



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Metabolic regulation of differentiation and maturation: from induced pluripotent stem cell to endothelial cell

Es - Tiemeier, G.L. van

Citation

Es - Tiemeier, G. L. van. (2021, September 15). *Metabolic regulation of differentiation and maturation: from induced pluripotent stem cell to endothelial cell*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3210399>

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/1887/3210399>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3210399> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Es - Tiemeier, G.L. van

Title: Metabolic regulation of differentiation and maturation: from induced pluripotent stem cell to endothelial cell

Issue Date: 2021-09-15

Chapter 7

Metabole regulatie van differentiatie en maturatie Van geïnduceerde pluripotente stamcel tot endotheelcel

Gesa L. Tiemeier

Algemene inleiding in de biologie en toepassing van stem cellen

gebaseerd op: *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, H.M.M. Mikkers & R. C. Hoeben. 2011;155:A3565.

Stamcellen kenmerken zich door hun vermogen om zichzelf meermaals te vernieuwen & te vermenigvuldigen zonder daarbij de capaciteit te verliezen om verschillende celtypen te kunnen vormen (differentiatie). Op basis van hun differentiatiecapaciteit worden 2 typen stamcellen onderscheiden: de weefsel-specifieke stamcellen en de pluripotente stamcellen. Weefsel-specifieke stamcellen, ook wel voorlopercellen genoemd, bevinden zich zowel in foetale als in volwassen weefsels. Voorbeelden van volwassen voorlopercellen zijn de stamcellen in de crypte van de darm, stamcellen in de huid of stamcellen in het beenmerg. Hoewel deze stamcellen kunnen differentiëren, is hun differentiatiecapaciteit beperkt, bij de unipotente voorlopercel tot 1 celtype en bij de multipotente voorlopercel tot enkele celtypen. Vaak betreft het celtypen die onderdeel uitmaken van het weefsel waarin de stamcellen zitten. De differentiatiemogelijkheden liggen vast in de cel. De mogelijkheden worden beperkt door specifieke modificaties aan het DNA (genoom) of aan histoneiwitten, de eiwitten waaromheen het DNA is gewikkeld (epigenoom), bijvoorbeeld door de binding van methylgroepen aan bepaalde basen of aminozuren van histonen.

Bekende voorbeelden van multipotente weefsel-specifieke stamcellen zijn hersen- en bloedstamcellen. Hersenstamcellen kunnen cellen van het centraal zenuwstelsel genereren, zoals neuronen, astrocyten en oligodendrocyten, terwijl hematopoëtische (bloedcelvormende) stamcellen nog alle celtypen van het bloed kunnen maken. Bloedstamcellen kunnen echter geen zenuwcellen vormen. In tegenstelling tot de multipotente stamcel, kan de pluripotente stamcel alle celtypen van een volwassen lichaam vormen.

De best bekende pluripotente stamcel is de embryonale stamcel. Embryonale stamcellen worden geïsoleerd uit de binnenste celmassa ('inner cell mass' (ICM)) van een embryo in het blastocystestadium. Tijdens de ontwikkeling van het embryo verdwijnt de aanwezige populatie van pluripotente cellen al in een vroeg stadium door differentiatie tot weefselcellen. Door de ICM-cellen te isoleren en onder specifieke condities in het laboratorium te houden kunnen deze embryonale stamcellen gekweekt worden zonder dat zij hun pluripotente eigenschappen verliezen.

Klinisch gebruik van stamcellen

Doordat stamcellen zichzelf kunnen vernieuwen en daarnaast verschillende celtypen kunnen vormen, bieden deze cellen de mogelijkheid om gebruikt te worden voor het regenereren van weefsels die niet of slecht functioneren. Zo kunnen patiënten met bloedziektes zoals leukemie of immuundeficiëntie genezen worden met een stamceltransplantatie. Klinische toepassingen van andere typen stamcellen zijn nog niet zo succesvol, hoewel recentelijk oogstamcellen uit de limbus corneae, de grens tussen cornea en sclera, effectief bleken voor hoornvliesreparaties.

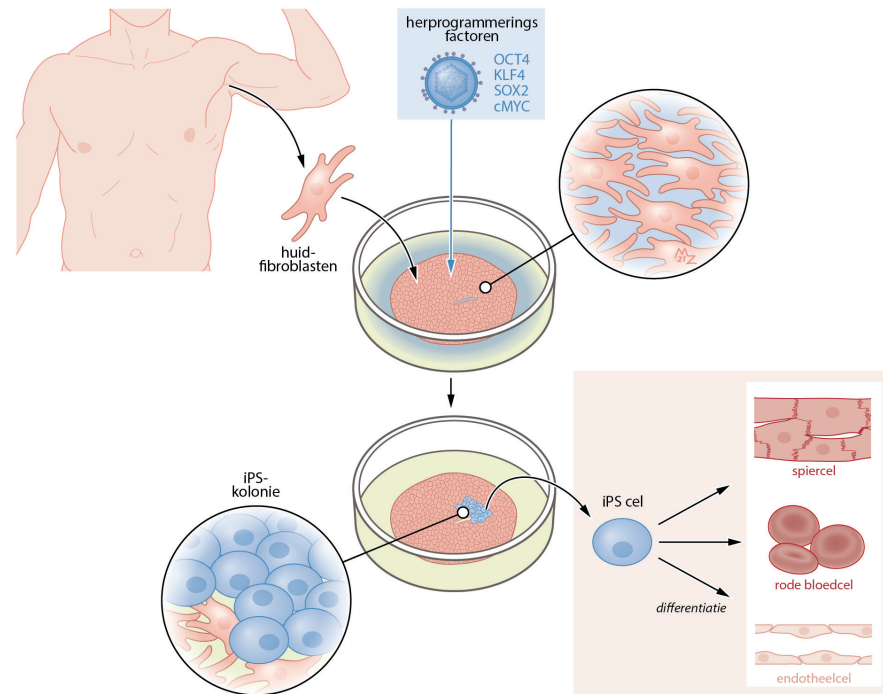
Geïnduceerde pluripotente stamcellen

Om somatische cellen om te vormen tot pluripotente stamcellen moet de cel zijn programma van specialisatie als het ware 'vergeten'. In 2012 heeft de Japanse onderzoeker Yamanaka de Nobel Prijs gewonnen met het idee om door middel van het inbrengen van genen die betrokken zijn bij het in stand houden van de eigenschappen van embryonale stamcellen, huidfibroblasten om te zetten, te herprogrameren, in pluripotente stamcellen. Uiteindelijk kwam zijn onderzoeksgroep tot een cocktail van 4 genen (*KLF4*, *POU5F1* (*OCT4*), *SOX2* en *c-MYC*) die de epigenetische opmaak van gedifferentieerde cellen kunnen terugbrengen naar de staat zoals die voorkomt in pluripotente stamcellen (Figuur 1). Cellen die op deze manier vervaardigd zijn, worden 'geïnduceerde pluripotente stamcellen' (iPSCs) genoemd.

Latere studies hebben laten zien dat de combinatie van *POU5F*, *SOX2*, *NANOG*, en *LIN28* ook cellen kan herprogrameren, en dat afhankelijk van het te herprogrameren celtype één of meerdere factoren achterwege gelaten kunnen worden zonder de eigenschappen van de iPSC te veranderen. Experimenten met iPSCs afkomstig van fibroblasten uit een muizenstaart hebben aangetoond dat, qua functionaliteit, de beste muizen-iPSC-cellijnen gelijk zijn aan embryonale stamcellen uit de muis. Ze zijn pluripotent (in differentiatie-assays in vitro en in vivo), vormen alle weefsels van een muis (na injectie van iPSC in een blastocyste), en dragen bij aan de spermatogenese, waardoor uit een iPSCs afkomstige nakomelingen geboren kunnen worden. Sommige lijnen kunnen zelfs direct zonder hulp van andere cellen een muis genereren, zoals is aangetoond in zogenaamde tetraploïde complementatie-experimenten. Hierbij wordt een iPSC-cel geïnjecteerd in een blastocyste die, door fusie van 2 cellen, 4 stuks van elk chromosoom bevat (tetraploïdie). De diploïde iPSC-cel vormt het embryo, de tetraploïde blastocyste het ondersteunende weefsel, zoals de placenta.

Humane iPSC lijken niet onder te doen voor die van muizen en is het onderzoekers gelukt om cellen van endodermale, ectodermale en mesodermale afkomst

te creëren (de drie eerste lagen van de humane embryonale ontwikkeling). Inmiddels zijn vele verschillende somatische cellen, van bloedcel tot niercel geherprogrammeerd. Primitieve cellen (stam- of voorlopercellen) lijken echter beter herprogrammeerbaar dan volledig gedifferentieerde cellen. Ook de methode waarmee de herprogrammeringsgenen in de cel worden gebracht, beïnvloedt de herprogrammeringsefficiëntie.



Figuur 1. Schematische weergave van het herprogrammeren en differentiëren van iPSC. Somatische cellen, hier uit huidfibroblasten, worden geïsoleerd uit een biopsie van een donor en in kweek genomen. Nadat voldoende cellen zijn verkregen, worden er herprogrammeringsfactoren in deze cellen geïnduceerd, OCT4, KLF4, SOX2, cMYC, middels retrovirale vectoren, plasmiden of mRNA. Van alle behandelde huidfibroblasten zal uiteindelijk een klein percentage iPSC-kolonies vormen. Deze worden dan geïsoleerd en verder opgekweekt. Door middel van differentiatie, in principe nabootsing van de embryonale lagen, kunnen alle type weefselcellen, en zelfs ziekte specifieke cellen met een pathologisch fenotype gemaakt worden, uitgaan van de cellen van een patiënt. Deze cellen kunnen gebruikt worden voor fundamenteel wetenschappelijk onderzoek, voor toxiciteitstesten en voor de identificatie van medicijnen. Daarnaast kunnen iPSC-cellen van gezonde donoren, of patiënt specifieke iPSC waarin het defect is gerepareerd, gebruikt worden voor de regeneratie van weefsels, en uiteindelijk hopelijk voor transplantatie van cellen en organen.

De eerste iPSC-cellen werden vervaardigd met retrovirale en lentivirale vectoren. Dit zijn RNA-virussen waarmee genen efficiënt in zoogdiercellen gebracht kunnen worden. Nadat de virusdeeltjes een cel zijn binnengekomen, wordt hun enkelstrengs RNA omgezet in dubbelstrengs DNA, waarna het virale DNA wordt geïntegreerd in het DNA van de gastheer. Door de integratie van het virale DNA kunnen echter gastheergenen veranderen en zijn de herprogrammeringsgenen met tumorigene eigenschappen zoals *POU5F1* en *c-MYC* blijvend aanwezig. Met nieuwe lentivirale herprogrammeringsvectoren zijn deze nadelen verdwenen. De gebruikte herprogrammeringsgenen zijn induceerbaar, en bovendien uit het gastheergenoem te verwijderen door middel van recombinases. Daarnaast zijn er andere en soms veiligere alternatieven ontwikkeld, zoals transposons, niet-integrerende genoverdrachtvectoren, episomale plasmiden, adenovirussen, sendaivirussen, mRNA-transfecties, cel-permeërende eiwitten en kleine moleculaire verbindingen.

De rol van het metabolisme in stamcel biologie

Geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs) moeten significante veranderingen in hun metabolisme ondergaan om te kunnen reprogrammeren van volwassen somatische cellen naar hun pluripotente staat. De belangrijkste verandering is de *switch* in energievoorziening; van oxidatieve phosphorylatie (OxPhos) naar glycolyse. De producten van de glycolyse zijn brandstof voor de synthese van nucleotiden en vetten. Pyruvaat wordt gebruikt voor de synthese van non-essentiële aminozuren en acetyl-CoA is een voorloper voor de synthese van vetzuren, allemaal cruciale onderdelen voor deling, de belangrijkste eigenschap van iPSCs.

Gedurende de differentiatie moeten iPSC opnieuw *switchen*, om aan de vereisten van mesoderm, endoderm en ectoderm te voldoen. De mesodermale en endodermale kiemlagen maken gebruik van een OxPhos-afhankelijk metabolisme, zoals de meeste cellen in ons lichaam. Echter de ectodermale laag, die uiteindelijk zenuwen en de hersenen vormt, blijft glycolyse afhankelijk. Opmerkelijk is dat de vasculaire kiemlaag, een sub-laag van het mesoderm, opnieuw een metabole *switch* maakt, namelijk vanuit het oxidatieve mesoderm, terug naar een extreem hoge glycolyse nodig voor de functie als endotheel. Belangrijk daarbij is echter, dat de volwaardige mitochondriën wel blijven bestaan, echter als reservecapaciteit, nodig voor snelle groei in neovascularisatie.

Ondanks dat steeds meer studies de link tussen metabolisme en het lot van de cel beschrijven, is het mechanisme wat aan deze link ten grondslag ligt nog niet helemaal begrepen.

Dit proefschrift bediscussieert de rol van het metabolisme en de endotheelcel (EC) functies in de context van pluripotente stamcellen. Daarmee proberen we meer inzicht te creëren in de interactie tussen metabolisme en differentiatie en hoe dit gebruikt kan worden in de maturatie van cellen en weefsels gemaakt uit iPSCs.

Ondanks dat meerdere endotheelcel differentiatie protocollen zijn gepubliceerd, is de vraag over het level van maturatie en functionaliteit nog niet volledig beantwoord. Om maturatie van endotheelcellen uit iPSC (iPSC-ECs) te verwezenlijken en te gebruiken in complexere settings zoals transplantatie, vroegen we ons af hoe iPSC-EC reageren op een langdurige vloeistof stroom (nagebootste bloedstroom) welke door het celloppervlak wordt geregistreerd en pericyt co-kweek. In eerdere studies hebben beide factoren laten zien dat ze de functie van het endotheel verbeteren. Daarnaast waren we geïnteresseerd of iPSC-EC een glycocalyx maken, aangezien deze laag, bestaande uit hydrofiele suikers zoals heparan sulfaten en hyaluronan geankerd aan membraaneiwitten, het eerste contact is met bloedcellen. De glycocalyx reguleert de coagulatie, inflammatie en vasodilatatie/vasoconstrictie van een vat en is daardoor een van de belangrijkste, maar ook meest kwetsbaarste spelers in de fysiologie van het bloedvat. Recente studies van de onderzoeksgroep van Professor Rabelink hebben aangetoond dat het cellulaire metabolisme direct effect heeft op de glycocalyx formatie.

Samenvatting van dit proefschrift

In dit proefschrift beschrijven we de rol van het cellulaire metabolisme in de maturatie van iPSC-ECs. In **hoofdstuk 2** wordt de functionaliteit en het metabolisme van iPSC-EC vergeleken met de functionaliteit van primaire humane microvasculaire endotheelcellen (hMVEC) en endotheelcellen uit navelstreng vaten (HUVECs). Dit hoofdstuk geeft nieuwe inzichten in de mitochondriale dysfunctie van hiPSCs-EC, wat ervoor zorgt dat de ECs onvoldoende glycocalyx produceren. Vervolgens zorgt dit ervoor dat de bloedstroom niet goed 'gevoeld' kan worden. Hieraan ten grondslag ligt een open mitochondriale *permeability transition pore* (mPTP), wat zorgt voor mitochondriale immaturiteit en verhoogde productie van vrije radicalen (ROS). Door het sluiten van de mPTP tijdens de differentiatie met cyclosporine, dat bindt aan cyclophilin D van de mPTP, is het ons gelukt om volwaardige mitochondria te ontwikkelen. Daardoor verbetert de functionaliteit van de cellen, door minder productie van ROS en meer glycocalyx productie, wat zorgt voor een functionele 'voelingsapparaat' van bloedstroom, gemeten door de richting/opstelling van cellen in de bloedvatwand.

Hoofdstuk 3 bouwt voort op de vergelijking tussen iPSC en human endotheel, waarbij de nadruk ligt op *von Willebrand Factor* (VWF) en het opslag orgaan van VWF, de *Weibel Palade Bodies* (WPB). Na het testen van verscheidene protocollen kwamen we tot de conclusie dat hiPSC-EC geen mature WPB bevatten en onvoldoende VWF produceren. Met zeer gedetailleerde metingen van het metabolisme, door middel van *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy*, hebben we geconcludeerd dat hiPSC-EC naast immature mitochondriën ook verminderde glycolyse en lactaat productie hebben, met daardoor een verhoogde intracellulaire pH (pHi). Dit effect op de pHi werd versterkt door een reductie in expressie van de *proton coupled monocarboxylate transporter MCT1*, die H⁺ en lactaat transporteert, om zo de pHi van de cel in balans te houden. Verlagen van de intracellulaire pH leidde tot verhoogde aanwezigheid van functioneel VWF en maturatie van WPB in hiPSC-ECs.

In **hoofdstuk 4** diepen we het metabolisme van iPSC-EC verder uit, aangezien zowel de glucose oxidatie in mitochondriën als de glycolyse verlaagd is, waardoor we ons afvroegen hoe de iPSC-EC dan aan zijn energie (uitgedrukt in adenosine trifosfaat (ATP)) komt. Daarnaast bestuderen we hier hoe de iPSC-EC zijn redox-balans in stand houdt. Uit deze experimenten concluderen we dat de hiPSC-EC voornamelijk afhankelijk zijn van oxidatie van vrije vetzuren en waarschijnlijk NADPH gebruiken om de redox balans te compenseren aangezien verbranding van vetzuren voor veel vrije radicalen (ROS) leidt. Dit alternatieve metabole profiel ging samen met een erg hoge expressie van *transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha* (PGC1a), die de vetzuur opslag, het glucose metabolisme, vet opname en mitochondriale biogenese reguleert. Doordat PGC1a direct geactiveerd wordt door ROS, en de master regulator is van het metabolisme, zou de hoge levels van PGC1a ook een consequentie, in plaats van gevolg van het alternatieve metabole profiel van iPSCs kunnen zijn. Uit ons onderzoek bleek inderdaad ook, dat PGC1a de-activatie, de vetzuur verslaving van iPSC nog verder verhoogde.

In **hoofdstuk 5** bestuderen we de immunogeniteit van hiPSC-EC, omdat de rejectie van het immuunsysteem bij van transplantatie van niet eigen cellen een van de grootste limitaties is in het stamcel onderzoek en de translatie van stamcel onderzoek naar de kliniek. Eerdere studies suggereren dat herkenning van iPSCs door het host immuunsysteem lager is dan bij het transplanteren van volwassen cellen. Aan de andere kant, endotheel oppervlakte MHC-klasse 1 en 2 moleculen spelen een actieve en belangrijke rol in de volwassen immuniteit. Daarom hebben wij de hiPSC-EC oppervlakte immuuncomplexen met en zonder cytokine stimulatie in kaart gebracht. Bovendien hebben we getest, hoe de geobserveerde verschillen in expressie, de CD8 T-cel activatie beïnvloeden. Tot slot hebben we de expressie van complement

inhibitoren op het cel oppervlakte onderzocht, nodig voor de bescherming van endotheel tegen complement activatie in het bloed.

Hoofdstuk 6 bespreekt de gevonden bevindingen in context van de huidige literatuur en beschrijft toekomstperspectieven over de invloeden van metabolisme op de epigenetica. De diverse *switchen* in metabolisme laten keer op keer een stempel achter op de epigenetica van de cel en door nieuwe technieken binnen de *mass spectrometry*, zoals *mass spectrometry imaging*, kunnen we dit steeds beter in kaart brengen.