



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Quantifying functional phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for disease modelling and drug discovery

Meer, B.J. van

Citation

Meer, B. J. van. (2020, November 3). *Quantifying functional phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for disease modelling and drug discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138008>

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/1887/138008>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138008> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Meer, B.J. van

Title: Quantifying functional phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for disease modelling and drug discovery

Issue date: 2020-11-03

Het bestuderen van het effect van ziektes of nieuwe medicijnen op het menselijk lichaam is uitdagend, niet in de laatste plaats vanwege het gebrek aan betrouwbare testmodellen die de menselijke fysiologie goed nabootsen. Dergelijk onderzoek wordt momenteel meestal uitgevoerd op dieren, maar de effecten van dezelfde medicijnen of ziektes zijn vaak anders bij dieren dan bij mensen. Zo zijn er bijvoorbeeld medicijnen bekend die geen effect hadden op het hart van dieren terwijl zij bij sommige mensen dodelijke hartritmestoornissen bleken te veroorzaken. Naast de ethische bezwaren rondom dierproeven, is dat de reden dat er een groeiende interesse is in het maken van menselijke hartmodellen gemaakt van pluripotente stamcellen (hPSCs). Behalve cellen van het hart, kunnen hPSCs zich ook tot alle andere celtypen van het menselijk lichaam ontwikkelen. hPSCs zijn normaal gesproken alleen maar aanwezig tijdens de ontwikkeling van jonge embryo's, maar deze kunnen geïsoleerd worden uit een embryo en in het laboratorium kunstmatig in kweek worden gehouden als 'embryonale stamcellen' (hESC's). Sinds 2006 is het echter mogelijk om hPSCs te creëren in het laboratorium door het genetisch herprogrammeren van cellen afkomstig uit een volwassen lichaam. Deze hPSCs worden humane geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSC) genoemd. Er zijn vandaag de dag veel protocollen beschikbaar om de 'differentiatie' van hPSCs naar verschillende orgaan-specifieke celtypen te sturen, waaronder cellen voor longen, netvlies, bloedvaten, hersenen en het hart. Dit betekent dat er nu een klein aantal cellen bij een patiënt kan worden afgenomen (bijvoorbeeld uit bloed, urine of de huid), welke "ge-herprogrammeerd" kunnen worden naar hiPSCs en vervolgens gedifferentieerd kunnen worden naar hartspiercellen (cardiomyocyten). Aangezien de genen van de patiënt aanwezig en onveranderd blijven tijdens de herprogramming, zijn uitingen van een genetische hartafwijking zichtbaar in de gedifferentieerde hartspiercellen. Het doel van dit proefschrift is geweest om methodes te ontwikkelen om deze uitingen van de hartspiercellen betrouwbaar te meten met genoeg complexiteit om subtiele reacties van de cellen te zien op toegediende medicijnen of erfelijke hartziekten.

Het hart is misschien wel het allerbelangrijkste orgaan van het menselijk lichaam en is dus een levensbedreigend doelorgaan voor giftige stoffen en ziektes. Zo leiden bijwerkingen van medicijnen die voorgeschreven worden voor het behandelen van kanker (bijvoorbeeld doxorubicine) regelmatig tot schade aan het hart. Door gebruik te maken van cardiomyocyten gedifferentieerd uit hPSCs (hPSC-CMs) kunnen farmaceutische bedrijven naar verwachting de bijwerkingen op het hart in een vroeg stadium van medicijnontwikkeling opsporen en voorkomen.

Om het effect van medicijnen of uitingen van ziektes te bestuderen, is het niet alleen belangrijk om hPSC-CMs te hebben, maar ook de meetsystemen om het gedrag van

de cellen te analyseren. In dit proefschrift zijn verschillende systemen ontwikkeld, gevalideerd en getest om de functionele eigenschappen van hPSC-CMs te bestuderen. Om te beginnen zijn de meest recente en beste meetmethodes die op dit moment in gebruik zijn besproken (Hoofdstuk 1 & 2). We merkten op dat het kwantificeren van de samentrekking van cardiomyocyten met name werd gedaan in onderzoeksgroepen die volledig gericht waren op het gebruik van complexe meetsystemen voor hartspiercelfysiologie. Dit inspireerde ons om MUSCLEMOTION te ontwikkelen, een open-source software applicatie die elke bioloog in staat stelt de samentrekking te kwantificeren met het gebruik van standaard laboratorium apparatuur (Hoofdstuk 3 & 4). We ontdekten zelfs dat we in staat waren om niet alleen samentrekking in het laboratorium te meten maar ook in het lichaam van zowel zebrafissen als mensen, met gebruik van echocardiogram.

Het samentrekken van hartspiercellen is niet een simpel proces, maar het resultaat van veranderingen op het niveau van vrije calcium ionen in de cel, wat op haar beurt weer wordt gereguleerd door veranderingen in het elektrische potentiaal van het celmembraan. Dit proces heet de excitatie-contractie koppeling (EC koppeling) en medicijnen met een effect op het hart veroorzaken vaak veranderingen in verschillende stadia van dit proces, hetgeen zorgt voor een verhoging of verlaging van de contractiekracht en/of hartslag. De meetmethode die we in Hoofdstuk 5 hebben ontwikkeld was de eerste die met slechts één meting meer inzicht gaf in de verschillende stadia van de EC koppeling. De microscoop die we hebben gemaakt is in staat om de elektrische activiteit, de veranderingen in calcium ionen en de samentrekking van de hartspiercellen tegelijkertijd te kwantificeren. Door een voorspellingsalgoritme te gebruiken dat we ontwikkelden op basis van eerder gepubliceerde kennis konden we niet alleen verschillen in de hartspiercellen detecteren die veroorzaakt werden door medicijnen, maar konden we ook het mechanisme achter de verandering identificeren. In andere woorden, we konden niet alleen een verschil oppikken in contractiekracht of hartritme, maar ook het mechanisme dat werd beïnvloed door de medicijnen. In Hoofdstuk 6 hebben we dit systeem getest, vergeleken met andere complexe hPSC-CM meetsystemen en gevalideerd in een geblindeerde, multicenter studie. Over het geheel genomen konden we concluderen dat, voor de medicijnen die werden getest, hPSC-CMs even goed – zo niet beter – voorspellend waren voor wat er in mensen gebeurde vergeleken met geïsoleerde konijn cardiomyocyten. Desalniettemin waren hPSC-CMs niet 100% accuraat vergeleken met de klinische data, bijvoorbeeld omdat we bij sommige medicijnen geen verandering in contractie zagen terwijl dat bij een patiënt wel gebeurt. Een belangrijke reden daarvoor is dat de hPSC-CMs nog 'onvolwassen' zijn en zich meer als foetale cardiomyocyten gedragen dan volwassen hartspiercellen

uit een volgroeid individu.

Het verbeteren van methodes om de cardiomyocyten meer volwassen te maken is een belangrijk aandachtspunt in dit onderzoeksveld. Puur biologische routes, zoals het ontwikkelen van 3D weefsels bestaande uit meerdere celtypen, zijn veelbelovend voor het verder volwassen maken van de cellen. Aan de andere kant kunnen kunstmatige routes, zoals van het fabriceren van een micro-omgeving die lijkt op die van het volwassen hart, wellicht leiden tot vergelijkbaar resultaat. Deze kunstmatige micro-omgevingen, die gevuld zijn met cellen, worden micro-fysiologische systemen of Organen-op-Chips (OoCs) genoemd. Ze kunnen ook sensoren en actuatoren bevatten. In Hoofdstuk 7 hebben we een chip met een fysiologische micro-omgeving ontwikkeld en getest. Deze OoC is modulair en kan verschillende celtypen ondersteunen (bijvoorbeeld hart en huid) en er kunnen verschillende sensoren ingebouwd worden (bijvoorbeeld elektrodes en krachtmeters). Een van de belangrijke materialen die gebruikt werd in deze chip en veelvuldig gebruikt wordt in het veld is poly-dimethylsiloxaan (PDMS) terwijl het berucht is vanwege het absorberen van moleculen (zoals medicijnen). Dit hebben we in detail gekwantificeerd in Hoofdstuk 8 voor medicijnen die relevant zijn voor het hart en daarbij methodes onderzocht om de absorptie te verminderen. Terwijl hydrofobiciteit in het algemeen wordt gezien als de reden voor deze absorptie was een belangrijke ontdekking dat niet deze eigenschap maar de topologische polaire oppervlakte de absorptie van verschillende medicijnen leek te voorspellen.

Tot slot hebben we in Hoofdstuk 9 de resultaten van dit proefschrift en toekomstperspectieven beschreven. Onze resultaten versterken het idee dat hPSC modellen menselijke miniaturen worden die met behulp van accurate meetmethodes in staat zijn om essentiële processen na te bootsen die specifiek zijn voor de mens. Er is meer en meer bewijs dat suggereert dat het ook mogelijk wordt om ontstekingsreacties of ziektes van het immuunsysteem te includeren in deze modellen. Niettemin, om een volwassen toepassing te worden in het medicijnontwikkelingstraject, alsmede voor het bestuderen van ziektes of voor gebruik in gepersonaliseerde therapieontwikkeling, is validatie essentieel – net als de ontwikkeling van betrouwbare, reproduceerbare, schaalbare technologie.

