



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

Zusammenfassung

Das Herz ist das erste funktionelle Organ, das durch komplexe Umstellungen während der Embryonalentwicklung gebildet wird. Humane pluripotente Stammzellen (hPSCs), sowohl humane embryonale Stammzellen (hESCs) als auch humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs), haben die herausragende Fähigkeit, sich unbegrenzt zu replizieren und in alle Zellen der drei Keimschichten zu differenzieren, indem Schritte der *in vivo* embryonalen Entwicklung rekapituliert werden. Seit der ersten Isolierung von hESCs aus der inneren Zellmasse menschlicher Blastozysten im Jahr 1998 sind diese Eigenschaften für die Entwicklungsbiologie, sowie dem Modellieren von Krankheiten *in vitro*, Medikamententests und der regenerativen Medizin von Nutzen. Im Jahr 2007 wurden hiPSCs generiert, indem somatische Zellen zu hPSCs mit patientenspezifischem genetischem Hintergrund umprogrammiert wurden, dies ist von besonderer Bedeutung für die Modellierung von Krankheiten im Labor und personalisierter Medizin. Die Produktion von Herzvorläuferzellen (CPCs) und Kardiomyozyten (CMs) aus hPSCs hat unser Wissen über die Herzspezifikation und die Krankheitsentwicklung beim Menschen erheblich verbessert. Von hPSC abgeleitete CMs wurden schnell als vielversprechende Alternative in der Sicherheitspharmakologie und der präklinischen Wirkstoffforschung angesehen. Ein langfristiges Ziel von hPSCs und ihren Derivaten ist die zellbasierte Reparatur des Herzens und anderen Organen mit niedrigem regenerativem Potential. Während hPSC-CMs die Möglichkeit der Herzreparatur bieten, müssen erst einige technische Herausforderungen gelöst werden, um die *in-vitro* Reifung zu einem erwachsenen Phänotyp zu fördern: (1) die Erzeugung hoher Anzahlen definierter subtypspezifischer Herzzellen mit hoher Reinheit und (2) die Schaffung einer biologischen Nische, die das natürliche Herz imitiert. Kern dieser Doktorarbeit war die Entwicklung von Protokollen zur Erzeugung multipler hPSC-abgeleiteter kardialer Subtypen um die menschliche Herzentwicklung besser zu verstehen, sowie die Anwendung dieser Herzzellen in der selektiven Pharmakologie und Herzreparatur.

Da die effiziente und reproduzierbare Erzeugung reiner Populationen von hPSC-CMs für die regenerative Medizin, die Modellierung von Krankheiten und das Wirkstoffscreening von entscheidender Bedeutung ist, werden in **Kapitel 2** dieser Doktorarbeit zwei weit verbreitete Methoden zur Differenzierung von hPSCs zu kontrahierenden CMs innerhalb von 10 Tagen beschrieben. Trotz hoher Wirkungsgrade erzeugen Herzdifferenzierungen



typischerweise heterogene Populationen, die sowohl CMs als auch nicht charakterisierte nicht-kardiale Zelltypen umfassen. Aus diesem Grund haben wir in Kapitel 2 auch ein Protokoll zur Reinigung von hPSC-CMs auf der Basis von Magnetkügelchen entwickelt.

In **Kapitel 3** wird die Produktion von hPSC-abgeleiteten CMs mit atrialer Identität (hPSC-AMs – Herzzellen der Vorkammern) durch Modulation des Retinsäure-Signals während der Differenzierung beschrieben. hPSC-AMs wurden transkriptionell und funktionell charakterisiert und als präklinisches pharmakologisches Instrument zum Testen der atrialen Selektivität von Antiarrhythmika gegen atrial angereicherten Ionenkanäle $K_v1.5$ oder Kir3.1/3.4 eingesetzt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass diese Ionenkanäle durch COUP-TF-Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Obwohl die Mehrheit der hPSC-CMs in diesem Differenzierungsprotokoll eine atriale Identität aufweist, enthalten diese Kulturen jedoch auch geringe Prozentsätze anderer Zelltypen, einschließlich hPSC-VMs. In **Kapitel 4** sollten atriale und ventrikuläre Oberflächenmarker für die Trennung von atrialen und ventrikulären CMs identifiziert werden. Um humane subtypspezifische Oberflächenmarker für die Trennung von atrialen und ventrikulären CMs aus gemischten hPSC-abgeleiteten Kulturen zu identifizieren, wurde eine Mikroarray-Analyse des gesamten Genoms durchgeführt. Potentielle atriale und ventrikuläre Oberflächenmarker wurden mittels quantitativer PCR validiert. Transkriptionsniveaus ausgewählter Kandidaten-Zelloberflächenmarker waren in atrialen CMs erhöht, während ausgewählte ventrikuläre Zelloberflächenmarker in ventrikulären Zellen angereichert waren. Leider zeigten Immunfärbung und durchflusszytometrische Analyse der gleichen Zelloberflächenmarker kein signifikant unterschiedliches Expressionsmuster zwischen Kardiomyozyt-Subtypen. Strategien zur Induktion eines adulten Phänotyps können für die Identifizierung subtypspezifischer Oberflächenmarker wichtig sein.

Als alternative Methode zur Auswahl von hPSC-AMs wurde eine atriale fluoreszierende Reporterlinie generiert mit Hilfe von CRISPR/Cas9-vermittelter Integration von Rot fluoreszierendem mCherry in den genomischen Locus von atrial angereichertem COUP-TFII in der etablierten NKX2.5^{eGFP/+} hPSC-Linie in **Kapitel 5**. Die duale atriale NKX2.5^{eGFP/+} - COUP-TFII^{mCherry/+}-Reporterlinie ermöglichte die Identifizierung von GFP⁺ (G⁺)/mCherry⁺ (M⁺) CMs nach kardialer Differenzierung. Diese Zellen zeigten

transkriptionelle und funktionelle Eigenschaften atrialer CMs, während G^+/M^- CMs ventrikuläre Eigenschaften aufwiesen. Reine Populationen von humanen atrialen und ventrikulären CMs könnten die Identifizierung von Oberflächenmarkern unterstützen, die spezifisch entweder auf atrialen oder ventrikulären CMs exprimiert werden und für die Auswahl von atrialen CMs erforderlich sind, die sich von patientenspezifisch induzierten hPSCs unterscheiden. Darüber hinaus kann die Auswahl von hPSC-AMs die Entwicklung prädiktiver *in-vitro* Krankheitsmodelle für Vorhoffibrillationen wie Vorhofflimmern (AF) unterstützen und unser Wissen über die zugrunde liegenden Ursachen in der Zukunft verbessern. Darüber hinaus haben wir über CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockout gezeigt, dass COUP-TFII für die atriale Spezifikation in hPSCs nicht erforderlich ist. Basierend auf molekularen und funktionalen Profilen hatte ein vollständiges Ausschalten von COUP-TFII keinen Einfluss auf die Differenzierung zu hPSC-AMs *in vitro*.

Der Ersatz großer Muskelbereiche kann erforderlich sein, um das Herz von Patienten nach einem Myokardinfarkt (MI) zu regenerieren. Daher wollten wir in **Kapitel 6** herausfinden, ob Doxycycline (DOX)-induzierte (Tet-On-MYC) hPSC-abgeleitete kardiale Vorläuferzellen (CPCs) dazu gebracht werden können, sich *in vivo* auf medikamentenregulierte Weise mit der Aktivierung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF) zu vermehren und dann zu differenzieren und damit einer großflächigen Remuskularisierung und gleichzeitigen Revaskularisierung des Herzens. Transplantierte CPCs dehnten sich im Herzmuskel und in einer nicht kardialen Nische unter der Haut unter Verwendung des Antibiotika-induzierbaren Transgensystems zusammen mit FGF stark aus. Nach Absetzen dieser Selbsterneuerungsfaktoren differenzierten sich CPCs an beiden Stellen mit hoher Effizienz in die Haupterzlinien, einschließlich Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Wir haben ferner das Potential von hPSC-abgeleiteten CPCs zur Verbesserung der ventrikulären Remodellierung und Fibrose nach einer Herztransplantation nach einem akuten MI bei Mäusen beschrieben.

In Kapitel 7 haben wir den fortschreitenden Aufbau der Herz- extrazellulären Matrix (ECM) während der Embryonalentwicklung, der ECM des erwachsenen menschlichen Herzens sowie natürlicher und synthetischer Materialien im Hinblick auf ihre vorteilhafte Wirkung auf die hPSC-CM-Reife während der Erzeugung von 3D-Herz Gewebe aus hPSC-CMs. hPSC-CMs haben im Allgemeinen einen fötalen Phänotyp. Während der Embryonalentwicklung



wird in der kardialen ECM ein allmählicher Aufbau von Matrixproteinen beobachtet, der sich mit der Reifung der CMs ändert. Die Nachahmung dieser dynamischen Stadien kann zur Reifung von hPSC-CM *in vitro* beitragen.

Kapitel 8 ist eine abschließende Diskussion, in der die einzelnen Kapitel dieser Arbeit verknüpft und diskutiert werden. Danach werden zukünftige Perspektiven der Krankheitsmodellierung sowie personalisierte medizinische Ansätze einschließlich Herzreparatur besprochen. Diese Doktorarbeit endet mit einem historischen Überblick über klinische Entwicklungen, wie die routinemäßige Anwendung der Impfung, sowie einem Ausblick auf die Möglichkeiten für das hPSC-Gebiet im Hinblick auf neue Therapien und der Schlussfolgerung, dass hESCs und hiPSCs, trotz diverser Hürden, die noch zu überwinden sind, bereits rasche Fortschritte gemacht haben auf ihrem Weg zur Klinik.

