



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Posterior heart field and epicardium in cardiac development : PDGFR α and EMT

Bax, N.A.M.

Citation

Bax, N. A. M. (2011, January 13). *Posterior heart field and epicardium in cardiac development : PDGFR α and EMT*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16330>

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/1887/16330>

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

SAMENVATTING

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op de rol van platelet-derived growth factor receptor alfa (*Pdgfrα*)-signalering in de ontwikkeling van het cardiovasculaire systeem. Ook is gekeken naar het proces van epitheel-naar-mesenchym transformatie (EMT) in epicard-afgeleide cellen (EPDCs) en is de rol van EPDCs op de differentiatie van hartspiercellen (cardiomyocyten) bestudeerd.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie op de hartontwikkeling, die start in de cardiogene platen ook wel het primaire of eerste hartveld (*primary or first heart field*) genoemd. De primitieve hartbuis wordt gevormd door voorlopercellen uit het *first heart field*. Voor de verdere ontwikkeling van de primitieve hartbuis tot een gespecialiseerd orgaan met twee boezems en twee kamers, door tussenschotten (septa) gescheiden, is toevoeging van cellen uit het secundaire hartveld (*second heart field*) noodzakelijk. Daarnaast, bespreken we de toevoeging van voorlopercellen uit het *posterior heart field (PHF)* aan de veneuze pool van het hart, waar deze cellen bijdragen aan de myocardiale en mesenchym populatie van het hart. Alle beschreven processen van de hartontwikkeling worden gerelateerd aan *Pdgfrα* en EMT.

Hoofdstuk 2 beschrijft de expressiepatronen van PDGF-A, -C en PDGFR- α tijdens de hartontwikkeling van de kip. De waargenomen expressiepatronen zijn gerelateerd aan de ontwikkeling van myocard aan de arteriële pool en veneuze pool van het hart. Naast het myocard wordt expressie ook waargenomen in het ontwikkelende proepicard en epicard. Verstoring van de *Pdgfrα*-signalering met behulp van farmaca en remming van de uitgroei van het proepicard orgaan (PEO) door middel van een eischaafliesje leiden beiden tot afwezigheid van het subepicard dat normaliter het myocard omgeeft. Remming van de uitgroei van epicard en verminderde migratie van EPDCs in het myocard leidt ook tot verstoring van de expressie van PDGF-liganden en de receptor in het myocard. Deze data ondersteunen een functionele rol voor *Pdgfrα*-signalering in de ontwikkeling van proepicard en zijn derivaten en in de remodellering van cardiaal weefsel tijdens de hartontwikkeling.

In *hoofdstuk 3* is de rol van PDGFR- α in hartontwikkeling onderzocht met behulp van embryo's van de *Pdgfrα* knockout and *PDGFRα^{GFP}* knockin muizen. De expressie van GFP (groen fluorescerend eiwit) bevestigt de aanwezigheid van PDGFR- α in zowel het myocard als het mesenchym aan de veneuze pool van het hart. Deze beide populaties hebben zich ontwikkeld uit het PHF. De *dorsal mesenchymal protrusion (DMP)* en het epicard zijn beiden afkomstig van de mesenchym populatie. Het epicard geeft ons de

mogelijkheid om epicard-myocard interactie in het ontwikkelende hartspierweefsel te onderzoeken. Verschillende hartafwijkingen, zoals hypoplasie van het atrium en sinus venosus myocard en de daarbij behorende veneuze kleppen en sinusknop (SAN), worden waargenomen in *Pdgfra* deficiënte muizen. De hypoplasie van de sinusknop gaat samen met een verhoogde expressie van het gen *Nkx2.5*. De hypoplasie van de PEO en de *DMP*, waargenomen in de *Pdgfra* gemuteerde muizen, wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door verminderde aanbouw van mesenchym uit het *PHF*. In *Pdgfra*^{-/-} embryo's wordt een dissociatie van het epicard ook wel blebbing genoemd. Een verstoorde Integrine/VCAM interactie is de onderliggende oorzaak van de blebbing, terwijl verstoorde EMT en verminderde migratie van EPDCs wordt veroorzaakt door verhoogde expressie van Wilms tumor 1 (WT1). Alle data samen laten zien dat *Pdgfra* een functionele rol heeft in de regulatie van myocard differentiatie en remodelling. De data geeft ook nieuw inzicht in een mogelijke rol voor *Pdgfra* in een gen regulatienetwerk waarbij de expressie van *Nkx2.5* en WT1 kan worden onderdrukt ter ondersteuning van de ontwikkeling van de *PHF* afkomstige cardiale structuren.

In *hoofdstuk 4*, hebben we gebruik gemaakt van menselijk materiaal en diermodellen om een mechanisme op te helderen dat verantwoordelijk is voor het ontstaan van abnormale drainage van de long- of pulmonaal venen (TAPVR). Genetische analyse van TAPVR-patiënten maakt aannemelijk dat het PDGFR α gen betrokken is bij het ontstaan van TAPVR. Genexpressie studies in muizen en kippen embryo's laten expressie patronen zien voor zowel de *Pdgfra* receptor en zijn PDGF-liganden die overeenkomen met een rol in de ontwikkeling van de pulmonaal venen. Functionele knockdown van de PDGF-signalering in zowel kippen en muizen in de periode van pulmonaal venen vorming leiden tot verschillende abnormaliteiten aan de instroom van het hart, waaronder TAPVR. De rol van de *DMP* in de ontwikkeling van TAPVR ondersteunt een functie voor PDGF-signalering in *PHF* ontwikkeling. De lage incidentie van voorkomen van deze abnormaliteiten aan de instroom van het hart (~7% voor TAPVR en ~30% voor gerelateerde afwijkingen) suggereert naast de rol van PDGF ook de interactie met andere genetische en omgevingsfactoren. Deze studie laat ook zien dat de TAPVR gevonden in de kip en de muis zeer vergelijkbaar is met de TAPVR, die gezien wordt in een afwijkend menselijk embryo uit de humane-embryo-collectie uit Kyoto, Japan. Samen ondersteunen de data van de humane genetica en de diermodellen een rol voor PDGF-signalering in de normale ontwikkeling van de pulmonaal venen en geeft tevens ook inzicht aan het ontstaan van TAPVR.

Hoofdstuk 5 beschrijft de interactie van hartspiercellen (cardiomyocyten) en EPDCs bij de ontwikkeling van de wand van het hart. Tijdens de hartontwikkeling is de bijdrage van

EPDCs onmisbaar bij de vorming van de compacte zone van het ventrikel myocard. In deze studie maken we gebruik van cocultures bestaande uit embryonale kwartel EPDCs en neonatale muizen cardiomyocyten om *in vitro* te onderzoeken hoe EPDCs de proliferatie, cellulaire organisatie en contractie van cardiomyocyten beïnvloeden. Expressie studies laten zien dat elektrische en mechanische cel-cel contacten, zogenaamde “gap-junctions”, (connexine 43, N-cadherine en focal adhesie kinase), sarcomeer eiwitten (Troponine-I, α -actinine) en extracellulaire matrix (collageen I en periostin) verhoogd zijn in de EPDCs-cardiomyocyten cocultures. Een verbeterde cellulaire organisatie, in combinatie met verhoogde expressie van Ca^{2+} -ATPase in het sarcoplasmatisch reticulum (SERCA2a) resulteerde in verbeterde contractie. Ook werd er in drie onafhankelijke diermodellen met EPDC-depletie aangetoond dat de expressie van elektrische en mechanische junctions afneemt in de afwezigheid van EPDCs. We kunnen uit de data concluderen dat EPDCs aanwijzingen generen voor cardiomyocyten waardoor deze cellen kunnen prolifereren en zich kunnen ontwikkelen tot een georiënteerd, elektrisch en mechanisch geleidend myocard. Deze data geven nieuwe inzichten in een mogelijke rol voor EPDCs in celtherapieën, omdat de aanwezigheid van EPDCs de voorwaarde is voor correcte integratie van cardiomyocyten in een synchron samentrekkende hartspier.

Hoofdstuk 6 geeft nieuwe inzichten in EMT van humane volwassen epicard cellen. Volwassen epicard is sluimerend en kan opnieuw worden geactiveerd na beschadiging van het myocard. De cellen van het opnieuw geactiveerde epicard ondergaan EMT en migreren naar het beschadigde myocard waar ze bijdragen aan het herstel. Het vergaren van meer inzicht in de factoren die betrokken zijn bij EMT van het volwassen epicard is van belang voor het regeneratieve vermogen van deze cellen. Het proces van EMT is bestudeerd in een *in vitro* model van volwassen humane epicard cellen. Volwassen epicard cellen werden gestimuleerd met *transforming growth factor beta* (*TGF β*), wat resulteerde in het verlies van het epitheliale karakter van deze cellen. We tonen ook aan dat het proces van EMT het begin is van de mesenchymale differentiatie. Verlies van het epitheliale karakter van volwassen humane epicard cellen werd bevestigd met behulp van immunofluorescente kleuringen en analyse van epitheliale en EMT makers met behulp van Western blot en qPCR. *TGF β* -geïnduceerde EMT is afhankelijk van ALK5 kinase activiteit maar waarschijnlijk onafhankelijk van endoglin. Een interessante observatie is dat VCAM-1 in staat is om *TGF β* -gestimuleerde EMT te remmen. Bovendien, knockdown van de epicardiale marker WT1 reguleert EMT via *Pdgfra*. Al deze data gecombineerd levert meer inzicht in de rol van het *TGF β* /ALK5 netwerk in de initiatie van EMT mogelijk via transcriptionele regulatie van WT1 en *Pdgfra* in humaan volwassen epicard. Deze nieuwe inzichten komen ten goede aan endogeen gereguleerde celtherapieën bij reparatie van het hart.

Hoofdstuk 7, hierin bestuderen we de elektrofysiologische eigenschappen van epicard cellen en daarnaast of EMT de elektrische geleidbaarheid van de epicard cellen beïnvloed. Humane volwassen EPDCs cellen ondergaan *in vitro* spontaan EMT en hun morfologie veranderd in dit proces van epitheel-achtig of *cobblestone-like (c)* naar mesenchymaal-achtig of *spindle-shaped (s)*. Deze verandering in morfologie gaat gepaard met het verlies van β -catenine aan het celoppervlak en een toename in expressie van de myofibroblast marker vimentine. Daarnaast is de expressie van zowel gap junctions (connexine 40, Cx43 en Cx45) als ionkanalen (SCN5a, CACNA1C en Kir2.1) verlaagd na EMT. Met behulp van een micro-electrode array is de elektrische geleiding van epicard cellen voor een na EMT onderzocht. Hiervoor werden humane volwassen epicard cellen gezaaid in een kanaal tussen twee velden van neonatale rat cardiomyocyten. De waargenomen elektrische geleiding werd beïnvloed door EMT. Toediening van cEPDCs resulteerde in elektrische koppeling van de twee CMC velden binnen 24 uur, terwijl toediening van sEPDCs resulteerde in een significante afname van geleiding met als gevolg dat deze cellen functioneerden als cellulair conductieblok. Uit deze studie werd geconcludeerd dat elektrische geleiding door EPDCs wordt beïnvloed door EMT. Na het ondergaan van EMT, bleken zowel de expressie van gap junctions als ionkanalen te zijn verminderd. Deze studie kan mogelijk nieuwe inzichten bieden in het belang van EPDCs bij de ontwikkeling van het hart en in EMT-gerelateerde cardiale dysfunctie.

In *hoofdstuk 8* bediscussiëren we de data die in dit proefschrift beschreven zijn. De rol van *Pdgfra* in hartontwikkeling aan de veneuze pool wordt besproken in het licht van de ontwikkeling van humane pathologieën. Ook wordt the rol van *Pdgfra* in EMT van EPDCs geëvalueerd. Met betrekking tot hartreparatie na een infarct door middel van therapieën gebaseerd op endogene cellen, worden de mogelijkheid voor het activeren van EMT transformatie van het volwassen epicard besproken.