



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Viral vector-mediated gene transfer in fundamental and applied cardiovascular research

Swildens, J.

Citation

Swildens, J. (2012, October 11). *Viral vector-mediated gene transfer in fundamental and applied cardiovascular research*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19949>

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/1887/19949>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19949> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Swildens, Jim

Title: Viral vector-mediated gene transfer in fundamental and applied cardiovascular research

Issue Date: 2012-10-11

9.3 Samenvatting en conclusies

De structuur en functie van cellen worden voor een groot gedeelte bepaald door het repertoire van genen dat in deze cellen wordt geëxprimeerd. Voor de behandeling van diverse cardiale aandoeningen geldt het modificeren van genexpressie, om de expressie van een bepaald gen te verhogen of te verlagen, als mogelijke therapie. Als methode om het gewenste gen in de hartcel te brengen, hebben virale vectoren de beste resultaten opgeleverd. Dit proefschrift beschrijft een aantal studies die onderzoeken hoe virale vectoren kunnen worden benut om op een efficiënte manier hartcellen te beïnvloeden en wat de effecten van bepaalde genetische interventies zijn op de (patho)fysiologie van hartcellen.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de huidige virale vector technologie en hoe deze vectoren gebruikt worden in basaal cardiaal onderzoek en als nieuwe alternatieven voor de behandeling van hartziekten. De drie meest gebruikte vector systemen voor *in vitro* en *in vivo* genoverdracht worden geïntroduceerd, gevolgd door verschillende methoden die kunnen worden gebruikt om virale vectoren aan te passen ten einde specifiek het hart te modificeren. Vervolgens worden verscheidene manieren van interventie, zoals overexpressie en inhibitie van endogene gen expressie, bediscussieerd. De laatste delen van dit hoofdstuk zijn gericht op de toepassing van virale vector technologie in basaal cardiaal onderzoek en de mogelijke toepassing van virale vector-gemedieerde genoverdracht in het hart om diverse hartziekten te behandelen.

Hoofdstuk 2 beschrijft hoe expressie van de skeletspier-specifieke transcriptie factor MyoD in humane mesenchymale stamcellen (hMSCs) het potentieel van deze cellen om het dystrofine gen over te brengen naar Duchenne spierdystrofie (DMD) myoblasten door middel van celfusie vergroot. Met behulp van immunofluorescente kleuring en reverse transcriptie PCR werd vastgesteld dat transductie van hMSCs met een lentivirale vector coderend voor MyoD leidde tot de expressie van verschillende vroege en late skeletspiermarkers. Ook was het percentage MyoD-expresserende hMSCs die gefuseerd waren met myoblasten tot myotubes hoger dan het percentage gefuseerde hMSCs die geen MyoD expresseerden. Vervolgens werden MyoD-expresserende hMSCs getransduceerd met een adenovirale vector coderend voor het dystrofine eiwit om te testen of deze hMSCs in staat waren dystrofine expressie in DMD myoblasten te herstellen. Immunofluorescente kleuring van dystrofine liet zien dat dystrofine slechts aanwezig was in myotubes die gefuseerd waren met hMSCs. Bovendien was dystrofine-expressie correct gelokaliseerd langs het plasmamembraan. Expressie van β -dystroglycan, onderdeel van het dystrofine-geassocieerde glycoproteïne complex, was sterker in myoblast-hMSC myotubes dan in myotubes die bestonden uit alleen myoblasten, wat er op wijst dat het overbrengen van dystrofine naar DMD myotubes de formatie van dit complex kan herstellen. Deze resultaten laten zien dat het overbrengen van transgenen door middel van celfusie mogelijk is en dit verschaft mogelijk een nieuwe behandeling van DMD.

Hoofdstuk 3 onderzoekt of stimulatie van integrines op neonatale ratten cardiomyocyten (nrCMCs) de opname van macromoleculen door deze cellen bevordert. Daartoe werd de opname van Texas Red-gemerkt ovalbumine (OTR) of Texas Red-gemerkt

dextran (DTR) gekwantificeerd. Integrine stimulatie door het pentapeptide GRGDS, dat het RGD-motief bevat, resulteerde in een verhoogde opname van zowel OTR als DTR afhankelijk van hun concentratie in het medium. Daarnaast correleerde de opname van macromoleculen met de GRGDS concentratie en incubatietijd. De opname van OTR als gevolg van stimulatie met GRGDS werd bewerkstelligd door macropinocytose, aangezien werd aangetoond dat wortmannin, een remmer van dit proces, de OTR opname na GRGDS stimulatie verminderde. Hierna werd de rol van dysferline in macromoleculopname onderzocht. Immunofluorescente kleuring van dysferline toonde aan dat de grootte van dysferlineplekken in het celmembraan van nrCMCs was toegenomen na GRGDS stimulatie vergeleken met ongestimuleerde cellen. Deze toename in de grootte van dysferlineplekken werd echter niet waargenomen wanneer het contraheren van de nrCMCs werd onderdrukt, wat er op wijst dat het optreden van membraanscheurtjes betrokken is bij macromoleculopname. Remming van dysferline-expressie met behulp van lentivirale vectoren coderend voor short hairpin (sh)RNAs tegen het dysferline mRNA resulteerde in een afname van de door GRGDS geïnduceerde OTR opname, wat aanduidt dat dysferline vereist is voor macropinocytose. Aangezien het uitrekken van de cellen het voorkomen van membraanscheurtjes deed toenemen, lieten nrCMCs die werden uitgerekt meer OTR opname zien dan niet-gerekte nrCMCs en deze toename was afhankelijk van de mate van rek. Samenvattend laat dit onderzoek zien dat integrine stimulatie tot opname van macromoleculen via macropinocytose leidt. Dysferline dat betrokken is bij het herstel van membraanscheurtjes lijkt betrokken te zijn bij dit proces.

Hoofdstuk 4 beschrijft een onderzoek waarin het effect van veranderingen in de beschikbaarheid van stikstofmonoxide (NO) op door integrine stimulatie geïnduceerde hypertrofie in nrCMCs werd getest. Daartoe werd in GRGDS-gestimuleerde nrCMCs NO-synthase 1 (NOS1) geremd door incubatie met L-NAME of door transductie met een lentivirale vector coderend voor de proteïne inhibitor van NOS1 (PIN) of coderend voor een shRNA gericht tegen het NOS1 mRNA. Elk van deze interventies leidde tot een vermindering van het hypertrofe effect en de mate van de afname was afhankelijk van de beschikbaarheid van NO. Daarnaast bleek dat exogene toediening van NO de NOS1 remming kon omzeilen, wat leidde tot hypertrofie in GRGDS gestimuleerde nrCMCs. Inductie van NOS2 door lipopolysaccharide (LPS) resulteerde in hypertrofie, welke afhankelijk was van het NOS2 expressie niveau. Hypertrophy werd volledig teniet gedaan door ODQ, een remmer van guanylaat cyclase (sGC), maar de hypertrofe reactie werd hersteld na gelijktijdige toediening van 6-Br-cGMP, een analoog van cGMP dat het product is van de door sGC gekatalyseerde reactie. Aangezien sGC op NO reageert, geven deze resultaten het belang van NO-signaal transductie in de hypertrofe respons op integrine stimulatie aan. Vervolgens werd onderzocht of de signaalcascade die leidt tot hypertrofe groei via Akt1 loopt. Activatie van Akt1 gebeurt door fosforylering van Akt1. De P-Akt1/Akt1 ratio was verhoogd na GRGDS stimulatie en was significant verlaagd na toediening van L-NAME. Daarnaast resulteerde remming van PI3K voor Akt1 in de signaalcascade door wortmannin in het volledig uitblijven van de door GRGDS geïnduceerde hypertrofie. Overexpressie van constitutief-actief Akt1 met behulp van een lentivirale vector induceerde hypertrofie in nrCMCs, terwijl lentivirale vector gemedieerde expressie van een dominant-negatieve versie van Akt1 de door GRGDS geïnduceerde hypertrofie remde. Samenvattend impliceren deze resultaten dat de PI3K/Akt1 signaalcascade be-

trokken is bij de door integrine stimulatie geïnduceerde hypertrofie in nrCMCs. Hierbij wordt een model voorgesteld waarin integrine stimulatie, NO en de PI3K/Akt1 signaal cascade koppelen aan het hypertrofische proces in nrCMCs.

In Hoofdstuk 5 wordt de hypothese getest dat inhibitie van de koppeling tussen myofibroblasten (MFBs) en CMCs de ontwikkeling van aritmieën in fibrotische kweken vermindert. In fibrotische kweken bleek dat de geleidingssnelheid significant langzamer was dan in controle kweken. Bovendien was de frequentie van ectopische activiteit en re-entry tachyarritmieën hoger in fibrotische kweken dan in controle kweken. Immunofluorescente kleuring liet zien dat Cx43 aanwezig was tussen aangrenzende MFBs en CMCs. De rust membraanpotentiaal van de CMCs in de fibrotische kweken was significant minder negatief dan die van CMCs in controle kweken, en dit verhoogde de kans op re-entry in fibrotische kweken. Om onze hypothese te testen werden MFBs getransduceerd met een lentivirale vector coderend voor een shRNA gericht tegen Cx43. In MFBs die de Cx43-shRNA tot expressie brachten, was de Cx43 expressie verminderd met 53% en werd significant minder kleurstofoverdracht door de gap junctions waargenomen. De rust-membraanpotentiaal van CMCs in fibrotische kweken die MFBs met geremde Cx43 expressie bevatten was significant lager dan de rust-membraanpotentiaal van CMCs in kweken met MFBs die een controle shRNA hadden ontvangen. In kweken met MFBs waarin Cx43 was geremd was de geleidingssnelheid significant hoger dan in kweken met MFBs die een controle shRNA hadden ontvangen en ectopische activiteit en re-entry tachyarritmieën waren verminderd met respectievelijk 32.8% en 44.1%. Samenvattend laten deze resultaten zien dat functionele ont koppeling van MFBs en CMCs door middel van het remmen van Cx43 expressie het optreden van aritmieën in fibrotische culturen kan verhinderen. Deze resultaten wijzen er op dat myofibroblasten in het myocard een nieuw richtpunt kunnen zijn voor anti-aritmische therapie.

Hoofdstuk 6 beschrijft de rol van gap junction koppeling bij de transdifferentiatie van hMSCs naar CMCs. In tegenstelling tot volwassen hMSCs kunnen foetale hMSCs differentiëren tot CMCs, wanneer deze cellen samen met CMCs worden gekweekt. De bevinding dat foetale hMSCs een hoog Cx43 expressie niveau hebben, wat er voor zorgt dat deze cellen kunnen koppelen met de CMCs, terwijl volwassen hMSCs bijna geen Cx43 tot expressie brengen, zou dit verschil kunnen verklaren. Om dit verder uit te zoeken werd Cx43 expressie geremd in foetale hMSCs en Cx43 tot expressie gebracht in volwassen hMSCs met behulp van lentivirale vectoren. Kleurstofoverdracht metingen met calceïne lieten zien dat een hoger percentage van de volwassen Cx43 expresserende hMSCs calceïne positief was en dat de intensiteit van de kleuring sterker was vergeleken met controle volwassen hMSCs. In foetale hMSCs met geremde Cx43 expressie werd daarentegen het omgekeerde effect waargenomen. Immunofluorescente kleuring van α -actinin werd gebruikt om de differentiatie van hMSCs naar CMCs te bepalen. Hoewel ongeveer 2,2% van de controle foetale hMSCs positief was voor α -actinin, was geen van de foetale hMSCs, waarin Cx43 was geremd, positief voor α -actinin, wat er op wijst dat de door Cx43 gemedieerde koppeling met omliggende CMCs nodig is voor de differentiatie van hMSCs tot CMCs. Differentiatie van volwassen hMSCs werd echter niet vastgesteld, zelfs niet wanneer Cx43 tot overexpressie was gebracht. Om te bepalen of de expressie van een ander gap junction eiwit Cx45 het potentieel van foetale hMSCs met geremde Cx43 expressie om te differentiëren tot CMCs, werden genoemde

cellen getransduceerd met een lentivirale vector coderend voor Cx45. Zowel het percentage calceïne-positieve cellen als de intensiteit van de kleurstof was duidelijk verhoogd. Bovendien bleken ongeveer 1,6% van de cellen α -actinin positief. Deze resultaten laten zien dat koppeling van foetale hMSCs en CMCs door middel van gap junctions nodig is voor de differentiatie van hMSCs naar CMCs. Waarschijnlijk zijn kleine moleculen in staat om door deze gap junctions te bewegen en zo differentiatie te induceren. Volwassen hMSCs, daarentegen, bleken niet in staat om te differentiëren naar CMCs, waarschijnlijk omdat deze minder primitieve cellen hun differentiatiecapaciteit hebben verloren door veranderingen in hun epigenetische opmaak.

Hoofdstuk 7 beschrijft een onderzoek dat tot doel had adeno-geassocieerd virus (AAV) vectoren te ontwikkelen voor de transductie van myocardiale litteken fibroblasten (MSFs). Een voorwaarde voor AAV vectoren als genoverdracht vector in littekenweefsel is dat het therapeutische transgen alleen in litteken fibroblasten tot expressie dient te komen en niet in de overlevende CMCs. Daarom beoogden wij te bepalen welke de optimale promotor en AAV serotype zijn die resulteren in een hoge transgenexpressie in MSFs maar niet in CMCs. Negen verschillende promotors werden getest op hun activiteit in humane, muizen en ratten MSFs evenals in CMCs. In humans MSFs was de humane CMV promotor meest actief, terwijl in muizen en ratten MSFs de humane EF1 α promotor de hoogste activiteit vertoonde. De RSV promotor gaf de hoogste transgen expressie in nrCMCs. Vervolgens testten we vijf verschillende serotypen om te bepalen welk serotype ratten MSFs of nrCMCs het meest efficiënt zou transduceren. Deze vergelijking liet zien dat AAV serotype 2 ratten MSFs het meest efficiënt transduceerden en AAV serotype 9 het meest specifiek nrCMCs transduceerden. Deze resultaten laten zien dat de meest specifieke transgenexpressie in ratten MSFs kan worden bereikt door transductie met een AAV vector met een serotype 2 capside en een transgen dat wordt aangedreven door de EF1 α promotor, terwijl nrCMCs het best kunnen worden getransduceerd met een AAV serotype 9 vector met de RSV promotor die transgenexpressie stuurt. Om deze te resultaten te bevestigen werden geoptimaliseerde AAV vectoren coderend voor GFP voor ratten MSFs of het rood fluorescerende eiwit FP650 voor nrCMCs gemaakt. Zoals verwacht was de intensiteit van het fluorescente signaal van cellen getransduceerd met de AAV2.EF1 α .GFP vector 4 keer hoger in ratten MSF kweken dan in nrCMC kweken. Transductie van ratten MSFs met de AAV9.RSV.FP650 vector resulteerde niet in significante transgenexpressie, ofschoon hoge expressieniveaus werden gemeten in nrCMCs. Deze resultaten bevestigen inderdaad dat onze geoptimaliseerde AAV vectoren in staat zijn om specifiek MSFs of CMCs te transduceren in de rat. Of dezelfde resultaten ook *in vivo* kunnen worden gevonden vereist meer experimenten.

De onderzoeken die in dit proefschrift worden beschreven benadrukken het enorme potentieel van gentherapie om verscheidene ziekten te behandelen met behulp van virale vectoren. Aandoeningen die zijn bestudeerd omvatten Duchenne spierdystrofie en harttritmestoornissen als gevolg van cardiale fibrose. Verder is genetische modificatie met behulp van virale vectoren een belangrijk hulpstuk bij het ontrafelen van (patho)fysiologische mechanismen, zoals integrine fysiologie van CMCs, de rol van NO in de hypertrofie van CMCs en de rol van cel-cel contact in stamcel differentiatie. Om virale vectoren ook *in vivo* te kunnen toepassen, moeten vraagstukken als de veiligheid van virale vec-

toren, efficiënte targeting van het hart en de duur van genexpressie verder onderzocht worden.

9.4 Vervolgonderzoek

Het beperkte herstellend vermogen van het hart na schade en de bevinding dat cellen die worden toegediend aan het hart als celtherapie niet differentiëren tot CMCs zijn de aanleiding geweest tot onderzoek naar nieuwe manieren om primitieve cellen *in vitro* te differentiëren tot CMCs. Humane MSCs die de skeletspier-specifieke transcriptie factor MyoD hadden ontvangen brachten een aantal skeletspiermarkers tot expressie en waren meer geneigd tot fusie met myoblasten in een gemengde kweek om myotubes te vormen dan controle cellen. Deze resultaten laten het potentieel zien van genetisch gemodificeerde stamcellen om te differentiëren richting spiercellen. Hoewel geen van de bekende cardiomyogene transcriptiefactoren in staat is om volledige differentiatie van stamcellen te bewerkstelligen, bleken combinaties van transcriptie factoren wel voldoende om muriene cellen te differentiëren tot CMCs. Vervolgonderzoek naar kweken met humane MSCs moet duidelijk maken welke combinatie van factoren nodig is om deze cellen te differentiëren naar CMCs. De bevinding dat meer primitieve stamcellen, d.w.z. foetale MSCs, gemakkelijker differentiëren tot CMCs dan volwassen MSCs spreekt voor het gebruik van de foetale cellen in deze experimenten. Behalve het gebruik van cardiomyogene transcriptiefactoren zou verbeterde koppeling door middel van gap junctions tussen MSCs en de omliggende CMCs kunnen leiden tot verbeterde differentiatie van deze MSCs. Foetale MSCs in kweken met nrCMCs waren in staat om te differentiëren tot CMCs, maar dit vermogen werd te niet gedaan wanneer Cx43 expressie werd geremd. Het wordt verondersteld dat gap junctions de overdracht van cardiomyogene signalen van de CMCs naar de MSCs mogelijk maken en daardoor differentiatie van MSCs induceren. Het zou interessant zijn om te onderzoeken wat deze signalen zijn en welke mechanismen verantwoordelijk zijn voor dit proces. Geforceerde expressie van Cx43 in getransplanteerde cellen bij celtherapie zouden dus de differentiatie van ingenestelde cellen kunnen verbeteren, hoewel enkele valkuilen in acht moeten worden genomen. Ten eerste moeten de getransplanteerde cellen in staat zijn om te differentiëren tot CMCs, aangezien het is aangetoond dat gap junction-gemedieerde koppeling van nrCMCs met ongedifferentieerde cellen de membraanpotentiaal van CMCs doet afnemen, wat leidt tot ectopische activiteit en re-entry tachyarritmieën. Toediening van MSCs die Cx43 tot expressie brengen, maar niet differentiëren tot CMCs, zouden daarom een nadelig effect op de hartfunctie kunnen hebben. Deze resultaten benadrukken opnieuw de noodzaak om nieuwe methoden te ontwikkelen om de het potentieel van autologe MSCs om te differentiëren tot CMCs te verbeteren voordat deze cellen worden geïnjecteerd in het hart van de patiënt.

Afgezien van het gebruik van gentherapie om cardiale celtherapie te verbeteren, zou genetische modificatie van fibroblasten uit myocardiaal littekenweefsel in patiënten die een hartinfarct hebben gehad de hartfunctie kunnen verbeteren. De littekenfibroblasten en de extracellulaire matrix die door deze cellen wordt uitgescheiden vormen een anatomische geleidingsblokkade, die leidt tot dyssynchronie en mogelijke aritmieën. Genetische modificatie van de littekenfibroblasten door middel van de introductie van

een virale vector die ionkanaal eiwitten, zoals Cx43, tot expressie brengt, zou de geleiding door het litteken kunnen verbeteren en daardoor de dyssynchronie kunnen verminderen. Een geschikte virale vector is nodig om de efficiëntie van het overbrengen van het therapeutische gen naar het litteken te verhogen en tegelijkertijd de nadelige effecten te verkleinen. Vooral van AAV vectoren is de laatste jaren aangetoond dat deze vectoren uitermate geschikt zijn als vector systeem om het hart te bereiken. Aangezien het onwenselijk is om gezonde CMCs te transduceren met de therapeutische vector, omdat dit zou kunnen leiden tot suprafysiologische transgen niveaus in deze cellen, beschrijft dit proefschrift de ontwikkeling van een AAV vector die specifiek fibroblasten target. De bruikbaarheid van deze vector *in vivo* moet worden onderzocht in een hartinfarct model in de rat. Toekomstige experimenten zouden het effect van de introductie van ionkanaal genen in littekenfibroblasten moeten onderzoeken. Daarnaast moeten AAV vectoren verder geoptimaliseerd worden om de littekenfibroblasten beter te targeten.