



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Developmental cell lineage dynamics in Bicuspid Aortic Valve disease

Peterson, J.C.

Citation

Peterson, J. C. (2022, September 13). *Developmental cell lineage dynamics in Bicuspid Aortic Valve disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3455679>

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/1887/3455679>

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

Nederlandse Samenvatting

Het hart is een orgaan dat de mens in leven houdt door bloed in het lichaam rond te pompen. In het hart bevinden zich diverse hartkleppen die ritmisch openen en sluiten bij iedere hartslag. Deze hartkleppen zorgen ervoor dat het bloed op één manier door het hart kan stromen, vanuit de instroom van het hart via de boezems, naar de uitstroom van het hart via de hartkamers, richting de grote slagader van het lichaam (aorta) en de longslagaders. Om te voorkomen dat het bloed van de aorta terug het hart in stroomt is er de aortaklep. De aortaklep heeft drie klepslippen; deze klep wordt daarom ook wel de *'tricuspid aortic valve'* genoemd (tri = drie cusp = slijp aortaklep, TAV). Het grootste deel van de Nederlandse bevolking wordt geboren met een TAV (98-99%), maar er zijn ook mensen die met een bicuspide aortaklep (BAV) ter wereld komen. De BAV is een aangeboren hartafwijking die wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van twee klepslippen in de aortaklep in plaats van de gebruikelijke drie klepslippen.

BAV-patiënten hebben een hoger risico op medische complicaties zoals het optreden van aortaverwijding, dissectie en verkalking van de aortaklep. Het ziekteverloop van deze patiënten verschilt onderling sterk. Sommige patiënten hebben vrijwel geen medische klachten, terwijl er bij andere patiënten ingrijpende operaties moeten worden uitgevoerd. Deze grote variatie in het ziektebeeld van BAV maakt het vanuit klinisch oogpunt uitermate lastig om patiënten de juiste zorg aan te kunnen bieden. Om van te voren het ziekteverloop van een patiënt beter in te kunnen schatten, is er meer kennis nodig van de biologische processen die BAV veroorzaken. Deze kennis kan bijdragen aan een betere profilering van patiënten waardoor er beter kan worden geanticipeerd op toekomstige aandoeningen van de aorta (aortopathie). Dit proefschrift vergroot de kennis die we hebben over de vorming van de bicuspide aortaklep en de BAV-gerelateerde aortopathie.

Hoofdstuk 1 geeft achtergrondinformatie over de gevolgen van BAV, aortopathie, de embryologische ontwikkeling van het hart en de rol van cel populaties die betrokken zijn bij de vorming van het cardiale uitstroomkanaal. Deze informatie is relevant om het ontstaan van BAV beter te begrijpen. Hoofdstuk 1 bevat ook een overzicht van alle hoofdstukken in dit proefschrift.

Hoofdstuk 2 is een literatuurstudie over de ontwikkeling van *'cell tracing'* en *'fate mapping'* methoden die worden gebruikt bij onderzoek naar embryonale ontwikkeling. Veelvoorkomend bij aangeboren hartaandoeningen die het cardiale uitstroomkanaal (OFT) beïnvloeden, zoals

BAV, is de grote variatie in fenotypes. Om het OFT te bestuderen zijn verschillende technieken ontwikkeld om cel populaties te volgen tijdens de ontwikkeling van een embryo. Ondanks onze huidige kennis blijft het een grote uitdaging om de cel dynamiek te relateren aan de fenotypische variatie die wordt waargenomen bij aangeboren afwijkingen. De nieuwe technologieën die dit hoofdstuk voorstelt, bieden meer mogelijkheden om deze cellulaire dynamiek in detail te bestuderen.

Hoofdstuk 3 behandelt een veel voorkomend methodologisch probleem van cellulaire metingen. Veel biologische studies tellen specifieke cellen in een weefselmonster of een in vitro celkweek om zo iets te kunnen zeggen over het cel gedrag. Er zijn daarom talloze methoden ontwikkeld om cellen te kwantificeren, variërend van handmatig cellen tellen tot geautomatiseerde beeldanalyse. ImageJ is een populaire tool waarmee onderzoekers softwarescripts kunnen ontwikkelen voor geautomatiseerde beeldanalyse. Om betrouwbare beeldanalyses uit te voeren, is het essentieel om data te genereren die inzicht geeft in de kwaliteit van de analyse: metadata. Dit soort metadata is belangrijk omdat het de reproduceerbaarheid van een experiment waarborgt. Momenteel wordt er nog te weinig aandacht besteed aan het verzamelen van metadata bij beeldanalyse. Om het verzamelen van metadata te vergemakkelijken en het belang daarvan te benadrukken, hebben wij binnen ImageJ een script ontwikkeld dat hier een oplossing voor biedt. Dit script helpt onderzoekers bij het implementeren van zogenoemde 'good-research practises' tijdens het uitvoeren van hun beeldanalyse.

In **Hoofdstuk 4** onderzoeken we de ontwikkeling van BAV met behulp van het *Nos3* mutante muismodel. Met hulp van dit muismodel kan er gekeken worden of de embryonale bijdrage van verschillende cel populaties afwijkend is tijdens de vorming van BAV. Om deze cel populaties beter in kaart te brengen zijn cell lineage tracing-experimenten uitgevoerd. Met deze experimenten bestuderen wij de bijdragen van diverse celtype gedurende de ontwikkeling van het hart. Tijdens deze studie is met behulp van microscopische beeldvorming en 3D-reconstructies een nieuw beeld gevormd over de ontwikkeling van aortakleppen. Met behulp van deze benadering is vastgesteld dat *Nos3* mutante embryo's een BAV ontwikkelen door een onvolledige scheiding van het pariëtale uitstroomkussen. Deze onvolledige scheiding ontwikkelt zich in een bicuspidale aortaklep waarbij de rechter en de niet-coronaire klep gefuseerd blijven. De klepslippen in de aortaklep zijn opgebouwd uit unieke verhoudingen van bepaalde cellijnen. De *Nos3* mutante embryo's hadden een afwijking in neurale lijstcellen en tweede hartveldcellen. Deze afwijking beïnvloedt de vorming van de hartkleppen, waarbij

de klepvorming zodanig kan worden verstoord dat er een BAV ontstaat.

Uit klinische studies is gebleken dat patiënten met BAV een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van aortopathie. In **Hoofdstuk 5** worden deze risico's in het *Nos3* mutante muismodel bestudeerd. Om afwijkingen in de aorta van de muizen te bekijken, gebruikten we een combinatie van histologische onderzoeksmethoden en echografie. We ontdekten spontane aortadissecties in ~13% van de *Nos3* mutante muizen. Daarnaast zagen we ook verwijdingen van de aorta optreden in deze muizen. Om deze verwijdingen van de aorta te verklaren, onderzochten we het gehalte aan elastische vezels en collageen in de aortawand met behulp van klassieke histologische kleuringen. De aortawanden van *Nos3* mutante bevatten minder elastine dan de aortawanden van wildtype muizen (zonder mutaties). Hierdoor zou de vaatwand minder rekbaar zijn in de *Nos3* mutante muizen. Uit de kleuringen bleek ook dat de aorta vaatwand voornamelijk is opgebouwd uit cellen die zijn afgeleid van de neurale lijst en het tweede hartveld. *Nos3* mutante muizen hadden een verminderde bijdrage van neurale lijst afgeleide cellen aan de aorta vaatwand. Met behulp van de laatste ontwikkelingen in genetische analyses vergeleken we de genexpressieprofielen van de aorta vaatwandcellen tussen wildtype muizen en *Nos3* mutanten. Hierbij vonden we een verminderde expressie van 15 genen. Van deze genen zijn er 7 geassocieerd met aortadilatatie en dissecties in de mens. Van alle 15 genen was elastine-mRNA het meest gereduceerd in expressie, gevolgd door een verlaagde fibuline-5-expressie. Elastine en fibuline-5 vormen beide primaire componenten voor de structuur van de aorta vaatwand. Dit hoofdstuk laat zien dat een verstoring in neurale lijst afgeleide vaatwandcellen leidt tot een verminderde rekbaarheid van de aorta vaatwand waardoor er aortaverwijding en dissectie kan optreden in de *Nos3* mutante muizen.

Hoofdstuk 6 beschrijft de rol van embryonale cellijnen tijdens de ontwikkeling van de linker longslagader. Hiervoor zijn resultaten van menselijke embryo's vergeleken met VEGF120/120 mutante muismodel embryo's, omdat in deze muizen de pulmonalisklep en de linker longslagader niet goed ontwikkelingen. Het muismodel toont aan dat de groeistoornis in de pulmonalisklep en de afwijkingen in de linker longslagader het resultaat zijn van een verminderde bijdrage van de tweede hartveldcellen. Deze afwijking in het tweede hartveld heeft als gevolg dat de neurale lijst en het tweede hartveld niet goed op elkaar aansluiten tijdens de ontwikkeling van de linker longslagader. Door de verminderde bijdrage van de tweede hartveld afgeleide cellen kunnen de neurale lijst afgeleide cellen een overmaat aan weefsel aanmaken binnen de linker longslagader. Dit 'overtollig' weefsel leidt tot een vernauwing van de linker longslagader. De ontwikkeling van de linker longslagader is dus

afhankelijk van een goede samenwerking tussen cellen van de neurale lijst en het tweede hartveld. Bij de behandeling van patiënten is het daarom noodzakelijk om dit 'overtollige' neurale lijstweefsel te verwijderen. Het verwijderen van het neurale lijstweefsel zal namelijk leiden tot minder complicaties voor de patiënt dan een alternatieve ingreep.

Hoofdstuk 7 bevat een algemene discussie over de uitdagingen en limitaties van het BAV-onderzoek. Het hoofdstuk richt zich op de gevolgen van de genetische aanleg van BAV-gerelateerde complicaties en stelt ook de toepassing van nieuwe wetenschappelijke technieken ter discussie. Nieuwe vooruitzichten die in grote mate bij kunnen dragen aan nieuwe ontdekkingen rondom cardiovasculaire ontwikkeling en BAV, worden belicht.

