



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Using human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to understand genetic variant pathogenicity in the ion channelopathy LQT2

Brink, A.H. van den

Citation

Brink, A. H. van den. (2022, September 1). *Using human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to understand genetic variant pathogenicity in the ion channelopathy LQT2*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3454737>

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/1887/3454737>

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

Nederlandse samenvatting

Een van de grootste uitdagingen in het bepalen van behandelmethoden voor patiënten met monogene erfelijke hartziekten is de enorme variatie in de ernst van de ziekteverschijnselen. Alhoewel gesuggereerd wordt dat verschillende genetische mutaties (*varianten*) verschillende rollen kunnen spelen bij de totstandkoming van de ziekte, is de pathogeniteit van varianten veelal alleen bestudeerd met behulp van conventionele, gelimiteerde, cellulaire modellen zoals heterologe expressiesystemen of diermodellen die niet alle aspecten van de menselijke (*humane*) fysiologie van het hart nabootsen. Een revolutionaire ontdekking in 2007 heeft het mogelijk gemaakt om humaan geïnduceerde pluripotente stamcellen (hiPSCs) te maken door het reprogrammeren van somatische cellen afkomstig van huid, bloed of urine. Spoedig na deze ontdekking heeft men succesvol humane hartspiercellen (*cardiomyocyten*) vanuit hiPSCs (hiPSC-CMs) weten te ontwikkelen (*differentiëren*). Over de jaren heen zijn hiPSC-CMs gevalideerd als een meer fysiologisch relevant cellulair model geschikt om fundamentele eigenschappen (het *fenotype*) van genetische varianten die geassocieerd zijn met hartziekten te reproduceren. Recente ontwikkelingen in genetische modificatie technieken hebben het mogelijk gemaakt om genotype-fenotype correlaties vast te stellen van varianten door genetisch identieke hiPSC lijnen, met uitzondering van de betreffende genetische variant, met elkaar te vergelijken.

Een voorbeeld van een erfelijk aangeboren hartafwijking is het lange-QT-syndroom type 2 (LQT2). LQT2 is een van de meest voorkomende typen van LQTS wat naar schatting bij 1 op de 2.000 mensen voorkomt. Kenmerkende symptomen voor patiënten met LQT2 zijn hartkloppingen, duizeligheid en flauwvallen en in het uiterste geval een plotselinge dood. Karakteristieke afwijkingen in een hartonderzoek zijn een verlengde QT interval op een electrocardiogram (ECG) en mogelijk een hartritme stoornis (*aritmie*) tijdens een inspanningstest. De QT verlenging is een gevolg van de verlenging van de repolarisatiefase in cardiomyocyten.

Qua ziekteverschijnselen varieert de erfelijke LQT2 van volledige afwezigheid van symptomen tot episodes van levensbedreigende aritmieën. Inzicht in de genetische etiologie zou de klinische besluitvorming bevorderen en kunnen voorzien in aangrijpingspunten voor het ontwikkelen van meer specifieke, gepersonaliseerde medicatiestrategieën. Het doel van deze dissertatie is tweeledig: 1) het valideren van technische procedures om hiPSC-CMs in te vriezen en op te slaan

om daarmee gebruiksgemak en distributie tussen laboratoria te faciliteren en 2) het onderzoeken van genetische variant pathogeniteit en de variatie in ziekte-uitingen in genetisch gematchte hiPSC-CM modellen met LQT2-geassocieerde varianten.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie op de dissertatie. De elektrofysiologie van elke cardiomyocyt in een gezond volwassen hart wordt nauwkeurig geregisseerd door meerdere ionkanalen en eiwitten. Mutaties in deze ionkanalen of eiwitten kunnen leiden tot erfelijke vormen van aritmogene hartziekten die geassocieerd zijn met een disbalans in de elektrofysiologie. hiPSC-CMs worden steeds vaker ingezet om fenotypische uitingen, zoals veranderingen in de elektrofysiologie, van genetische varianten te bestuderen. Dit betreft ook varianten waarvan de significantie nog onbekend is (*variants of unknown significance*). Op deze manier kunnen hiPSC-CMs inzicht verschaffen in de variabiliteit in ziekte-uitingen en werkingsmechanismen. Tot slot worden in dit hoofdstuk verschillende meetsystemen uiteengezet waarmee de essentiële elektrofysiologische- en samentrekkingskarakteristieken van cardiomyocyten kunnen worden gedetecteerd.

Hoofdstuk 2 blikt terug, beschrijft het heden en kijkt vooruit hoe hiPSC-CMs bijdragen aan het verder inzichtelijk maken van de onderliggende mechanismen van monogene hartziekten zoals primaire aritmie en cardiomyopathie. Dit hoofdstuk heeft als doel de ontwikkeling van gepersonaliseerde therapieën voor de individuele patiënt te bevorderen en te stimuleren in het onderzoeksveld.

In **Hoofdstuk 3** worden methodes voor het invriezen van hiPSC-CMs beschreven waarbij wordt bewezen dat na ontdooien zowel de moleculaire als functionele karakteristieken van de cellen behouden blijven. Invriezen van grote hoeveelheden identieke hiPSC-CM batches zijn essentieel voor het aangaan van biomedische uitdagingen zoals het verhogen van de reproduceerbaarheid van hiPSC modellen, het distribueren van cellen tussen laboratoria en het implementeren van hiPSC modellen in grote *screenings* van kandidaat-geneesmiddelen.

Een bepalende factor voor de verschillen in risico op aritmie in LQT2 patiënten is de locatie van de mutatie in het *KCNH2* gen. Het *KCNH2* gen codeert voor het ionkanaal, hERG, dat kaliumionen uit cardiomyocyten pompt tijdens de repolarisatiefase. Deze uitstroom van kaliumionen wordt ook wel de '*rapid delayed rectifier potassium current*' (I_{Kr}) genoemd. **Hoofdstuk 4** toont aan dat genetisch gematchte hiPSC-CMs verschillen kunnen laten zien in fenotypische uitingen afhankelijk van de locatie van de *KCNH2*-mutatie. hiPSC-CMs met mutaties in de porie van het ionkanaal laten niet alleen een meer verlengde repolarisatie zien, maar ook een hogere gevoeligheid voor pro-aritmie ten opzichte van hiPSC-CMs met mutaties in het cytoplasmatische deel van het ionkanaal of ongemuteerde, "controle", hiPSC-CMs.

Een ander aspect van de klinische variatie in LQT2 patiënten is de mogelijke bijdrage van additionele genetische varianten zoals de veel voorkomende enkel-nucleotide polymorfismes (SNPs). In **Hoofdstuk 5** wordt bestudeerd of de impact van SNPs gedetecteerd kan worden met behulp van hiPSC-CMs. De resultaten laten zien dat de positie van de KCNH2-K897T SNP ten opzichte van de LQT2 causale mutatie (in dezelfde allel, *cis* versus in de tegenovergestelde allel, *trans*) invloed heeft op de biofysische eigenschappen van het I_{Kr} kanaal, de verlenging van de repolarisatiefase en de mate van aritmieverschijnselen geïnduceerd door farmacologisch actieve stoffen.

Hoofdstuk 6 geeft meer inzicht in de elektrofysiologische impact van een compound heterozygote *KCNH2*-mutatie (twee LQT2 causale mutaties) die voor kan komen in LQT2 patiënten met ernstige ziekteverschijnselen. Het totaal aantal hERG kanalen in hiPSC-CMs met een missense-mutatie in het ene allel en een frameshiftmutatie in het andere allel (compound heterozygoot) was nihil ten opzichte van de genetisch gematchte heterozygote hiPSC-CMs. Dit resulteerde in een verdere afname in de dichtheid van I_{Kr} , gedepolariseerde diastolische membraanpotentiaal en een veranderd actiepotentiaalprofiel. Deze verslechtering van het elektrofysiologisch fenotype suggereert dat er mogelijk verschillen zijn in pathogeniteit en werkingsmechanismen tussen diverse variaties en combinaties van *KCNH2* mutaties.

Tot slot worden in **Hoofdstuk 7** de resultaten van deze dissertatie bediscussieert en worden voorstellen gedaan voor verdere optimalisaties van hiPSC-CM-ziektemodellen zodat er een brug geslagen kan worden tussen betere risicostratificaties aan de ene kant en patiënt-specifieke medicijnstrategieën aan de andere kant.

