bewerkstelligen. Een dergelijke strategie zou veel problemen die celtherapie parten spelen vermijden, zoals de slechte overleving en integratie van ingespoten cellen in het hart. In **hoofdstuk 4** demonstreren we dat net zoals voor de MSC's uit hoofdstuk 2, ventriculaire littekenfibroblasten een hartspiercelachtig fenotype aannemen na infectie met een vector coderend voor myocardin. Componenten van het contractiele apparaat van hartspiercellen, hartspier-specifieke transcriptiefactoren, hormonen en kanaaleiwitten zijn rijkelijk te detecteren in met *myocardin*-getransduceerde littekenfibroblasten. Ook stelt transductie met *myocardin* littekenfibroblasten in staat een actiepotentiaal voort te geleiden en een artificiële elektrische blokkade in een kweek van cardiomyocyten te herstellen. Hoewel de met *myocardin* behandelde littekenfibroblasten niet spontaan samentrekken en ze een ongeorganiseerd contractiel apparaat bezitten, biedt de mogelijkheid om littekenfibroblasten van hartspierachtige elektrische eigenschappen te voorzien een basis voor het ontwikkelen van een nieuwe therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van ritmestoornissen.

Veel klinische ritmestoornissen ontstaan door lokaal trage elektrische geleiding, veroorzaakt door de aanwezigheid van littekenfibroblasten. Ook het niet reageren op resynchronisatietherapie door patiënten met ernstig hartfalen is gerelateerd aan de aanwezigheid van littekenweefsel op de plaats van de linker kamer elektrode van biventriculaire pacemakers. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat trage geleiding over menselijke littekenfibroblasten uit beschadigd hartspierweefsel kan worden aangetoond in een *in vitro* model en dat transductie van uit hartspier afkomstige

littekenfibroblasten met een vector coderend voor myocardin de geleidingssnelheid doet toenemen tot niveaus vrijwel gelijk aan die van hartspiercellen. Verder kunnen met *myocardin* getransduceerde littekenfibroblasten elektrisch gestimuleerd worden dwz. ze kunnen een elektrisch signaal van een elektrode doorgeven naar verderop gelegen cardiomyocyten. Deze gegevens suggereren dat *in situ* transductie van littekenfibroblasten met een vector coderend voor het *myocardin* gen gebruikt kan worden om de geleiding van elektrische signalen in beschadigd hartweefsel te verbeteren en om de elektrische stimuli van pacemakers te geleiden door gebieden van fibrose in het hart. In beide gevallen is te verwachten dat dit leidt tot verminderde dissynchronie van de linkerkamer, waarvan bekend is dat het de hartfunctie en de gezondheid van de patiënt ten goede komt.

188

In hoofdstuk 2 hebben we laten zien dat MSC's eigenschappen van hartspiercellen krijgen na infectie met een vector coderend voor myocardin. In **hoofdstuk 6** vergelijken we de therapeutische effecten van met *myocardin* getransduceerde MSC's afkomstig uit patiënten met ischaemisch hartfalen met onbehandelde MSC's afkomstig van dezelfde patiënt in een hartinfarctmodel in de muis. Na injectie van onbehandelde MSC's werd in het beschadigde muizenhart een bescheiden verbetering van de hartfunctie, maar geen vermindering van de hartvergroting (remodelling) gevonden. Daarentegen resulteerde intramyocardiale injectie van met *myocardin* getransduceerde MSC's in een significant betere hartfunctie en een verminderde hartvergroting ten opzichte van controle muizen met hartinfarct. Histologische analyse liet zien dat met *myocardin* getransduceerde MSC's hartspier-specifieke eiwitten tot expressie brachten in tegenstelling tot onbehandelde MSC's. Echter, net als de met *myocardin* behandelde MSC's *in vitro*, misten ook de met *myocardin* behandelde MSC's *in vivo* specifieke markers van volwassen hartspiercellen. Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de gevonden grotere positieve effecten op de hartfunctie en remodeling van met *myocardin* getransduceerde MSC's boven onbehandelde MSC's moet nog opgehelderd worden. Echter, kwantitatieve bepalingen lieten zien dat significant meer met *myocardin* getransduceerde MSC's in het beschadigde hart waren geïntegreerd in verhouding tot onbehandelde MSC's. Dit suggereert dat transductie met *myocardin* de overleving en/of de integratie efficiëntie van MSC's in het hart verbetert. Gezamenlijk laten deze resultaten zien dat injectie van met *myocardin* getransduceerde MSC's resulteert in een grotere verbetering van de hartfunctie dan injectie met onbehandelde MSC's in een gebied van hartschade in een muizenmodel.

In **hoofdstuk 7** gebruiken we micro-array analyse om de genexpressieprogramma's geïnduceerd door de hartspier (CM-MYOC) en de gladde spier (SM-MYOC) varianten van myocardin direct te vergelijken met dat van een functionele hartspiercel. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van geïsoleerde humane hartspier voorloper cellen (CMPC's), als modelsysteem voor vroege hartspiercelontwikkeling. Deze CMPC's kunnen *in vitro* differentiëren tot spontaan samentrekkende hartspiercellen door ze bloot te stellen aan 5'-azacytidine bevattend medium. Het tot expressie brengen van CM-MYOC in CMPC's leidde tot de inductie van een genexpressie programma dat veel lijkt op dat van een hartspiercel, echter met twee duidelijke

verschillen. Hoewel de met *CM-MYOCD* getransduceerde CMPC's de meeste componenten van het contractiele apparaat van de hartspiercel (de sarcomeer) tot expressie brachten, induceerde *CM-MYOCD* niet de expressie van de genen coderend voor *nebulin*, *nebulette*, *titin cap* en *myosin binding protein C3*. In overeenkomst met het ontbreken van georganiseerde sarcomeren in met *CM-MYOCD* getransduceerde CMPC's, is voor elk van deze genen bekend dat ze vereist zijn voor de organisatie van de sarcomeer. Verder brachten de met *CM-MYOCD* getransduceerde CMPC's lagere niveaus van verschillende hartspiercel-specifieke ionkanalen, zoals de ryanodine receptor 2 en verschillende kalium kanalen, tot expressie dan de hartspiercellen. Vergelijking van de genen geïnduceerd door *CM-MYOCD* en *SM-MYOCD* wees uit dat *CM-MYOCD* een specifieke set hartspiergenen veel efficiënter kan activeren dan *SM-MYOCD*, terwijl andere hartspiercel- and gladdespiercelgenen door beide vormen van myocardin evengoed geactiveerd werden. Dit laat zien dat *CM-MYOCD* een veel betere activator van hartspiergenen is dan *SM-MYOCD*. Echter, het tot expressie brengen van *myocardin* alleen is niet genoeg om cellen van een compleet hartspiercelfenotype te voorzien.

Conclusies en toekomstperspectieven

Het herprogrammeren van somatische cellen door middel van genetische manipulatie is een nieuwe technologie, die desalniettemin veelbelovend is voor uiteindelijk therapeutisch gebruik. Met voldoende kennis van de onderliggende genetica, kan genetische modificatie een zeer krachtige en specifieke methode zijn voor het induceren van cellulaire differentiatie. Daarentegen blijkt uit een toenemend aantal recente studies dat spontane differentiatie van stamcellen onder invloed van schade of omgevingssignalen op z'n best een zeer zeldzame gebeurtenis is.

Uit het hart geïsoleerde littekenfibroblasten konden na transductie met een vector coderend voor myocardin een actiepotentiaal geleiden met een snelheid die de elektrische geleidingssnelheid van hartspiercellen *in vitro* benadert. Herstel van de elektrische geleiding door gebieden van littekenweefsel in het hart kan van groot therapeutisch nut zijn voor het behandelen van ritmestoornissen en voor verbetering van de kans op succesvolle resynchronisatie therapie van een fibrotisch hart. Genetische modificatie van fibroblasten in het hart vereist echter wel een efficiënte vector. Op het moment zijn vectoren gebaseerd op het adenovirus-geassocieerde virus (AAV) het best in staat om hartspiercellen te transduceren. De beste transductie efficiënties in het hart zijn bereikt met AAV serotypen 1, 6, 8 en 9 in de rat. Het testen van dit concept in een hartinfarctmodel in de rat is daarom een logische eerste keuze voor vervolgonderzoek.

Myocardin is de enige factor tot dusver geïdentificeerd, die bij overexpressie een uitgebreid hartspiergen expressieprogramma kan activeren. Desondanks is overexpressie van *myocardin* in cellen niet voldoende om een compleet hartspierfenotype te verkrijgen. Om een (meer) volledig hartspierfenotype te induceren zijn waarschijnlijk andere factoren nodig, mogelijk in combinatie met myocardin. Om dergelijke factoren te identificeren zijn nieuwe inzichten nodig in het genetische programma dat ten grondslag ligt aan hartspiercel differentiatie. Een model van hartspierceldifferentiatie zoals dat van de CMPC's zal van grote

waarde zijn voor dit onderzoek.

In een hartinfarctmodel in de muis bleek injectie van MSC's getransduceerd met *myocardin* de hartfunctie significant te verbeteren ten opzichte van onbehandelde MSC's. Deze resultaten duiden erop dat voorbehandeling van stamcellen met een voor *myocardin* coderende vector toekomstige (stam)celtherapie mogelijk kan verbeteren. Er zal echter eerst onderzocht moeten worden of de gevonden hartfunctieverbetering zich niet beperkt tot de korte termijn. Het mechanisme waarmee de met *myocardin* getransduceerde MSC's voor een verbetering van de hartspierfunctie zorgen is nog onbekend en behoeft ook opheldering.

Net als EPDC's tijdens de ontwikkeling van het embryo, kunnen EPDC's geïsoleerd uit het volwassen hart zich ontwikkelen tot ondersteunende fibroblasten en gladdespiercellen. Deze *in vitro* resultaten suggereren dat EPDC's zouden kunnen bijdragen aan het herstellen van de structuur en de vasculatuur van het beschadigde hart en daarmee zouden ze een nuttige toevoeging kunnen zijn aan bestaande celtherapie protocollen. Onderzoek naar de lange-termijn effecten op de hartfunctie van injecties met EPDC's in een infarctmodel worden momenteel uitgevoerd.

