

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30224> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Neshati, Zeinab

Title: Cellular models and viral vectors for skeletal and cardiac muscle research

Issue Date: 2014-12-23

Samenvatting

De algemene introductie van dit proefschrift, **hoofdstuk I**, begint met een korte vergelijking van de pathologische kenmerken van skeletspier- en hartspierziekten. Voorts wordt het gebrek aan (effectieve) therapieën voor veel hartspier- en skeletspierziekten bediscussieerd. Deze schaarste aan adequate behandelingsmogelijkheden voor (cardio)myopathiën kan deels worden verklaard door de geringe kennis van de precieze mechanismen die aan skeletspier- en hartspierziekten ten grondslag liggen en, hieraan gerelateerd, door de niet-specifieke werking van veel therapeutische interventies. Het hoofddoel van dit proefschrift was daarom het opzetten van cellulaire modellen en toepassing van virale vectortechnologie ter identificatie van potentiële aangrijpingspunten voor toekomstige behandelmethoden voor skeletspier- en hartspierziekten.

In **hoofdstuk II** wordt de ontwikkeling van een tweedelige lentivirus vector (LV)-gebaseerde analysemethode beschreven voor het kwantificeren van cel fusie waarin de cel fusie-componenten zijn getransduceerd met een *Gaussia princeps luciferase* (*GpLuc*) expressie eenheid (ontvangende cellen) of met een recombinant gen dat codeert voor FLPe, een kerngerichte en moleculair geëvolueerde versie van flippase (donorcellen). *GpLuc* is een secretoir eiwit, waardoor het mogelijk is om herhaalde analyses te verrichten van hetzelfde studieobject, een groot voordeel ten opzichte van cel fusie analyses die gebruik maken van *Photinus pyralis luciferase* (*PpLuc*), wat niet een secretoir eiwit is en daardoor achtereenvolgende analyses van hetzelfde studieobject uitsluit. Om te onderzoeken of de spreiding van FLPe^{NLS+} in gedifferentieerde skeletspiercellen wordt beperkt door het kernlokalisatiesignaal (NLS), werden gedifferentieerde skeletspiercellen getransduceerd met LVs die coderen voor FLPe^{NLS+} of een FLPe versie zonder NLS (FLPe^{NLS-}) en vervolgens in verschillende ratio's in co-cultuur gebracht met myoblasten met een door FLPe activeerbare *GpLuc* expressie cassette. Op verschillende tijdstippen na inductie van fusie tussen cellen werd de *GpLuc* activiteit in het kweekmedium bepaald. In het algemeen nam de *GpLuc* expressie toe met toenemende fracties of *GpLuc*-getransduceerde myoblasten, en zowel FLPe^{NLS+} als FLPe^{NLS-} was in staat om het latente *GpLuc* gen te activeren. Echter, wanneer het percentage myoblasten dat FLPe tot expressie bracht beperkend was, gaf FLPe^{NLS+} over het algemeen iets hogere signalen dan FLPe^{NLS-}; maar bij lage ontvanger:donor celratio's was FLPe^{NLS-}

meestal superieur. Er werd daarmee aangetoond dat het NLS niet beperkend was ten aanzien van het vermogen van FLPe^{NLS+} om zich door gedifferentieerde skeletspiercellen te verspreiden of voor het induceren van reportergenexpressie. Bij een hoge fractie FLPe-expresserende myoblasten heeft de aanwezigheid van het NLS echter een negatief effect reportergenexpressie. Deze resultaten tonen aan dat het is gelukt om een snelle en simpele analysemethode op basis van GpLuc te ontwikkelen voor de kwantificatie van de progressie van fusie tussen cellen door middel van chemiluminescentie.

In **hoofdstuk III** worden verschillende eigenschappen van Gelatine/Siloxane/Hydroxyapatiet (GS-Hyd) matrices onderzocht zoals *in vivo* biologische afbreekbaarheid, cytotoxische effecten en het vermogen celadhesie te ondersteunen. Mesenchymale stamcellen (MSCs) werden behandeld met verschillende volumes matrixsuspensie voor de evaluatie van de cytotoxische effecten. MSCs werden tevens gedurende 2 weken op de matrix gekweekt ter evaluatie van het vermogen van de matrix om celadhesie en celgroei te bevorderen. De GS-Hyd matrix had geen merkbaar cytotoxisch effect op de MSCs en deze cellen waren in staat om zich te hechten aan de matrix, hun uitlopers uit te breiden en kolonies te vormen. Om de biologische afbreekbaarheid te bestuderen, werden GS-Hyd matrices geïmplantéerd in dijbeenspier, testikel en lever van Wistar ratten. Op verschillende tijdstippen na implantatie werd matrices uitgenomen en werd hun drooggewicht bepaald. De grootste reductie in matrix gewicht vond plaats gedurende de eerste dagen na implantatie en varieerde van 53% in de lever tot 71% in dijbeenspier op dag 3 na implantatie. Vervolgens vertraagde de matrixdegradatie waardoor er 3 weken na implantatie nog 30%, 25% en 18% van de uitgangsmatrix in respectievelijk lever, testis en dijbeenspier resteerde. Scanning elektronmicroscopie liet duidelijke morfologische veranderingen aan het oppervlak van de matrix en in de poriediameter zien 21 dagen na implantatie. Concluderend lijkt de GS-Hyd matrix een veelbelovend hulpmiddel voor celtherapie, maar additioneel onderzoek is nodig om de klinische toepasbaarheid vast te stellen.

Hoofdstuk IV is gewijd aan de ontwikkeling van een *in vitro* model voor het onderzoeken van de specifieke bijdrage van pathologische cardiale hypertrofie (PCH) aan ritmestoornissen, onafhankelijk van fibrose of andere PCH-gerelateerde processen. Behandeling van monolagen van ventriculaire cardiomyocyten geïsoleerd uit neonatale ratten (nr-vCMC) met phorbol 12-myristate 13-acetate

(PMA) gedurende 2 ker 24 uur, leidde tot toenames in celoppervlakte en eiwitinhoud van de cardiomyocyten. Bepaling van de electrofysiologische eigenschappen van PMA-behandelde en controle nr-vCMC monolagen middels optisch mappen op kweekdag 9, lieten een afname van de geleidingssnelheid (CV) en toenames van de actiepotentiaalduur (APD) en APD dispersie zien na PMA behandeling. Verder veroorzaakte de PMA behandeling een 32% afname van het sarcoplasmatisch/endoplasmatisch reticulum Ca^{2+} ATPase 2 gehalte en een toename van de natriuretisch peptide A (42%) en $\alpha 1$ -skeletspier actine (34%) gehaltes, wat aantoonde dat de door PMA-geïnduceerde hypertrofe respons een pathologisch karakter had. Na lokale 1-Hz stimulatie, vertoonden 54% van de PMA-behandelde cultures focale tachyarritmieën op basis van getriggerde activiteit, terwijl de controle nr-vCMCs slechts in 4% van de gevallen tachyarritmieën lieten zien. PMA-behandelde nr-vCMC kweken kunnen derhalve een goed controleerbaar *in vitro* model zijn voor het testen van nieuwe therapeutische interventies voor het bestuderen van specifieke aspecten van hypertrofie-geassocieerde aritmieën.

In **hoofdstuk V** wordt de ontwikkeling van *in vitro* modellen van compacte en fragmentarische fibrose als gevolg van een myocardiaal infarct (MI) beschreven, alsmede de bepaling van hun pro-aritmische eigenschappen door middel van optisch mappen. Hiertoe werd een enkel groot circulair anatomisch obstakel, dan wel meerdere kleinere circulaire anatomische obstakels gecreëerd in het midden van confluent nr-vCMC monolagen door middel van krachtige druk op de cellen met op maat gemaakte plexiglas stempels. Voor het verkrijgen van mechanistisch inzicht in aritmieën die geassocieerd zijn met post-MI littekens werden verschillende parameters vergeleken bij de twee types van anatomische obstakels, zoals de mate van induceerbaarheid, cycluslengte en handhaving van “reentry”. In kweken met fragmentarische fibrose was “reentry” iets minder gemakkelijk induceerbaar (41% vs. 52%) en, als het optrad had het een kortere cycluslengte (234 ± 52 vs. 288 ± 38 ms) dan in cultures met compacte fibrose.

Aanhoudende “reentry” werd minder vaak geobserveerd in fragmentarische culturen (40% vs. 88% in compacte culturen), terwijl het percentage complexe aritmieën hoger was (31% vs. 11%). Meanderende fasesingulariteiten en exciteerbaarheidsgradiënten tijdens aritmieën op basis van “reentry” waren alleen detecteerbaar in fragmentarische culturen. “Reentry” kon gemakkelijker getermineerd worden in compacte cultures (82% vs. 20% in fragmentarische

culturen). Samenvattend konden met de *in vitro* modellen van fragmentarische en compacte obstakels soortgelijke aritmische eigenschappen worden nagebootst als worden gevonden na respectievelijk vroege- en niet-gereperfundeerde MIs. Deze modellen kunnen daarom leiden tot mechanistisch inzicht in de werkzaamheid van anti-aritmische interventies in geïnfarceerde harten met verschillen anatomische substraten.

In **hoofdstuk VI** worden de effecten op atriumfibrilleren onderzocht van constitutief-actieve acetylcholine-gereguleerde K^+ stroom ($I_{K,Ach-c}$), die via Kir3.1 en Kir3.4 kanalen loopt. Culturen van atriale CMCs geïsoleerd uit neonatale ratten en intacte atria werden met hoge frequentie gestimuleerd voor inductie van “reentry”. Behandeling met tertiapin verlengde de APD in atriale culturen tijdens “reentry”, wat duidde op de aanwezigheid van $I_{K,Ach-c}$. Voorts verlaagde tertiapin de frequentie en complexiteit van rotors. Een afname van Kir3.1 of 3.4 expressie door middel van transductie van de cellen met LVs die codeerden voor Kcnj3- of Kcnj5-specifieke shRNAs gaf vergelijkbare resultaten. Tertiapin voorkwam of termineerde “reentry” door verlenging van de APD en door veranderingen van de APD en CV restitutie curves, waardoor de kans op APD alternans verminderde en de kans op rotordestabilisatie toenam. Mapping experimenten van hele harten bevestigden deze bevindingen (b.v. >50% reductie in induceerbaarheid van atriumfibrillatie na $I_{K,Ach-c}$ blokkade). Deze studie heeft nieuwe moleculaire en mechanistische inzichten in atriale tachyarritmieën opgeleverd en heeft geleid tot de identificatie van Kir3.1 en Kir3.4 als veelbelovende atrium-specifieke doelwitten voor anti-aritmische strategieën.

Concluderend benadrukken de experimenten zoals beschreven in dit proefschrift het belang van cellulaire modellen voor (i) het ophelderen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan skelet- en hartspierziekten en (ii) het identificeren van nieuwe therapeutische doelwitten. Dit proefschrift onderstreept ook de bruikbaarheid van op virale vectoren gebaseerde genoverdrachttechnologieën voor de ontwikkeling van biologische analysemethoden en de evaluatie van therapeutische doelwitten.

Toekomstperspectieven

Zonder een grondig begrip van de onderliggende mechanismen van hart- en skeletspierziekten, gaan hun behandeling met farmacologische of genetische interventies gepaard met veel praktijkfouten. Cellulaire modellen zijn belangrijke

hulpmiddelen voor het verkrijgen van mechanistische inzichten in skeletspierdegeneratie en cardiale ritmestoornismechanismen als voorwaarde voor het rationele ontwerp van nieuwe behandelingmethoden. Dit is tenminste deels gerelateerd aan hun relatieve eenvoud, wat de mogelijkheid biedt om een specifieke pathologische eigenschap te onderzoeken, onafhankelijk van andere complicaties. Ondanks deze en andere voordelen van *in vitro* cellulaire modellen bootsen zij de *in vivo* situatie vaak onvoldoende na, wat kan leiden tot slechte *in vitro-in vivo* correlaties. Hierdoor dient toekomstig onderzoek zich te richten op de verdere verbetering van deze cellulaire modellen zodat zij een betere weergave vormen van de pathologische status *in vivo*, waardoor de noodzaak voor preklinische en klinische studies kan worden verminderd. Bijvoorbeeld, in het geval van *in vitro* modellen van cardiale hypertrofie is het essentieel om te bepalen welk stadium tijdens de transitie van PCH tot hartfalen door het hypertrofie model wordt weergegeven, aangezien dit de therapeutische aanpak kan beïnvloeden. Naast het bepalen van de mate van electrofysiologische veranderingen en de incidentie en het karakter van aritmieën, kunnen de bepaling van het contractievermogen en transcriptoomanalyses een waardevolle bijdrage leveren.

Een belangrijke hindernis die genomen moet worden voor de verdere ontwikkeling van *in vitro* cellulaire modellen is het overkomen van de lage expansiecapaciteit van gedifferentieerde cellen. Postnatale CMCs vertonen bijvoorbeeld een zeer beperkte proliferatiecapaciteit, wat herhaaldelijke isolatie en kweek van deze cellen noodzakelijk maakt voor *in vitro* studies. Immortalisatie van atriale of ventriculaire CMCs van dierlijk of menselijk weefsel zou dit probleem kunnen omzeilen. Dit kan worden bewerkstelligd door middel van virale overdracht van genen coderend voor eiwitten zoals simian virus 40 large T antigen, B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BM11) of telomerase (TERT) reverse transcriptase.

Genetische manipulaties middels virale vectoren (b.v. overexpressie van bepaalde genen of RNA interferentie) kunnen voorts leiden tot betere mechanistische inzichten in skelet- en hartspierziekten en tot verdere optimalisatie van huidige therapieën voor deze aandoeningen.

Met betrekking tot skeletspieratrofie kan optimalisatie van cellulaire therapieën bereikt worden door verbeterde fusie van donorcellen onderling en met spiercellen van de ontvanger en door verbetering van hun myogene differentiatie. Bijvoorbeeld, geforceerde expressie van fusie-bevorderende eiwitten door transductie van (niet-

myogene) stamcellen met virale vectoren coderend voor deze eiwitten kan bevorderlijk zijn, evenals de gereguleerde expressie van myogene transcriptiefactoren in deze cellen.

Genetische interventie kan ook worden ingezet voor de behandeling van hartritmestoornissen. Bijvoorbeeld, gedwongen expressie van connexines zoals connexine43 in (myo)fibroblasten in infarctlittekenweefsel kan geleiding bevorderen en de incidentie van aritmieën doen afnemen. Deze aanpak zou echter ook negatief kunnen uitpakken aangezien koppeling van CMCs met (myo)fibroblasten kan leiden tot depolarisatie van CMCs, waardoor het weefsel vatbaar wordt voor tachycardieën op basis van “reentry”. Dit probleem kan worden aangepakt door gelijktijdige uitrusting van (myo)fibroblasten met een gen zoals *KCNJ2*, waarvan het product is betrokken bij het instellen van het rustmembraanpotentiaal.

Genetische interventies (overexpressie of knockdown) die invloed uitoefenen op de expressie van genen die coderen voor ionkanalen die betrokken zijn bij de repolarisatiefase van het actiepotentiaal (AP), kunnen ook anti-aritmische effecten hebben. Bijvoorbeeld, manipulatie van de expressie van genen die coderen voor de ionkanalen die betrokken zijn bij de repolarisatie van de AP fases gedurende welke vroege na-depolarisaties optreden (b.v. adenosine trifosfaat (ATP)-gevoelige K^+ kanalen [K_{ATP} kanalen]) zou tot nieuwe inzichten kunnen leiden in pro- en anti-aritmische mechanismen, maar zou ook therapeutische waarde kunnen hebben. Effectieve therapeutische toepassing van virale vectoren *in vivo* vereist uniforme en bijna-kwantitatieve transductie van het doelweefsel en het juiste transgenexpressieniveau. Dit zijn belangrijk punten in de context van aritmiebehandeling, aangezien heterogene transductie of een inadequaat transgenexpressieniveau pro-aritmisch kan zijn.

Daarom zijn efficiënte toediening en een hoge doelcelspecificiteit van virale vectoren, alsmede de precieze beheersing van transgenexpressie van vitaal belang en verdienen verder onderzoek. Andere belangrijke onderwerpen van toekomstig gentherapeutisch onderzoek zijn de verdere verbetering van de veiligheid en de reductie van immunogeniciteit van virale vectoren.

