



Universiteit
Leiden
The Netherlands

State of the heart : the promise of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in disease modelling, differentiation and development
Berg, C.W. van den

Citation

Berg, C. W. van den. (2016, October 26). *State of the heart : the promise of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in disease modelling, differentiation and development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/43820>

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/1887/43820>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43820> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Berg, C.W. van den

Title: State of the heart : the promise of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in disease modelling, differentiation and development

Issue Date: 2016-10-26



CHAPTER

Nederlandse samenvatting

9

Ontdekkingen voor stamcel onderzoek

Er zijn twee verschillende soorten stamcellen: de volwassen stamcel, die zorgt voor vernieuwing van organen en weefsels en de pluripotente stamcel. De unieke eigenschappen van pluripotente stamcellen zijn 1) dat zij zich ongelimiteerd vermenigvuldigen en vernieuwen tijdens de celweek in het laboratorium en 2) dat zij zich kunnen ontwikkelen (differentiëren) tot alle gespecialiseerde celtypen van het menselijk lichaam. Ons laboratorium maakt gebruik van twee verschillende typen pluripotente stamcellen: de embryonale stamcellen (ESCs) en de geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs).

De ESCs worden geïsoleerd uit een klompje cellen van een bevruchte eicel (blastocyst) van enkele dagen oud. Het gebruik van deze stamcellen is vaak ethisch omstrede en de ontwikkeling van iPSCs in het laboratorium biedt hiervoor uitkomst. Dit is een wetenschappelijke doorbraak: voor deze iPSCs zijn geen embryo's nodig en ze kunnen in het laboratorium worden verkregen door het herprogrammeren van gespecialiseerde volwassen lichaamscellen. Deze gespecialiseerde cellen, bijvoorbeeld geïsoleerd uit het bloed of de huid, hebben zonder tussenkomst van de onderzoeker niet het vermogen terug te keren naar de originele pluripotente staat. Belangrijke genen die cellen pluripotent maken, zijn in deze cellen sinds het proces van differentiatie uitgeschakeld. Door in het laboratorium aan deze volwassen cellen 4 regulatorgenen toe te voegen (essentieel voor pluripotente stamcellen), worden deze belangrijke genen weer aangezet (komen tot expressie). Het resetten van de cellen duurt een paar weken, maar dit resulteert uiteindelijk in pluripotente stamcellen die lijken op ESCs. Ook kunnen deze iPSCs differentiëren tot verschillende celtypen van het menselijk lichaam.

De mogelijkheden van deze iPSCs in het biomedisch onderzoek zijn veelbelovend. Het grote voordeel van deze iPSCs is dat het gebruik van deze cellen minder ethisch beladen is. Bovendien geeft het ons de mogelijkheid deze cellen te maken van patiënten met een genetische ziekte die wordt veroorzaakt door een kleine verandering in het DNA (mutatie). Van deze patiënt kunnen we in het laboratorium stamcellen maken en deze uiteindelijk differentiëren tot gespecialiseerde celtypen om de achtergrond of oorzaak van de ziekte te kunnen onderzoeken. Ook kunnen we deze cellen gebruiken voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen en deze testen bij gespecialiseerde cellen afgeleid van een patiënt. Zo kan een therapie op maat (personalized medicine) worden ontwikkeld en kunnen eventuele bijwerkingen al in een vroeg stadium worden geconstateerd. Bovendien kunnen de gespecialiseerde cellen op termijn een belangrijke vervanging worden voor het gebruik van proefdieren. Er zijn hoge verwachtingen voor het maken van weefsels uit iPSCs voor transplantatiedoeleinden. Hoewel voor deze toepassing in de behandeling van ziekten de eerste stappen zijn gezet, is hiervoor nog meer onderzoek nodig. Denk bijvoorbeeld aan de

veiligheid van het transplanteren van deze weefsels en het aantal cellen dat je hiervoor nodig hebt.

Kloppende hartspiercellen in het laboratorium

Om de stamcellen te laten differentiëren is het belangrijk de factoren in de voeding (medium) voor de cellen weg te halen die de stamcellen pluripotent houden en factoren toe te voegen die ervoor zorgen dat de cellen gaan differentiëren. Voor ieder celtype van het menselijk lichaam moeten de stamcellen in een andere richting worden gestuurd en is een andere cocktail aan groeifactoren vereist: voor het verkrijgen van hartspiercellen zijn andere factoren nodig dan voor het genereren van zenuwcellen. In het laboratorium bootsen we signalen na die tijdens de vroege embryonale ontwikkeling belangrijk zijn. Hierbij is timing en concentratie van de speciale groeifactoren essentieel. In dit proefschrift richt ik me op het differentiëren van pluripotente stamcellen naar hartspiercellen. Bijzonder is dat na 7 dagen de eerste hartspiercellen beginnen te kloppen en dat dit zich in de daarop volgende dagen steeds meer uitbreidt. We gebruiken deze cellen voor het bestuderen van hartontwikkeling en het ontstaan van hartziekten, het ontwikkelen van medicijnen of het testen van toxiciteit.

De functie van het hart

Het hart is het eerste orgaan dat tijdens de ontwikkeling van een baby ontstaat en gaat functioneren. De belangrijkste taak van het hart is het rondpompen van bloed door het lichaam zodat alle organen van zuurstof en voedingsstoffen worden voorzien. Bij een volledig ontwikkeld hart stroomt het bloed door de longen en nemen de bloedcellen zuurstof op. De linker kamer (ventrikel) van het hart trekt samen en pompt dit bloed door het hele lichaam. Daarna komt het zuurstofarme bloed weer terug naar het hart en komt het via de rechter boezem (atrium) terecht in het rechter ventrikel dat het bloed naar de longen pompt. Daar worden de bloedcellen weer van zuurstof voorzien, om vervolgens via het linker atrium en het linker ventrikel weer naar de organen in het lichaam te worden gepompt. Per minuut (ongeveer 60 tot 70 slagen) is dit wel 4 tot 5 liter bloed. De hartslag ontstaat door een ingewikkelde reeks van het prikkelgeleidingssysteem dat ervoor zorgt dat de hartspier gecoördineerd samentrekt. De cellen van het geleidingssysteem dragen de elektrische prikkels aan elkaar over. Wanneer er een probleem in het geleidingssysteem ontstaat, ontwikkelt een hartritmestoornis waardoor het hart te snel, te langzaam of onregelmatig klopt. Behalve hartritmestoornissen zijn er veel andere soorten hart- en vaatziekten. Deze kunnen erfelijk zijn, zoals genetische mutaties die een hartziekte veroorzaken, of later ontstaan.

Dit proefschrift

Om hartziekten en hartontwikkeling in het laboratorium te onderzoeken bieden pluripotente stamcellen een unieke oplossing. Dit proefschrift beschrijft enkele toepassingen: het bestuderen van een hartritmestoornis, het ontwikkelen van een methode om hartspiercellen te verkrijgen uit pluripotente stamcellen en het bestuderen of hartspiercellen uit ESCs en iPSCs dezelfde eigenschappen hebben.

Hoofdstuk 1 introduceert het onderzoeksgebied van de pluripotente stamcellen vanuit een historisch perspectief: de eerste isolatie van ESCs en hoe deze cellen pluripotent blijven tijdens de celweek in het laboratorium. De ontwikkeling van de iPSCs in 2007 veranderde het onderzoek met stamcellen. Niet alleen omdat embryo's niet meer nodig zijn voor onderzoek met stamcellen, maar ook omdat vanaf dat moment pluripotente stamcellen konden worden gemaakt van individuen met genetische ziekten, waarna deze cellen konden worden gebruikt als ziektemodel. Zowel ESCs als iPSCs kunnen differentiëren tot cellen van de drie kiemlagen van de ontwikkelende foetus, zoals cellen van het hart- en vaatstelsel. Dit hoofdstuk beschrijft enkele differentiatie-protocollen voor het maken van hartspiercellen en hoe deze de vroege embryonale hartontwikkeling nabootsen. Naast het gebruik van deze cellen voor het ontwikkelen van ziektemodellen, kunnen zij ook ingezet worden bij het ontwikkelen en het testen van medicijnen, bij het bestuderen van toxiciteit en mogelijk in de toekomst bij regeneratieve geneeskunde.

Hoofdstuk 2 gaat hierop verder en evalueert de mogelijke toepassingen van hartspiercellen uit pluripotente stamcellen in het kader van het bestuderen van hartziekten. Het verkrijgen van iPSCs van zowel gezonde individuen als patiënten biedt de unieke mogelijkheid om menselijke hartspiercellen te genereren en de kenmerken van deze gezonde en zieke cellen in het laboratorium te onderzoeken. We geven voorbeelden van enkele hartziekten, zoals ziekten van ionkanalen (channelopathie) en hartspierziekten (cardiomyopathie) en de mogelijkheden van pluripotente stamcellen om deze ziekten te bestuderen. Daarnaast beschrijven we het gebruik van pluripotente stamcellen in de ontdekking en ontwikkeling van medicijnen voor het hart en de uitdagingen voor toekomstig onderzoek.

Om de mogelijkheden voor het bestuderen van erfelijke hartziekten met behulp van pluripotente stamcellen te onderzoeken, vergeleken we de eigenschappen van hartspiercellen uit ESCs en iPSCs met oorspronkelijke cellen uit het hart. **Hoofdstuk 3** beschrijft het onderzoek naar een complex syndroom dat wordt veroorzaakt door een mutatie in het gen *SCN5A* dat de informatie bevat voor een eiwit in het celmembraan. Dit eiwit is een natriumionkanaal dat een belangrijke rol speelt bij de overdracht van de elektrische prikkels van de hartspiercellen. Zo'n kleine verandering in het DNA kan in dit specifieke geval zowel in-activatie als activatie van

het gen veroorzaken. Patiënten met deze mutatie kunnen hartritmestoornissen ontwikkelen en kunnen symptomen hebben van het lange QT-syndroom en het Brugada-syndroom. In een eerdere studie is een diermodel met deze mutatie in het *SCN5A*-gen ontwikkeld, waarvoor deze mutatie is aangebracht in ESCs van muizen. Deze muizen vertonen dezelfde symptomen als patiënten met deze mutatie. In onze studie hebben we iPSCs gemaakt van volwassen cellen van een muis met deze *SCN5A*-mutatie. Dit gaf ons de mogelijkheid de mutatie te bestuderen in zieke en gezonde hartspiercellen, gedifferentieerd uit ESCs en iPSCs en deze vervolgens te vergelijken met volwassen (primaire) hartspiercellen van de muis. Wij laten zien dat gezonde en gemuteerde hartspiercellen van iPSCs en ESCs dezelfde veranderde elektrofysiologische eigenschappen hebben als de primaire hartspiercellen van de muis. Vervolgens hebben we iPSCs gemaakt van een patiënt met de mutatie in het gen *SCN5A*. De hartspiercellen gedifferentieerd uit deze cellen lieten dezelfde veranderingen zien in de biofysische eigenschappen als de hartspiercellen afgeleid van pluripotente stamcellen van de muis. Ook toonden we aan dat de hartspiercellen van ESCs en iPSCs de kenmerken van deze ziekte kunnen laten zien, ondanks het feit dat deze hartspiercellen elektrofysiologisch geen volwassen hartspiercellen waren.

Het vervolgonderzoek richtte zich op het verfijnen van de technieken om menselijke (humane; h) pluripotente stamcellen te specialiseren naar hartspiercellen. **Hoofdstuk 4** bevat een gedetailleerde beschrijving van een protocol voor een monolaag differentiatie procedure waarmee we meer dan 50 % hartspiercellen in onze kweek konden verkrijgen. Voor het onderzoek met hartspiercellen is het belangrijk dat elke differentiatie reproduceerbaar is en dat je elke keer ongeveer evenveel hartspiercellen kunt maken (effectiviteit). We gebruikten daarom een medium waarvan de samenstelling bekend is (gedefinieerd medium) voor het pluripotent houden van verschillende pluripotente stamcel lijnen. Het protocol dat we beschrijven was het enige protocol dat zowel de groei als de differentiatie van verschillende hESC en hiPSC lijnen in identieke condities ondersteunde. Verder omschrijven we protocollen om de effectiviteit van de differentiatie te bepalen en te evalueren.

Deze protocollen werden toegepast in de studie van **hoofdstuk 5** voor het vergelijken van hartspiercellen afgeleid van humane ESCs en iPSCs op verschillende tijdstippen tijdens de differentiatie. De fluorescerende marker GFP (Green Fluorescent Protein) werd ingebouwd in het gen *NKX2-5* in hiPSCs. Het gen *NKX2-5* komt tot expressie wanneer pluripotente stamcellen differentiëren naar hartspiercellen. Omdat één allel van het *NKX2-5* gen is vervangen door de fluorescente marker GFP, krijgen de cellen een groene kleur wanneer ze hartspiercellen zijn geworden. Deze 'reporter' cellijn heeft dezelfde GFP-marker als een hESC reporter cellijn die eerder in het laboratorium is ontwikkeld. Dit maakt een goede vergelijking mogelijk tussen de hartspiercellen van deze hESCs en hiPSCs. De fluorescerende kleur gaf

ons de kans deze hartspiercellen en hun voorlopers te isoleren op verschillende tijdstippen tijdens de differentiatie door alleen de fluorescente cellen te selecteren. Daarna konden we bepalen of beide humane pluripotente stamcellijnen op elkaar leken, omdat beide lijnen zijn gekweekt en gedifferentieerd onder gelijke gedefinieerde omstandigheden. Wij ontdekten dat vergelijkbare hartcel-populaties konden worden geïsoleerd uit zowel hiPSC als hESC lijnen. De profielen van de genen die tot expressie (genexpressie profielen) komen tijdens de differentiatie lieten zien dat de hartspiercellen van hiPSCs bijna hetzelfde zijn als die van hESCs. Naar aanleiding hiervan konden we concluderen dat hiPSCs een bruikbare vervanging kunnen zijn voor hartspiercellen van hESCs om vroege hartontwikkeling te bestuderen.

Dezelfde hartspiercellen van hESC en hiPSC lijnen werden ook vergeleken met een unieke set van foetaal hartweefsel. In **hoofdstuk 6** bestuderen we welke genen tot expressie komen op verschillende tijdstippen van het eerste en tweede trimester van de ontwikkeling. We vergeleken de genexpressie profielen van gepaarde atria en ventrikels met elkaar en met hartspiercellen van hESCs en hiPSCs. We ontdekten dat de hartspiercellen voortgekomen uit pluripotente stamcellen het meest leken op het hartweefsel van het eerste trimester (vroege embryonale ontwikkeling), maar dat zij meer rijpen en meer gerelateerd zijn aan het hartweefsel van het tweede trimester (latere ontwikkeling) als de hartspiercellen worden gekweekt in medium met schildklierhormoon.

Tot slot worden in **hoofdstuk 7** de resultaten van de studies samengevat en worden mogelijkheden voor toekomstig onderzoek gegeven. De kennis van stamcellen en de ontwikkeling van het hart stelt ons in staat deze cellen te gebruiken voor fundamenteel onderzoek om vervolgens de vertaalslag te maken van deze wetenschappelijke ontdekkingen naar toepassingen voor de patiënt. Dat is een van de grote beloftes van pluripotente stamcellen voor de toekomst!