



Universiteit
Leiden
The Netherlands

From teeth, skin, blood to heart : induced pluripotent stem cells as an in vitro model for cardiac disease

Dambrot, C.S.

Citation

Dambrot, C. S. (2014, November 5). *From teeth, skin, blood to heart : induced pluripotent stem cells as an in vitro model for cardiac disease*. Uitgeverij BOXPress, __s-Hertogenbosch. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29595>

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/1887/29595>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

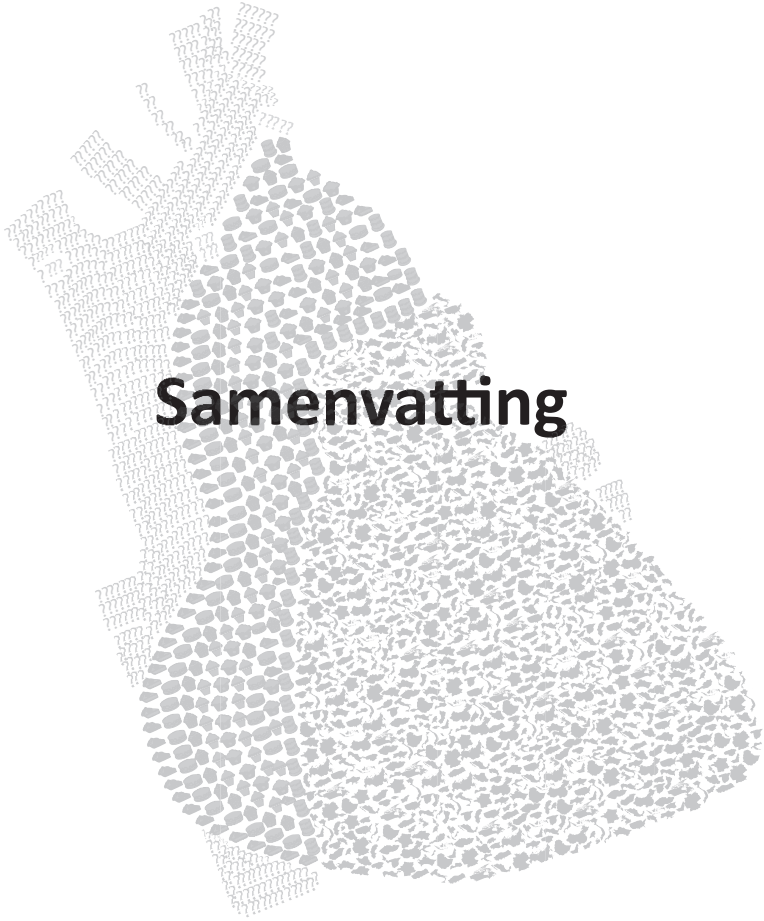


The handle <http://hdl.handle.net/1887/29595> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Dambrot, Cheryl S.

Title: From teeth, skin, blood to heart : induced pluripotent stem cells as an in vitro model for cardiac disease

Issue Date: 2014-11-05

An abstract graphic element in the background, tilted diagonally. It consists of several overlapping rectangular areas filled with different geometric patterns: a grid of small squares, a grid of small hexagons, and a grid of small circles. The colors are in shades of gray and white.

Samenvatting

Sinds de eerste studies naar humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSC) is het onderzoeksgebied van pluripotente stamcellen (PSC) met grote stappen vooruitgegaan, met name op het gebied van (hart)ziektmodellering. Dit komt deels doordat het vrij eenvoudig is om hartspiercellen te produceren uit humane (h)PSC en deels doordat er een aantal testen beschikbaar zijn die fenotypisch gedrag kunnen analyseren. In dit proefschrift worden verbeteringen in herprogrammeringstechnologie beschreven en besproken, evenals het gebruik van deze technologieën in hartontwikkeling en ziektemodellering. In **hoofdstuk 1 en 2** wordt de algemene achtergrond van PSC besproken. Hierbij wordt aandacht besteed aan embryonale stamcellen (ESC) en de ontdekking en ontwikkeling van geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) voornamelijk gericht op hun gebruik in het bestuderen van hartontwikkeling en ziektemodellering.

In **hoofdstuk 3** wordt verder ingegaan op enkele praktische aspecten met betrekking tot het verzamelen van weefsels van patiënten in de kliniek. Er wordt een vergelijking gemaakt tussen (i) huidbiopten die maximaal twee weken zijn opgeslagen in reguliere fysiologische zoutoplossing (ii) endotheelcellen geïsoleerd uit vers perifeer bloed (BOEC) en (iii) melktanden verkregen uit normaal verlopende tandwisseling om het vermogen te bepalen somatische celculturen te vormen die geschikt zijn voor het herprogrammeren naar hiPSC. Alle hiPSC-lijnen zijn verkregen volgens dezelfde herprogrammeringsmethode (een conditioneel (FLPe) polycistronisch lentivirus) en onder soortgelijke omstandigheden (dezelfde batch virus, foetaal kalfsserum en feeder-cellen). Huidfibroblasten konden, zelfs na langdurige opslag van het biopt, krachtig worden geherprogrammeerd. Het ontwikkelen van hiPSC uit kindertandmerg cellen leverde een vergelijkbaar hoogrendement op, maar dat van BOEC lag lager. Ten aanzien van de invasiviteit van de biopsies, de opslag van biopten en de efficiëntie van herprogrammering, blijken huidfibroblasten het meest geschikt voor het ontwikkelen van hiPSC. Waar niet-invasieve procedures vereist zijn, bijvoorbeeld bij kinderen, vormen tandmergcellen van melktanden een waardevol alternatief.

In **hoofdstuk 4** wordt een nuttige combinatie van procedures beschreven die de gelijktijdige screening van meerdere iPSC-klonen mogelijk maakt om hun genomische integriteit en hun cardiaal differentiatiepotentieel binnen twee weken na het verschijnen van de vermoedelijk geherprogrammeerde kolonies in de kweek te bepalen. Door het combineren van een splinkerette-PCR-methode met Ion Torrent sequencing, konden we het aantal vaststellen van en de provirale integratiegebieden van lentivirale geherprogrammeerde hiPSC in kaart brengen. Hierdoor werd de identificatie van klonen mogelijk gemaakt die single copy-integraties bevatten in genomische regio's zonder bekende genen of transcriptionele controle-elementen. Tegelijkertijd ontwikkelden we een effectief hartcel differentiatieprotocol dat binnen 10 dagen functionele hartspiercellen genereert waarbij geen lijnspecifieke optimalisatie nodig was voor de 6 geteste, onafhankelijke humane pluripotente stamcellijnen. Om de mogelijkheden voor het opschalen van deze procedures aan te tonen, hebben we tot slot 20 beginnende iPSC-klonen geselecteerd en daarop deze onafhankelijke testen gelijktijdig uitgevoerd. Voordat het doorzetten van de klonen nodig was, waren we in staat om klonen met een single integrated copy van de herprogrammeringsvector en een breed cardiaal differentiatiepotentieel te identificeren voor verdere analyse.

In **hoofdstuk 5** wordt een andere differentiatiemethode voor hartcellen beschreven. Als eerste wordt ingegaan op de mechanische passage van PSC gekweekt op embryonale muis-fibroblasten. Vervolgens wordt beschreven hoe PSC worden omgezet in enzymatische bulk-kweken om EBs te genereren voor gerichte gedefinieerde hartcel differentiatie. Deze methode is nuttig voor het genereren van grote aantallen uniform geproduceerde hartspiercellen uit dezelfde cellijn, aangezien voor elke lijn hoogstwaarschijnlijk optimalisatie van de gebruikte groeifactoren nodig is (tevens beschreven in dit hoofdstuk).

In **hoofdstuk 6** wordt gekeken naar het verkrijgen van hiPSC van drie patiënten met hypertrofische cardiomyopathie (HCM) door het herprogrammeren van fibroblasten uit de

huidbiopten. Twee van de patiënten behoorden tot dezelfde familie, de derde patiënt niet, maar deze had wel dezelfde Nederlandse foundermutatie (2373insG) in het myosinebindend eiwit C Type 3-gen (MYBPC3). Met behulp van western blotting konden we detecteren dat in vergelijking met de controlegroep de MYBPC3-eiwitniveaus significant verlaagd waren in HCM-iPSC hartspiercellen (HCM-iPSC-CM). Dit komt overeen met eerder gevonden verminderde MYBPC3-niveaus in hartbiopten van patiënten. De gedissocieerde en uitgeplate enkele hartspiercellen van HCM-iPSC hadden een celoppervlak dat tweemaal groter was dan dat van de controlehartspiercellen. Bovendien was in zieke hartspiercellen de calciumsignalering veranderd ten opzichte van de controlecellen, wat aansluit bij eerder gepubliceerde gegevens. Hartspiercellen van HCM-iPSC vertonen dus essentiële kenmerken van de ziekte en bieden een basis voor verder onderzoek naar de aard van HCM veroorzaakt door mutaties in MYBPC3.

In **hoofdstuk 7** worden de directe gevolgen van serum op hartspiercellen van menselijk ESC, gezonde hiPSC en hiPSC van patiënten met HCM door een mutatie in het gen MYBPC3 besproken om te begrijpen hoe ze van invloed kunnen zijn op de interpretatie van het fenotype gedurende de kweek. Als eerste hebben we de eerder gepubliceerde hypertrofische effecten van serum, die blijken uit een vergroot celoppervlak en hogere slagfrequentie, bevestigd bij gekweekte hartspiercellen van neonatale ratten. Vervolgens hebben we aangetoond dat serum soortgelijke en slecht omkeerbare vergrotingen van het celoppervlak van hartspiercellen uit hESC- en hiPSC veroorzaakte, evenals een significante verhoging van het tempo van samentrekking. Fenylefrine, dat normaliter hypertrofie veroorzaakt in gekweekte hartspiercellen, had geen additioneel effect onder deze serumomstandigheden. Daarnaast hebben we aangetoond dat hartspiercellen van iPSC van drie MYBPC3-patiënten een groter celoppervlak hadden dan de controlehartspiercellen bij afwezigheid van serum. Dit wijst op hypertrofie zoals voorspeld door hun genotype, maar dit verschil was niet aanwezig bij gebruik van serum. Serum kan het fenotype van hartspiercellen van hPSC zodanig significant veranderen onder anderszins omstandigheden dat de effecten van geneesmiddelen- en genmutaties die van invloed zijn op hypertrofie mogelijk onderschat worden. Het is daarom belangrijk om cardiale fenotypes, waar mogelijk, te onderzoeken in volledig gedefinieerde cultuurmedia zonder of met lage concentraties serum.

Hoofdstuk 8 richt zich op de ontwikkeling van een universeel selectiesysteem voor hartcellen van PSC (PSC-CM) met hoge celoverleving en lage toxiciteit gebaseerd op adeno-associated virusvectoren (AAV). De gegenereerde AAV serotype 2 vector (AAV2) was minder gevoelig voor proteasomale degradatie en had een dwarsgestreept spierweefsel promotorgedreven (d.w.z. MHCK7) puromycineresistentiegen voor het selecteren van PSC-CM. We hebben aangetoond dat deze vector beter PSC-CM transduceerde dan fibroblasten. Tijdens de eerste experimenten resulteerde puromycineselectie in een $\geq 97\%$ -zuivere hartspiercelpopulatie, maar in vervolgenderperimenten bleek het moeilijk om de hartspiercellen reproduceerbaar uit te platen na de puromycinebehandeling. In dit hoofdstuk worden eveneens suggesties gedaan voor verdere verbetering van de vector en selectieprocedure, wat uiteindelijk kan leiden tot een effectieve op AAV-vector gebaseerde PSC-CM selectiemethode.

Ten slotte worden in **hoofdstuk 9** in een algemene discussie de bevindingen van de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift samengebracht en worden eveneens de toekomstperspectieven en belemmeringen besproken. Het gebruik van PSC-technologie maakt het bestuderen van ziekte van de ziektedragende hPSC-lijnen lastig, vooral door moeilijkheden met immaturiteit van PSC-CM en met ziektefenotype in klinisch asymptomatische patiënten.