



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Optogenetic investigation of cardiac arrhythmia mechanisms

Feola, I.

Citation

Feola, I. (2018, December 11). *Optogenetic investigation of cardiac arrhythmia mechanisms*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/67391>

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/1887/67391>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/67391>

Author: Feola, I.

Title: Optogenetic investigation of cardiac arrhythmia mechanisms

Issue Date: 2018-12-11

Chapter

SAMENVATTING
LIST OF PUBLICATIONS
ACKNOWLEDGMENTS
CURRICULUM VITAE

8

SAMENVATTING

De algemene introductie van dit proefschrift, **Hoofdstuk I**, beschrijft hoe elektrische impulsen ontstaan, zich voort geleiden in een gezond hart en hoe verstoringen in deze hiervan kunnen leiden tot hartritmestoornissen. Bovendien worden de huidige anti-aritmische strategieën benoemd, het leeuwendeel van de aandacht zal echter liggen bij gentherapie en de optogenetica. **Hoofdstuk II** beschrijft hoe monoculturen van atriale neonatale ratten cardiomyocyten (aCMCs) optogenetisch worden gemodificeerd met lentivirale (LV) deeltjes, die coderen voor het depolariserende ionkanaal CatCh (Ca^{2+} -permeabele 'channelrhodopsin'). In dit hoofdstuk wordt een gedetailleerde uiteenzetting gegeven van de verschillende stappen, beginnend bij de isolatie van aCMCs, gevolgd door de productie van de LV-deeltjes, het gebruik van deze deeltjes om de aCMCs optogenetisch te modificeren en uiteindelijk 'optical voltage mapping' om aan te tonen dat de CatCh gemodificeerde aCMC monoculturen reageren op belichting met algemeen blauw licht, uiteindelijk resulterend in het ontstaan van een synchrone actiepotentialiaal. In **Hoofdstuk III** gebruikten we het *in vitro* model beschreven in Hoofdstuk II, namelijk de aCMC monoculturen met de expressie van CatCh, om onderzoek te doen naar de mechanismen verantwoordelijk voor het termineren middels 'rotor-guided ablation', een nieuwe ablatie strategie die recent is voortgekomen uit de klinische praktijk. In deze studie werd CatCh specifiek en nauwkeurig geactiveerd door middel van belichting middels een patroon. Deze uiterste nauwkeurige controle in ruimte en tijd stelde ons in beginsel in staat om een stabiele rotor te induceren, gevolgd door het bestuderen van zijn terminatie middels optogenetische blokkade elektrische impuls rondom de rotor kern door middel van cirkelvormige of lineaire belichtings patronen. We ontdekten dat lokale optogenetische targeting in atriale monoculturen zowel kon zorgen voor rotor stabilisatie als destabilisatie. Echter voor terminatie was een lijn, resulterend in een voortgeleidings blok, noodzakelijk die reikte vanuit de 'core region' naar tenminste een niet exciteerbare grens. De pracht van deze benadering inspireerde ons om het onderzoek voort te zetten en de 'spiral wave dynamics' verder uit te diepen. Als vervolg hierop, zoals beschreven en gepresenteerd in **Hoofdstuk IV**, gebruikten we ook aCMCs monoculturen met CatCh-expressie en patroon belichting. Hierin beschrijven we een unieke methode om controle uit te oefenen op de 'spiral wave cores' in tijd en plaats, dit wordt ook wel AAD (Aantrekken-Verankeren-Slepen) genoemd. Deze methode is gebaseerd op i) aantrekking, ii) verankering van een spiral wave tip naar een tijdelijke heterogeniteit (*d.w.z.* een omkeerbaar voortgeleidings blok dichtbij de 'spiral wave core') en iii) het 'dragen' naar een nieuwe, reeds gedefinieerde locatie. Met dit proces kunnen de 'spirals' over elk gewenst traject worden geleid en uiteindelijk getermineerd wanneer ze naar een 'inexcitable boundary' of andere 'spirals' worden gedirigeerd. De *in vitro* proeven werden aangevuld met *in silico*-simulaties die een nauwkeurige en robuuste spatiotemporele controle van de 'spiral wave cores' aantonen onder verschillende condities. Het gebruik van lichtpunten met verschillende groottes, *d.w.z.* verschillende diameter (*d*), toonde dat een punt met kleine afmeting leidde tot 'dragging' via een cycloïdale baan, terwijl een grote punt geassocieerd was met een lineaire baan. Inderdaad, toen de grote lichtpunten met de hoogste snelheid werden bewogen, leek het effectieve gedepolariseerde gebied op een

langwerpige ellips en zorgde ervoor dat de ‘spiral tip’ verankerd bleef aan de grens van lineaire patroon. Echter, bij langzamere sleep snelheden, *d.w.z.* een langere belichtingstijd, voerde de ‘spiral wave’ één of meer complete rotaties uit rondom het middels licht gedepolariseerde gebied, alvorens deze opnieuw werd gepositioneerd naar de volgende verlichte plek. Derhalve kunnen punten meteen grotere afmeting ook een cycloïdaal traject volgen. Bovendien speelden de locatie van het lichtpunt, de locatie van de ‘spiral tip’ en de richting van het ‘dragging’ een belangrijke rol bij het ‘spiral wave dragging’. Het ‘draggen’ werd was het meest efficiënt wanneer de lichtpunt dicht genoeg bij de locatie van de ‘spiral tip’ was en binnen de ‘angular spread’ in de drift richting van de ‘spiral core’. In **Hoofdstuk V**, werd optogenetische terminatie van anatomische reentry onderzocht in een meer complex *in vitro* model, *d.w.z.* 150 μm dikke plakjes verkregen uit neonataal ventriculair weefsel. De plakjes werden genetisch gemodificeerd met CatCh-coderende LV-deeltjes. Hier werd patroon belichting gebruikt om CatCh lokaal te activeren om daarmee een lokaal en reversibel voortgeleidings blok te creëren in de baan van de reentry. Het genereren van een transmuraal voortgeleidings blok met een breedte van 600 μm in de baan van de e-entry leidde altijd tot beëindiging van de aritmie. In dit geval waren de ‘reentry waves’ niet in staat om het belichte gebied te betreden en daarmee werd de reentry onmiddellijk beëindigd. In het geval dat het voortgeleidings blok de baan van reentry niet volledig blokkeerde, was de uitkomst afhankelijk van de breedte van de isthmus. In deze gevallen werd de reentry meestal beëindigd rondom de belichting plek middels het verder vernauwen van de isthmus. Vanuit mechanistisch oogpunt toonden we, door middel van een complementaire reeks *in silico* en *in situ* experimenten, aan dat het belichtingsoppervlak werd gekarakteriseerd door een uitbreiding in de isthmus middels een ‘gradient in depolarization’. De *in silico*-gegevens toonden dat de membraanpotentiala varieerde van -20 mV in het midden tot -30 mV aan de rand van het belichte gebied en -70 mV in de meer perifere gebieden. In lijn met deze resultaten toonden de *in situ*-data een sterke reductie ($\sim 50\%$) van de optische signaalamplitude op het punt dat het dichtst bij het belichtings gebied lag, daarmee suggestief voor een graduele afname in exciteerbaarheid. Omdat de optogenetische toolbox niet alleen een light-gated ion kanaal bevat hebben we ook een ander optogenetische tool geëxploreerd. Dit was een ROS-generating protein (RGP) genaamd miniSOG (mini singlet oxygen generator) die in combinatie met patroon belichting resulteerde in kwantitatieve, ruimtelijke en temporele controle over de productie van ROS in monoculturen van neonatale ventriculaire ratten cardiomyocyten (NVRMs). Deze combinatie maakte het mogelijk om de ROS effecten op aritmogeniciteit te bestuderen. In **Hoofdstuk VI** laten we zien dat microfoci met verhoogde ROS-productie in myocardiale monoculturen kunnen leiden tot lokale verstoringen in de elektrische impuls generatie en voortgeleiding, resulterend in ectopische activiteit, een functioneel voortgeleidings blok alsmede reentry aritmieën.

Concluderend laten de experimenten in dit proefschrift zien hoe de eenvoud van een *in vitro* model de sleutel kan zijn voor een beter begrip van meer complexe zaken, zoals de mechanismen verantwoordelijk voor de initiatie en terminatie van hartritmestoornissen. Bij al deze experimenten speelde optogenetica een cruciale rol. Catch werd tot expressie gebracht in hartspierweefsel en maakte het daarmee mogelijk om i) globaal en lokaal met licht te pacen, ii)

Samenvatting

een licht afhankelijke enkele 'spiral wave' te induceren, iii) 'spiral wave' te termineren wanneer een blokkerende lijn van de 'core region' naar op z'n minst één niet exciteerbaar gebied loopt, en ten slotte iv) controle over 'spiral wave dynamics' in tijd en ruimte, terwijl miniSOG tot expressie kwam om te laten zien hoe microfoci met toegenomen ROS productie kunnen leiden tot cardiale aritmieën door het creëren van verstoringen bij de elektrische impuls generatie en voortgeleiding.