



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Guide to the heart: Differentiation of human pluripotent stem cells towards multiple cardiac subtypes

Schwach, V.

Citation

Schwach, V. (2020, January 15). *Guide to the heart: Differentiation of human pluripotent stem cells towards multiple cardiac subtypes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/82699>

Version: 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/1887/82699>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/82699> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schwach, V.

Title: Guide to the heart: Differentiation of human pluripotent stem cells towards multiple cardiac subtypes

Issue Date: 2020-01-15

Samenvatting

Tijdens de embryonale ontwikkeling is het hart van alle organen als eerste functioneel, en deze wordt gevormd door een reeks complexe vouw- en draaibewegingen van het embryonale weefsel. Humane pluripotente stamcellen (hPSCs), zowel humane embryonale stamcellen (hESCs) als kunstmatig geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs), hebben het vermogen om voor onbepaalde tijd te blijven delen. Daarnaast kunnen deze stamcellen, net zoals in het embryo, differentiëren naar alle celtypen van de drie kiemlagen, door stappen van de embryonale ontwikkeling (van bijvoorbeeld het hart) na te bootsen. Sinds de eerste isolatie van hESCs uit de binnenste celmassa van menselijke blastocysten in 1998, zijn deze eigenschappen zeer waardevol gebleken voor het bestuderen van de ontwikkelingsbiologie, evenals het modelleren van ziekten *in vitro*, de ontdekking en screening van geneesmiddelen, en tot slot de regeneratieve geneeskunde. In 2007 werden voor het eerst hiPSCs gegenereerd door somatische cellen van patiënten te herprogrammeren tot hPSCs, die daardoor, vanwege hun patiënt-specifieke genetische achtergrond, gebruikt kunnen worden voor ziektemodellering en therapie op maat (Personalized Medicine). De differentiatie van cardiale voorlopercellen (CPCs) en cardiomyocyten (CMs) uit hPSCs heeft onze kennis over cardiale celspecialisatie en ziekteontwikkeling bij de mens aanzienlijk verbeterd. Van hPSC afgeleide CMs worden al snel beschouwd als een veelbelovend alternatief in de veiligheidsfarmacologie en preklinische geneesmiddelenontdekking. Een lange termijndoelstelling van hPSCs en hun derivaten zijn cel-gebaseerd wondherstel en weefselregeneratie. Hoewel hPSC-CMs in theorie de mogelijkheid bieden voor herstel van hartfunctie, blijven technische uitdagingen, zoals (1) generatie van hoge aantallen gedefinieerde cardiale subtype-specifieke cellen met een hoge zuiverheid en (2) het creëren van de biologische niche die het hart nabootst om *in vitro* rijping te stimuleren naar een volwassen fenotype, vooralsnog een onopgelost obstakel. De kern van dit proefschrift is het ontwikkelen van protocollen voor het genereren van meerdere hPSC-afgeleide subceltypen van het hart voor het begrijpen van de ontwikkeling van de menselijke hartspier en hun toepassing in selectieve farmacologie en herstel van het beschadigde hart.

Aangezien een efficiënte en reproduceerbare generatie van zuivere populaties hPSC-CMs cruciaal is voor regeneratieve geneeskunde, ziektemodellering en testen van medicijnen, beschrijft **hoofdstuk 2** van dit proefschrift twee veelgebruikte methoden om hPSCs binnen 10 dagen te differentiëren naar



contraherende CMs. Ondanks een hoge efficiëntie van deze protocollen, genereren hartdifferentiaties gewoonlijk heterogene populaties, bestaande uit zowel CMs als niet-gekaracteriseerde- en niet-hart-specifieke celtypen. Dit hoofdstuk beschrijft daarom ook een protocol, ontwikkeld voor het opzuiveren van hPSC-CMs op basis van magnetische korrels.

Hoofdstuk 3 beschrijft een robuust protocol voor het verkrijgen van hPSC-gedifferentieerde CMs met een specifiek atriale identiteit (hPSC-AMs), door middel van het manipuleren van de retinoïnezuur signalering in de cel tijdens differentiatie. Deze hPSC-AMs zijn moleculair en functioneel gekarakteriseerd en vervolgens toegepast als pre-klinisch farmacologisch hulpmiddel voor het testen van atriale selectiviteit van anti-aritmische geneesmiddelen gericht op de atriaal-verrijkte ion kanalen $K_v1.5$ of Kir3.1/3.4. In reactie op meervoudig-ionkanaalremmer, "Vernakalant" en $K_v1.5$ remmer, XEN-DO101, vertoonden hPSC-AMs, maar niet hPSC-VMs, actiepotentialaal (AP)-verlenging door een vermindering van vroege repolarisatie. In hPSC-AMs, XEN-R0703, een nieuwe Kir3.1/3.4-remmer, herstelde de AP-verkorting veroorzaakt door carbachol. Verder is aangetoond dat deze ionkanalen worden gereguleerd door COUP-TF transcriptiefactoren.

Hoewel de meeste hPSC-CMs in dit differentiatieprotocol een atriale identiteit hebben, bevatten deze celkweken echter ook lage percentages van andere celtypen, waaronder hPSC-VMs. Daarom staat in **hoofdstuk 4** de zoektocht naar specifieke atriale- en ventriculaire oppervlaktemarkers beschreven, die gebruikt kunnen worden voor de scheiding van atriale en ventriculaire CMs. Door middel van zogenaamde "whole-genome microarray" analyse zijn potentiële specifieke oppervlaktemarkers geïdentificeerd, waarmee atriale en ventriculaire cardiomyocyten uit een van hPSCs gedifferentieerde mixpopulatie te onderscheiden en te sorteren zijn. Expressie van de gevonden potentiële atriale en ventriculaire oppervlaktemarkers zijn vervolgens gevalideerd door "kwantitatieve polymerase chain reactie" (qPCR). Atriale CMs en ventriculaire CMs vertoonden inderdaad een verhoogde gen expressie van respectievelijk voorspelde specifieke atriale- of ventriculaire oppervlaktemarkers. Helaas werd met immunocytochemische en flowcytometrische analyses van dezelfde celoppervlaktemarkers geen significant verschillend expressiepatroon gevonden tussen de cardiomyocyte-subtypen. Waarschijnlijk is het noodzakelijk om meer en/of nieuwe strategieën toe te passen, die een volwassener fenotype induceren in deze in vitro gedifferentieerde cardiomyocyten, om de identificatie van subtype-

specifieke oppervlaktemarkers mogelijk te maken.

Als alternatief voor het opzuiveren van hPSC-AMs door middel van oppervlaktemarkers, is een atriale fluorescerende reporterlijn gegenereerd voor de expressie van de atriaal-verrijkte transcriptiefactor COUP-TFII. **Hoofdstuk 5** beschrijft hoe de dubbele atriale NKX2.5^{eGFP/+} - COUP-TFII^{mCherry/+} reporterlijn is ontwikkeld (door middel van CRISPR/Cas9-gemedieerde knockin van rode fluorescerende mCherry in de genomische locus van COUP-TFII in de gevestigde NKX2.5^{eGFP/+} hPSC cellijn). Deze cellijn maakt identificatie en selectie van GFP⁺ (G⁺)/mCherry⁺ (M⁺) CMs na cardiale differentiatie mogelijk, welke moleculaire en functionele eigenschappen van atriale CMs vertonen, in tegenstelling tot de meer ventriculaire gekenmerkte G⁺/M⁻-CMs. De via de reporter cellijn verkregen zuivere populaties van humane atriale en ventriculaire CMs faciliteren de identificatie van bovengenoemde oppervlaktemarkers, waarmee patiënt-specifieke CMs kunnen worden verrijkt voor atriale of ventriculaire identiteit na differentiatie vanuit iPSCs. Ook kan de verrijking van hPSC-AMs de ontwikkeling van meer voorspellende humane *in vitro* ziektemodellen voor atriumziekten, zoals atriumfibrilleren (AF) bevorderen en onze kennis over mogelijke werkingsmechanismen in de toekomst verbeteren. Bovendien hebben we via CRISPR/Cas9-gemedieerde knock-out aangetoond dat COUP-TFII niet vereist is voor atriale differentiatie vanuit hPSCs. Op basis van zowel moleculaire als functionele profilering is te concluderen dat volledige knock-out van COUP-TFII geen invloed op de differentiatie naar hPSC-AMs *in vitro* heeft.

Bij grote schade aan de hartspier, bijvoorbeeld na een hartinfarct (MI), is reparatie alleen mogelijk door het verloren weefsel te vervangen door nieuw spierweefsel. In **hoofdstuk 6** wordt een methode beschreven om op een gereguleerde manier lokaal hartspierweefsel te regenereren. Hiervoor werd bepaald of doxycycline (DOX)-induceerbare (Tet-On-MYC) hPSC-gedifferentieerde cardiale voorlopercellen (CPCs) kunnen prolifereren en vervolgens, in combinatie met fibroblast-groefactor (FGF) activering, *in vivo* kunnen differentiëren naar cardiomyocyten, en op die manier remuscularisatie en revascularisatie van het hart bereikt kan worden. In een muis proefdierenmodel zagen we dat getransplanteerde CPCs zich robuust vermenigvuldigd hadden in zowel hartspierweefsel als in een niet-cardiale niche onder de huid, met behulp van het antibioticum-induceerbare transgene systeem in combinatie met FGF. In afwezigheid van deze zelfvernieuwingsfactoren, differentieerden CPCs met hoge efficiëntie op



beide lokaties in de belangrijkste hartceltypen waaronder cardiomyocyten, endotheelcellen en gladde spiercellen. We hebben verder het potentieel beschreven van hPSC-gedifferentieerde CPCs om ventriculaire remodelering en fibrose te verminderen wanneer deze zijn getransplanteerd naar het hart van muizen na acute MI.

In **hoofdstuk 7** hebben we de progressieve opbouw van de cardiale extracellulaire matrix (ECM) tijdens de embryonale ontwikkeling, de ECM van het volwassen menselijke hart, evenals natuurlijke en synthetische materialen besproken met betrekking tot hun gunstige effect op de hPSC-CM-volwassenheid tijdens het genereren van 3D-cardiale weefsels van hPSC-CMs. HPSC-CMs hebben in het algemeen een foetaal-achtig fenotype. Tijdens de embryonale ontwikkeling ervaart de cardiale ECM een geleidelijke opbouw van matrixproteïnen die verandert tijdens de rijping van CMs. Het nabootsen van deze dynamische stadia kan bijdragen aan de rijping van hPSC-CMs *in vitro*.

Hoofdstuk 8 is een laatste discussie om elk hoofdstuk van dit proefschrift aan elkaar te koppelen en te bespreken. Ook worden de toekomstperspectieven op ziektemodellering, evenals “personalized medicine”, waaronder reparatie van het hart, weefselregeneratie en herstel van hartfunctie besproken. Dit proefschrift eindigt met een historische kijk op klinische ontwikkelingen, zoals de tijd voor routinematige toepassing van vaccinatie en een vooruitzicht op kansen voor het hPSC-veld met betrekking tot nieuwe therapieën, met de conclusie dat hESCs en hiPSCs in relatief korte tijd veel vooruitgang hebben geboekt op hun route naar de kliniek, maar desondanks nog verschillende hindernissen zullen moeten nemen.