

The transcriptomics of the ever-changing heart

Citation for published version (APA):

Hegenbarth, J. (2023). *The transcriptomics of the ever-changing heart: From development to senescence*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230201jh>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20230201jh](https://doi.org/10.26481/dis.20230201jh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Cardiovascular diseases still remain the main cause of death worldwide and therefore a global health problem rising in prevalence. Although efforts have been made to both decipher mechanisms and improve treatment therapies, our pathophysiological understanding of cardiac diseases remain incomplete. In order to know which alterations may contribute to cardiac diseases, a better understanding of the healthy condition is needed. Indeed, the heart is the first organ to form and from the moment it starts beating until the moment it stops, it is the central organ of the cardiovascular system and as such keeps us alive. During this lifetime, the healthy heart undergoes two main events of change: Development and Aging. Interestingly, while studies have tried to unravel different aspects, both events are not yet fully understood. Therefore, the main aim of this thesis is to address this knowledge gap by combining molecular and computational approaches on commonly used models to study these complex phenomena.

In **chapter 2** we examine the current applications of RNA-Sequencing (RNA-Seq) in cardiac research. Both bulk and single cell RNA-Seq have made valuable contributions to the cardiac field. Hence, we review their methodologies addressing their advantages and disadvantages with respect to cardiac application. Furthermore, we covered recent studies and multi-omics approaches, a rather new methodology that tries to combine data from different fields to gain new insights.

The first phenomenon of change in the lifetime of a healthy heart we dive into is the biological event of senescence. In **chapter 3** we describe the transcriptomes of hearts from naturally and three accelerated aging murine models. The three accelerated aging mouse models consisted of mice with particular alterations known to contribute to aging and therefore, resulting in an enhanced aged phenotype. By utilizing bulk RNA-Seq we were able to demonstrate that the prematurely aged mouse models show dramatic, model-specific differences when compared to naturally aged mice. Those, on the other hand, were transcriptionally rather stable with only few changes in their expression levels of protein-coding genes and various non-coding RNAs species over time. Hence, we concluded that even though aging is a multifactorial event, the mammalian myocardium shows evident transcriptomic stability in our experiment with very few overlaps with the other accelerated aging mouse models.

Therefore, as the next step we focused our attention on the event of development in

chapter 4, in more detail, the differentiation from a pluripotent situation to cardiac cells. A powerful tool to identify transcriptional mechanisms is single-cell RNASeq, which allows for transcriptomic profiling of tissues and cell populations at single cell resolution. Here, we mapped all developmental transcriptomic changes in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) that underwent the transitions from pluripotency to 2D beating heart muscle cultures to 3D-engineered heart myocardium rings at single cell resolution. Hence, we identified multiple populations and cell types along the whole differentiation trajectory and afterwards focused on the cardiomyocytes in particular. There, we observed a high heterogeneity and by integrating a random forest classifier, were able to identify a list of 108 genes responsible for the underlying differences within subpopulations. Among those, 8 candidates were investigated in detail in their expression and splicing profile over time, making them potential new drivers of cardiac maturation. Furthermore, utilizing this approach, we observed a particular similarity for certain subpopulations with populations from an adult human heart, leading to the conclusion that hiPSC-derived cardiomyocytes seem to show similar maturation patterns to a healthy heart.

Chapter 5 provides a more detailed discussion of our experimental findings and expands on opportunities for further research.

Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind nach wie vor die Haupttodesursache weltweit und damit ein globales Gesundheitsproblem mit steigender Prävalenz. Trotz grosser Anstrengungen um sowohl Mechanismen zu entschlüsseln als auch Behandlungstherapien zu verbessern, bleibt unser pathophysiologisches Verständnis von Herzerkrankungen unvollständig. Um zu verstehen, welche Veränderungen zu Herzerkrankungen beitragen können, bedarf es eines besseren Verständnisses des gesunden Zustandes. Das Herz ist das erste Organ, das sich während der human Entwicklung bildet, und von dem Moment an, in dem es zu schlagen beginnt, bis es aufhört, ist es das zentrale Dogma unseres Herz-Kreislaufsystems und hält uns dementsprechend am Leben. Während dieser Lebensdauer durchläuft das gesunde Herz zwei wesentliche Veränderungen: Entwicklung und Altern. Obwohl Studien versucht haben, verschiedene Aspekte dieser Veränderungen aufzudecken, sind beide Ereignisse interessanterweise noch nicht vollständig verstanden. Aufgrund dessen ist das Ziel dieser Dissertation mithilfe von molekularen und computergestützten Ansätze, diese Wissenslücke zu schließen und diese komplexen Phänomene zu untersuchen.

In **Kapitel 2** fokussieren wir uns auf die aktuellen Anwendungen der RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) in der Herzforschung. Sowohl Bulk- als auch 'single cell'-RNA-Seq haben wertvolle Beiträge zur Cardiologie geleistet, daher überprüfen wir ihre Methoden, um ihre Vor- und Nachteile im Bezug auf die Anwendung am Herzen zu berücksichtigen. Darüber hinaus haben wir das Potenzial von 'Multi-Omics' mit einbezogen, einer aufstrebenden Technik zur Kombination von Daten aus verschiedenen transcripionlen Bereichen.

Als erstes Phänomen der Veränderung im Leben eines gesunden Herzens befassen wir uns mit dem biologischen Ereignis der Seneszenz. In **Kapitel 3** beschreiben wir die Transkriptome von Herzen aus natürlich gealterten und vier beschleunigt gealterten Mausmodellen. Die vier beschleunigt gealterten Mausmodelle bestanden aus Mäusen mit besonderen Veränderungen, von denen bekannt ist, dass sie zum Altern beitragen und daher zu einem deutlich gealterten Phänotyp führten. Durch die Verwendung von Bulk-RNA-Seq konnten wir zeigen, dass die vorzeitig gealterten Mausmodelle dramatische,

modellspezifische Unterschiede im Vergleich zu natürlich gealterten Mäusen aufweisen. Diese hingegen waren transkriptionell ziemlich stabil mit nur wenigen Änderungen in ihren Expressionsniveaus von Protein-kodierenden Genen und verschiedenen nicht-kodierenden RNA-Type im Laufe der Zeit. Daher kamen wir zu dem Schluss, dass, obwohl das Altern ein multifaktorielles Ereignis ist, das Myokard von Säugetieren in unserem Experiment eine offensichtliche transkriptomische Stabilität mit sehr wenigen Überschneidungen mit den anderen beschleunigt gealterten Mausmodellen zeigt.

Daher haben wir uns in **Kapitel 4** ausführlich mit dem Entwicklungsereignis beschäftigt, um genauer zu sein, die Differenzierung von Stammzellen zu Herzzellen. Ein großartiges Werkzeug zur Identifizierung von Transkriptionsmechanismen ist die single-cell RNA-Seq, die ein transkriptomisches Profil von Geweben und Zellpopulationen mit Einzelzellauflösung erstellt. Hier haben wir alle transkriptomischen Entwicklungsveränderungen in humaninduzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) abgebildet, die die Übergänge von Pluripotenz zu 2D-Herzmuskelkulturen zum 3D-konstruierten Herzmyokardium durchliefen. Daher haben wir mehrere Populationen und Zelltypen entlang der gesamten Differenzierungsbahn identifiziert und uns anschließend insbesondere auf die Kardiomyozyten konzentriert. Dort beobachteten wir eine hohe Heterogenität und konnten durch die Integration eines Random-Forest-Klassifikators eine Liste von 108 Genen identifizieren, die für die zugrunde liegenden Unterschiede innerhalb von Subpopulationen verantwortlich sind. Unter diesen 8 Kandidaten wurden ihre Expression und ihr Spleißprofil im Laufe der Zeit detailliert untersucht, was sie zu potenziellen neuen Treibern der Herzreifung macht. Unter Verwendung dieses Ansatzes beobachteten wir eine besondere Ähnlichkeit für bestimmte Subpopulationen mit Populationen aus einem erwachsenen menschlichen Herzen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass hiPSC-abgeleitete CM ähnliche Reifungsmuster wie ein gesundes Herz zu zeigen scheinen.

Kapitel 5 bietet eine detailliertere Diskussion unserer experimentellen Ergebnisse und erweitert die Möglichkeiten für weitere Forschung.