



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Application of in-silico and in-vitro optogenetic tools to cardiac arrhythmia research

Teplenin, A.

Citation

Teplenin, A. (2024, June 13). *Application of in-silico and in-vitro optogenetic tools to cardiac arrhythmia research*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3762949>

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/1887/3762949>

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

**SAMENVATTING
LIST OF PUBLICATIONS
ACKNOWLEDGEMENTS
CURRICULUM VITAE**

Samenvatting

HOOFDSTUK I, de algemene inleiding van dit proefschrift, begint met de beschrijving van de algemene mechanismen van hartritmestoornissen en van de computationele modelleringstools om deze mechanismen te bestuderen. Vervolgens worden recente optogenetische studies belicht die gewijd zijn aan het verdiepen van het mechanistische begrip van hartritmestoornissen. **Hoofdstuk II** beschrijft de fundamentele en klinisch relevante hypothese van "gevangen" reentry golven (trapped reentry). Deze hypothese is bewezen door in-vitro en in-silico optogenetica-experimenten die bevestigd worden door volledige 3D-anatomische modellering van menselijke voorkamer boezems. In dit hoofdstuk hebben we laten zien dat regio's met dicht opgepakte fibrose niet-geleidende paden kunnen vormen waar reentry kan ontstaan door ectopie en "gevangen" raakt door een lokale geleidingsblokkade. Lichtgestuurde depolariserende ionkanalen en patroonverlichting werden gebruikt om dergelijke niet-geleidende routes in silico en in vitro na te bootsen. We hebben aangetoond dat een reentry hartritmestoornis die in een niet-geleidend pad gevangen is, kan samengaan met normaal sinusritme in het omliggende weefsel. We hebben ook aangetoond dat door een verandering in gap junctional of natrium-ionkanaal geleiding, de reentry golf kan ontsnappen uit het niet-geleidende pad, waardoor een lokale slapende bron van hartritmestoornissen kan transformeren in een globale aandrijver van een hartritmestoornis. In **hoofdstuk III** werd het genereren van ectopische golven door het creëren van oxidatieve schade in een hartweefselmodel bestudeerd met behulp van miniSOG, een kleine, door licht geactiveerde singlet-zuurstofgenerator. Dit leidde tot het nieuwe mechanistische inzicht dat ectopische golven bij voorkeur voortkomen uit convexe, sterk gekromde gebieden (bijvoorbeeld hoeken) van het beschadigde gebied, een resultaat dat in silico werd gereproduceerd. Deze bevindingen tarten een algemeen aanvaard paradigma voor golfvoortplanting, dat stelt dat golven niet vanuit hoeken maar vanuit het midden van een weefselgebied zouden moeten ontstaan. Met behulp van een semi-analytische analyse en door een wiskundige analogie te trekken uit de kwantummechanica, ontdekten we dat gebieden met hoge kromming zich lenen voor oscillerende instabiliteit in de overgangszone tussen normaal en gedepolariseerd weefsel. Deze oscillaties overwinnen de passieve elektrische lading van het omringende normale weefsel en genereren uitgaande ectopische golven. Vanwege de algemeenheid van ons computermodel zouden we verwachten dat vergelijkbare effecten worden gevonden in andere gebieden van de biologie, scheikunde en natuurkunde. Hoewel we het fenomeen hebben gereconstrueerd in complexe gedetailleerde modellen, hebben we in ons onderzoek bewust de nadruk gelegd op een vereenvoudigd computermodel om het effect te koppelen aan de meest fundamentele eigenschappen van cardiale excitatie en om een wiskundige analyse van de dynamiek uit te voeren. Het is ook belangrijk om te benadrukken dat het bovengenoemde mechanisme puur collectief is en niet kan worden verklaard door

typische eencellige mechanismen van ectopische activiteit, zoals vroege of vertraagde afterdepolarisaties. In **hoofdstuk IV** wordt een ander puur collectief fenomeen van frequentieafhankelijke overgang naar ectopische activiteit beschreven. Om dit in vitro aan te tonen, hebben we experimenten uitgevoerd in monolagen van neonatale ventriculaire cardiomyocyten (NRVMs) van ratten die het lichtgevoelige depolariserende ionkanaal CheRiff tot expressie brengen. Dit kanaal werd gebruikt om verschillende niveaus van depolarisatie te bereiken binnen een klein gebied van een monolaag. Door dit te doen, observeerden we een bifurcatiepatroon in de overgang naar ectopische activiteit en vorderen we een gedetailleerde experimentele analyse uit van het begin van ectopische activiteit onder puntsgewijze periodieke externe stimulatie. De externe stimulatie bootst periodieke excitatiegolven na die afkomstig zijn van de sinusknoop. Afhankelijk van het stimulatiepatroon, ontdekten we dat ons systeem fasen van bistabiliteit onderging (met overgangen tussen een (niet-aritmische) rusttoestand en ectopische activiteit) en multistabiliteit (met overgangen tussen een (niet-aritmische) rusttoestand, aanhoudende ectopische activiteit en voorbijgaande ectopische activiteit). De mogelijkheid om over te gaan naar ectopische activiteit hing op een resonante manier af van de frequentie van externe stimulatie, d.w.z. overgangsfrequenties vormen een continue band in het spectrum waarin stimulatie van lagere of hogere bandfrequenties geen ectopie induceert. Deze resultaten werden in silico gereproduceerd in een gedetailleerd fysiologisch model om grondig onderzoek te doen naar de betrokken mechanismen. In het bijzonder hing het begin van ectopische activiteit af van de combinatie van de mate van optogenetische depolarisatie en het aantal en de frequentie van de golven die zich door het weefsel voortplantten. Als gevolg van het resonantieverschijnsel vonden we zowel in silico als in vitro dat aanhoudende ectopische activiteit ook kan worden geëlimineerd door externe stimulatie hoger dan de resonantiefrequentie. Om onze resultaten te generaliseren, waren we in staat om alle verschijnselen met betrekking tot het gedetailleerde fysiologische model te reproduceren in een vereenvoudigd reactie-diffusiesysteem met drie variabelen. Hierdoor konden we een algemeen mechanisme voorstellen dat het resonantieverschijnsel verklaart als de koppeling tussen een exciteerbaar en een monostabiel gebied van het medium. Hier, in de fenomenologische taal van exciteerbare systemen, modellerde het monostabiele gebied het optogenetisch gedepolariseerde gebied in in-vitro-experimenten en kwam het exciteerbare gebied overeen met het niet-gedepolariseerde deel. De opkomst van ectopische activiteit vereiste accumulatie van meerdere golven om de overgangsdrempel te overschrijden, waardoor lagere frequenties werden uitgesloten. Het afsnijden van hoge frequenties was een gevolg van een afname van de golfamplitude in de monostabiele zone en activering van amplitudegevoelige dynamiek in de monostabiele eenheden. Deze amplitudegevoelige dynamiek wordt verklaard door het fenomeen van "verborgen" bistabiliteit, dat door ons in dit hoofdstuk wordt geïntroduceerd. "Verborgen" bistabiliteit is een nieuw algemeen fenomeen in exciteerbare systemen. Het maakt het gelijktijdig bestaan mogelijk van een exciteerbaar en bistabiel regime in een exciteerbaar element (enkele cel). Conversie tussen de regimes hangt af van de amplitude van externe stimulatie. Het fenomeen van "verborgen" bistabiliteit hangt niet af van de precieze details van het systeem, waardoor een brede toepasbaarheid van collectieve resonantiemechanismen wordt gegarandeerd.

Ten slotte was **hoofdstuk V** gewijd aan de beschrijving van vezelmeshes van recombinante analogen van spinnen-eiwitten, spidroïnen, als een platform voor hartweefsel engineering. In dit hoofdstuk hebben we laten zien dat NRVMs zich in principe kun-

nen hechten aan 3 verschillende soorten recombinante spidroïneconstructies zonder dat er extra hechtingsfactoren zoals fibronectine nodig zijn. NRVMs kunnen groeien en samenvloeiende celvellen vormen op spidroïne-meshes, ondanks het feit dat het aantal hartspiercellen dat aan drie verschillende soorten spidroïne-meshes hechtte 10%, 60% en 50% lager was dan het aantal hartspiercellen dat hechtte aan met fibronectine gecoat glas en met fibronectine gecoat vezelige polycaprolacton meshes. De aanwezigheid van fibronectine-gerelateerde RGDS-motieven verbeterde alleen de initiële hechting van de cellen aan de spidroïne-meshes, terwijl de functionele en morfologische eigenschappen van de cellulaire constructen na 3-5 dagen kweken niet meer van elkaar te onderscheiden waren. Dit werd gezamenlijk bewezen door immunostaining, optisch mappen en fasecontrastmicroscopie. De laatstgenoemde techniek toonde coherentie van de samentrekkingen door het weefselblad en demonstreerde daarmee een belangrijke eigenschap van goed functionerend hartweefsel, d.w.z. gecoördineerde samentrekking. Het optisch in kaart brengen van excitatiegolven bewees verder dat de cellen die op spidroïne-mazen zijn gegroeid, een functioneel syncytium vormen, waar elektrische excitatiepulsen uniform reizen en daaropvolgende samentrekkingen coördineren.

In conclusie tonen de studies gepresenteerd in dit proefschrift de kracht aan van het combineren van in-silico studies en theorie met in-vitro experimenten om het begrip van de mechanismen van hartritmestoornissen in het bijzonder en het functioneren van exciteerbare media in het algemeen te vergroten. Optogenetica diende als een belangrijke brug tussen theorie en experimenten, omdat het controle mogelijk maakte over meerdere parameters in verder onlosmakelijk complexe biologische experimenten. In het bijzonder stelde de veelzijdigheid van optogenetica ons in staat om i) het fenomeen van "gevangen" reentry aan te tonen door controle uit te oefenen over de dynamiek van gevormde depolarisatiepatronen, ii) de schending van het klassieke sink-source mismatch-principe te tonen en te verklaren door de vorm van het gedepolariseerde gebied nauwkeurig te definiëren in virtuele en echte monolagen van ventriculaire cellen, iii) een nieuw resonantieverschijnsel te ontdekken tijdens de inductie van ectopische activiteit door de sterkte van depolarisatie te reguleren.