



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Modeling of the cardiac sympathetic nervous system and the contribution of epicardium-derived cells

Ge, Y.

Citation

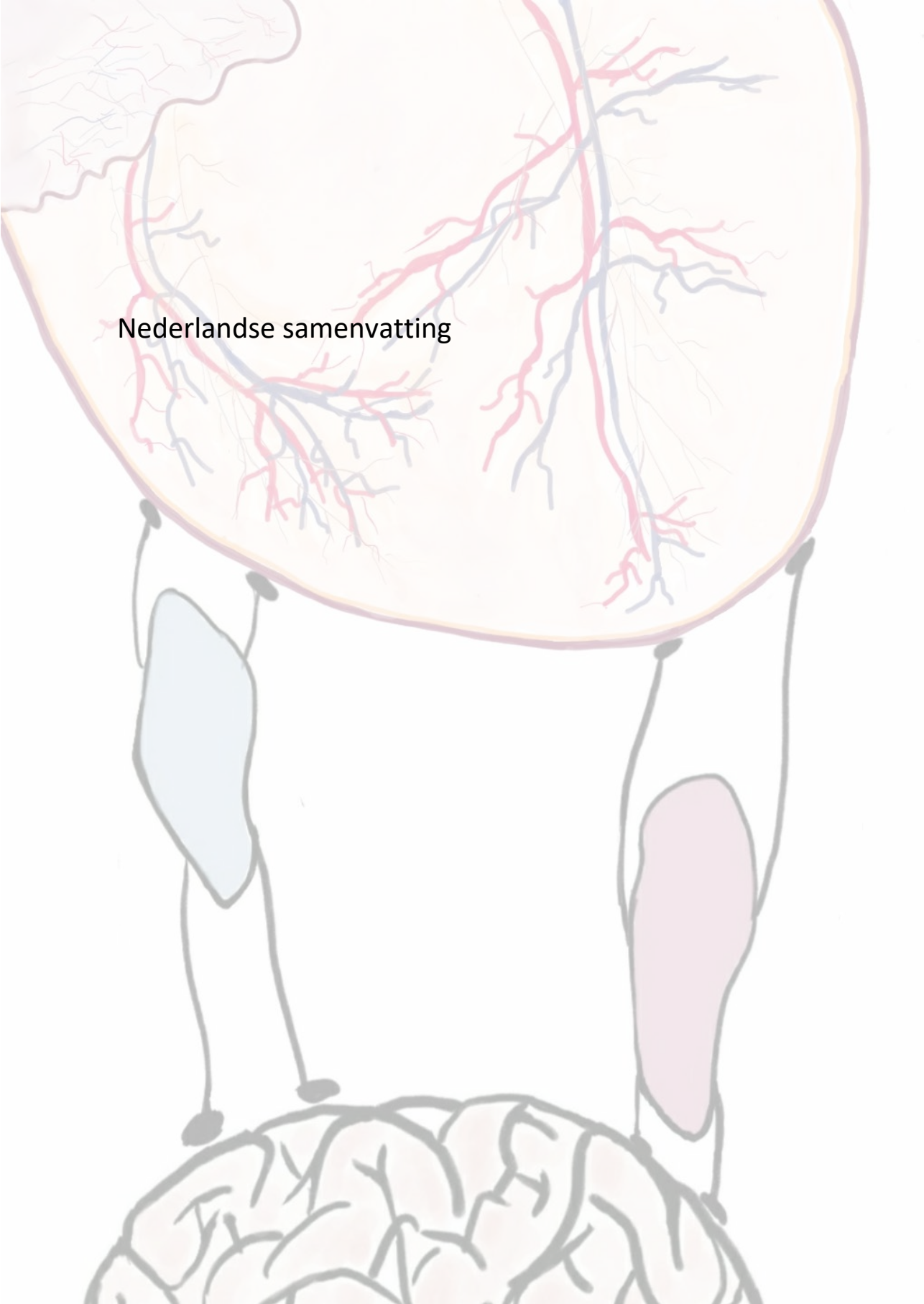
Ge, Y. (2021, December 15). *Modeling of the cardiac sympathetic nervous system and the contribution of epicardium-derived cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3247258>

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/1887/3247258>

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



A hand-drawn diagram of a brain cross-section. The brain tissue is light pink. The venous system is shown with red lines, branching from the surface into the interior. Blue lines represent the arterial system. At the bottom, the cerebellum is shown in a darker pink color. Two large, irregularly shaped structures, one light blue and one light pink, are connected to the brain by thin lines, representing the venous sinuses. The text 'Nederlandse samenvatting' is written in black, sans-serif font in the upper left quadrant of the brain area.

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

Ongeveer een derde van alle sterfgevallen wereldwijd wordt toegeschreven aan hart- en vaatziekten (World Health Organization 2017). Plotse hartdood is een significante uitdaging voor de volksgezondheid en wordt vaak geassocieerd met ischemische hartziekte. Plotse hartdood na een myocardinfarct (MI) wordt klassiek toegeschreven aan heterogene geleiding in het grensgebied van het infarct. Autonome hyperinnervatie (vooral sympathische hyperinnervatie) na MI is echter ook in verband gebracht met plotse hartdood in een toenemend aantal artikelen. Het hart wordt geïnnerveerd door het autonome zenuwstelsel, dat kan worden onderverdeeld in een sympathische en een parasympatische component. De balans tussen cardiale sympathische en parasympatische innervatie is van cruciaal belang voor het behoud van een normale hartfunctie. Overmatige sympathische activatie kan pro-aritmogeen zijn. Post-MI hyperinnervatie is meestal geassocieerd met een toename van sympathische zenuwen, hetgeen is beschreven bij zowel mensen als in diermodellen. Dit fenomeen van post-MI sympathische hyperinnervatie heeft geleid tot een groeiend bewustzijn van de belangrijke rol van pathologische innervatiepatronen in aritmogenese, echter de onderliggende mechanismen zijn nog onduidelijk.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene inleiding van het proefschrift gegeven. Het hart is een zelf exciterend orgaan dat is opgebouwd in drie lagen, van buiten naar binnen: het epicardium, het myocardium en het endocardium. Hoewel de buitenste laag, het epicardium, slechts een dunne laag cellen is, speelt het een essentiële rol bij de ontwikkeling van het hart. Tijdens de ontwikkeling kunnen van epicardium afgeleide cellen (EPDCs) migreren naar de subepicardiale ruimte en differentiëren in verschillende hartceltypen. Bovendien hebben ze het vermogen om de myocardiële groei en coronaire vaatpatronen te beïnvloeden via paracrine effecten. Het cardiale autonome zenuwstelsel, zoals hierboven beschreven een ander cruciaal element van een functioneel hart, reguleert de hartslag, contractiekracht en atrioventriculaire geleidingssnelheid om de functie van het hart aan verschillende omstandigheden aan te passen. In dit inleidende hoofdstuk worden de ontwikkeling van het epicardium en het cardiale autonome zenuwstelsel geïntroduceerd, evenals hun dynamische veranderingen tijdens hartziekten, zoals MI.

In **Hoofdstuk 2** wordt de rol van EPDCs in het bevorderen van cardiale sympathische re-/hyperinnervatie na hartschade *in vitro* toegelicht. Sympathische ganglia werden samen gekweekt met mesenchymale EPDCs en/of myocardium, en de uitgroei van neurieten en de dichtheid van zenuwuitlopers werden beoordeeld. Een significante toename in neurietdichtheid en een directionele (d.w.z. naar het myocardium toe) uitgroei werd waargenomen wanneer ganglia samen werden gekweekt met een combinatie van EPDCs en myocardium, in vergelijking met kweken met EPDCs of myocardium alleen. Het bevorderende

effect van mesenchymale EPDCs op de uitgroei van sympathische neurieten via paracrine signalering werd bevestigd door het kweken van PC12-cellen in geconditioneerd EPDC-medium. Eveneens werd in deze studie een rol van NGF, Endothelin-1 en SEMA3A in dit proces aangetoond.

In **Hoofdstuk 3** werd de invloed van het geslacht van de donor van de EPDCs op cardiale sympathische innervatie bestudeerd. Co-culturen werden uitgevoerd van sympathische ganglia met myocardium en geactiveerde EPDCs. Combinaties van zowel mannelijke als vrouwelijke cellulaire componenten werden in de co-culturen opgenomen om de sekse-impact op cardiale sympathische re-/hyperinnervatie *in vitro* op te helderen. De belangrijkste bevindingen waren: i) EPDCs bevorderen de uitgroei van sympathische neurieten *in vitro* en bevorderen de directionele uitgroei van neurieten naar het myocardium; ii) In aanwezigheid van EPDCs vertonen mannelijke sympathische ganglia een hogere cardiale sympathische uitgroei dan vrouwelijke ganglia; iii) Mannelijke EPDCs in een vrouwelijke setting kunnen de uitgroei van cardiale sympathische neurieten verhogen tot een niveau dat vergelijkbaar is met het niveau van uitgroei in een volledig mannelijke omgeving. Tot slot werd de SLIT2/ROBO-pathway voorgesteld als een potentiële kandidaat die deze differentiële bevindingen in mannelijke en vrouwelijke EPDCs beïnvloedt. De bevindingen in dit hoofdstuk ondersteunen de mogelijke relevantie van sekseverschillen bij post-MI cardiale hyperinnervatie. Deze gegevens suggereren ook dat er rekening dient te worden gehouden met geslacht bij eventuele injectie van cellen voor celtherapie bij mannelijke en vrouwelijke patiënten.

In **Hoofdstuk 4** werd een polyclonale lijn van induceerbare proliferatieve humane EPDCs (iEPDCs) opgezet om *in vitro* onderzoek met EPDCs te vergemakkelijken, zoals het onderzoeken van het mechanisme van hun invloed op cardiale sympathische uitgroei. Induceerbare proliferatie werd bereikt door doxycycline-gecontroleerde expressie van simian virus 40 large T antigen (LT) met een op repressie gebaseerd lentiviraal Tet-On-systeem. Na verwijdering van doxycycline stopte de LT-expressie en kregen de iEPDCs hun kubusvormige epitheliale morfologie terug en konden ze epitheliale-naar-mesenchymale overgang (EMT) ondergaan na stimulatie met transforming growth factor β 3, vergelijkbaar met primaire EPDCs. Dit werd bevestigd door RT-qPCR-analyse en (immuun)cytochemische kleuringen. Invasie-tests op een collageengel toonden aan dat mesenchymale iEPDCs, zoals primaire EPDCs, verhoogde invasie- en migratiecapaciteiten bezitten in vergelijking met hun epitheliale tegenhangers. Bovendien stimuleerden mesenchymale iEPDCs de uitgroei van sympathische neurieten op dezelfde manier als primaire EPDCs. Dit maakt iEPDCs tot een zeer nuttig nieuw model voor het bestuderen van menselijke epicardiale eigenschappen *in vitro*.

Sympathische hyperinnervatie na een MI wordt meestal in verband gebracht met een toename van de sympathische zenuwen die ontspruiten uit sympathische cardiale ganglia. In

Hoofdstuk 5 werd het remodeleringsproces van cardiale sympathische ganglia na MI onderzocht. De superior cervicale ganglia (SCG), gelegen naast het carotislichaampje, dragen bij aan de cardiale ventriculaire sympathische innervatie. Remodelering van SCG op 24 uur, 3 dagen, 7 dagen en 6 weken na MI werd onderzocht met behulp van histologische evaluatie. SCG-remodelering werd al 24 uur na het infarct waargenomen, met een piek op dag 7, waarna binnen 6 weken na MI het uitgangsniveau weer bereikt werd. De remodelering ging gepaard met een significante toename van de neuron grootte en een verminderde intensiteit van ChAT-expressie. Bovendien werd de meest robuuste neuronale remodelering waargenomen in de regio naast de carotislichaampje met een toename van expressie van neurotrofe factoren ter plaatse. Bovendien namen receptoren met hoge affiniteit voor BDNF en NGF toe in de SCG na MI. We concludeerden dat evidente remodelering optreedt in zowel de SCG als in het carotislichaampje, wat een interactie suggereert van deze 2 structuren na MI, die zou kunnen bijdragen aan pathologische cardiale hyperinnervatie.

In **Hoofdstuk 6** wordt een methode beschreven voor het isoleren van kernen uit een lage hoeveelheid cellen, voor single-nucleus RNA sequencing. Er wordt een stapsgewijze benadering gepresenteerd die het potentieel heeft voor een brede toepassing, onder andere bij het bestuderen van de genetische paden die betrokken zijn bij de innervatie van andere organen en weefsels.

Hoofdstuk 7 past de in Hoofdstuk 6 beschreven methode toe om SCG-remodelering na MI te onderzoeken met behulp van single nucleus RNA sequencing technologie (snRNA-seq). snRNA-seq werd uitgevoerd in SCG van gezonde muizen, waardoor een model van de cellulaire samenstelling van de SCG kon worden gecreëerd. De moleculaire kenmerken van neuronale en satelliet-gliacellen in een gezonde uitgangssituatie werden geïdentificeerd, en zullen verder worden gebruikt voor onderzoek in ziektemodellen in toekomstige studies.

In **Hoofdstuk 8** werd de huidige morfologische kennis met betrekking tot de bijdrage van de SCG aan de cardiale innervatie systematisch gereviewed, zowel in gezonde als in ziektemodellen in dier en de mens. Dit hoofdstuk omvat tevens een algemene discussie met betrekking tot het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd.