

University of Groningen

iPS cell therapy for Parkinson's disease

Peng, Suping

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Peng, S. (2015). iPS cell therapy for Parkinson's disease. [Groningen]: University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER 8

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De huidige en nog in ontwikkeling zijnde behandelingsmogelijkheden voor de ziekte van Parkinson zijn er enerzijds op gericht om het dopamine-niveau in het striatum zo goed mogelijk te herstellen en anderzijds om de degeneratie van dopaminerge neuronen in de substantia nigra een halt toe te roepen.

Intrastriatale implantatie van jonge dopaminerge neuronen lijkt een zeer beloftevolle benadering om het eerste doel te bereiken. Door ervoor te zorgen dat er functionele synaptische verbindingen kunnen ontstaan tussen de geïmplanteerde dopaminerge neuronen en de interneuronen in het striatum, is het zelfs mogelijk om de afgifte van dopamine door de geïmplanteerde neuronen enigszins te reguleren en modificeren. Herstel van het striatale dopamine-niveau kan leiden tot verbetering van de sturing van fijne motoriek en tot een vermindering van de motorische problemen karakteristiek voor Parkinsonpatiënten. Een belangrijke doorbraak in de toepasbaarheid van dopaminerge celtransplantatie als een therapeutische optie was de mogelijkheid om dopaminerge cel implantaten te verkrijgen via *in-vitro* differentiatie van humane embryonale stamcellen in plaats van isolatie uit het ventrale mesencephalon van geaborteerde foetussen. De belangwekkende ontdekking van iPS cellen (induced pluripotent stem cells) door Shinya Yamanaka in 2006 bracht met zich de belofte op een onbeperkte, autologe bron van dopaminerge neuronen zonder de ethische en praktische bezwaren verbonden aan het gebruik van uit abortus verkregen foetale cellen of van embryonale stamcellen.

Wat betreft het tweede doel van een Parkinsontherapie, het stopzetten van het degeneratie-proces in dopaminerge neuronen, is er recentelijk steeds meer aandacht voor de rol van ontstekingsprocessen in het ontstaan en het ontwikkelen van de ziekte van Parkinson. Het identificeren van relevante immuuncomponenten die daarbij een rol spelen kan leiden tot nieuwe therapeutische benaderingen waarmee de degeneratie van dopaminerge neuronen vertraagd of eventueel geheel gestopt worden.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift betreft met name studies naar de mogelijke toepassing van uit iPS-cellen verkregen dopaminerge implantaten in de behandeling van de ziekte van Parkinson. Daarnaast komen een nieuwe immuno-pathogene component voor de ziekte van Parkinson en een mogelijke virale vector voor gentransfectie van hersencellen aan de orde.

Na een inleiding over de stand van zaken wat betreft kennis over de pathogenese en behandelingsopties voor de ziekte van Parkinson in **hoofdstuk 1**, hebben wij, in de vorm van een *Review* artikel, een overzicht gegeven van de studies die gedaan zijn met het implanteren van dopaminerge neuronen in het 6-OHDA ratmodel voor de ziekte van Parkinson, waarbij het gedrag en de effecten van primaire dopaminerge neuronen vergeleken werden met die verkregen uit iPS-cellen (**hoofdstuk 2**). Humane foetale dopaminerge neuronen geïsoleerd uit het ventrale mesencephalon gelden als de gouden standaard voor de positieve effecten van intrastriatale cel-implantatie. Verscheidene klinische *trials* hebben aangetoond dat Parkinsonpatiënten na transplantatie met deze cellen significant verbeterden in hun motoriek en minder afhankelijk waren van L-DOPA; postmortem onderzoek op Parkinsonpatiënten 10 jaar na implantatie liet zien dat de getransplanteerde foetale

dopaminerge neuronen, duidelijk herkenbaar, geïntegreerd waren in het striatale circuit. De cruciale vraag is of de dopaminerge neuronen verkregen uit iPS-cellen na intrastriatale implantatie net zo effectief zijn als de primaire foetale dopaminerge neuronen. Zij vertonen weliswaar dezelfde karakteristieke eigenschappen van dopaminerge neuronen, o.a. dopamine-productie en *release* en een karakteristiek spontaan vuurpatroon, en zij brengen dezelfde marker-eiwitten tot expressie, maar de vraag is of zij op vergelijkbare wijze de transplantatie procedure overleven, uitgroeien en integreren en stabiel zijn na implantatie. Vergelijking van hun gedrag en hun effectiviteit met die van primaire humane foetale dopaminerge neuronen na implantatie in het ratmodel voor de ziekte van Parkinson (met een unilaterale laesie in de substantia nigra m.b.v. 6-OHDA) kan een antwoord op die vragen bieden. In het *Review*, geven wij aan dat zowel de primaire als de uit iPS-cellen afkomstige dopaminerge neuronen een functionele verbetering geven van het 'Parkinson' rotatie-gedrag van de experimentele ratten. Het blijkt echter dat een veel groter aantal uit iPS-cellen afkomstige dopaminerge neuronen nodig is om een zelfde rotatie-reductie te verkrijgen als met primaire foetale dopaminerge neuronen. Hoewel het dopaminerge karakter van de geïmplanteerde, uit iPS-cellen afkomstige neuronen behouden bleef na implantatie in het striatum, bleek hun uitgroei vele malen beperkter dan die van geïmplanteerde primaire dopaminerge neuronen. Blijkbaar had het iPS-reprogrammeringsproces en het daaropvolgende differentiatie-proces geleid tot verstoringen in de expressie van genen betrokken bij de ontwikkeling en uitgroei van de dopaminerge neuronen.

Ten einde verschillen tussen de uit iPS-cellen gedifferentieerde dopaminerge neuronen en primaire dopaminerge neuronen vast te stellen, hebben wij, in **hoofdstuk 3**, het expressie-profiel van beide celpopulaties in detail vergeleken. Daarvoor hebben wij transgene Ptix3-GFP muizen gebruikt, zodat we met behulp van GFP-*FAC-sorting* zuivere dopaminerge neuronen kregen. We hebben de Ptix3-GFP iPS-cellen tot dopaminerge neuronen gedifferentieerd met behulp van algemeen geaccepteerde protocollen daarvoor. Door middel van de analyse van de transcriptie van, voor ventrale mesencephalon specifieke, dopaminerge marker-eiwitten hebben wij de correcte identiteit van deze dopaminerge neuronen bevestigd. Bovendien voldeden de uit iPS-cellen afkomstige dopaminerge neuronen aan een aantal meer algemene criteria voor dopaminerge neuronen, zoals de productie en secretie van dopamine, het typische patroon van spontane actiepotentiaaltrainen en de reductie van amfetamine-geïnduceerd rotatie-gedrag na hun implantatie in het Parkinson ratmodel met een unilaterale 6-OHDA laesie. Vervolgens hebben wij *genome-wide* het expressie-profiel van de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen in kaart gebracht en vergeleken met dat van primaire dopaminerge neuronen die geïsoleerd waren tijdens verschillende stadia van embryonale en postnatale ontwikkeling. Vergelijking met dopaminerge neuronen uit verschillende ontwikkelingsstadia is relevant omdat de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen eigenlijk ook als embryonaal beschouwd kunnen worden: immers, het proces van iPS-reprogramming induceert een volledige *re-setting* en verjonging van de resulterende dopaminerge neuronen ondanks de relatief lange kweekduur noodzakelijk voor hun correcte differentiatie en maturatie. Uit de

uitgebreide gen-analyses bleek dat de expressie van pluripotentie-genen in de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen, naar verwachting, volledig geremd was, maar ook dat enkele fibroblastspecifieke genen toch nog tot expressie kwamen. De sterkste gen-expressie correlatie tussen de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen en de primaire embryonale dopaminerge neuronen bleek met name aanwezig in de genclusters specifiek voor ventraal mesencephale dopaminerge neuronen. Opmerkelijk genoeg bleek dat de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen een afwijkende expressie van genen hadden die betrokken zijn bij globale transcriptieprogramma's coderend voor de fundamentele ontwikkeling van het zenuwstelsel, voor de basale, normale ontwikkeling van neuronen en nog specifiek voor de differentiatie en neuriet-uitgroei van neuronen. Het is zeer waarschijnlijk dat deze kleine afwijkingen in gen-expressie verantwoordelijk zijn voor de geringe neuriet-uitgroei van de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen na intrastriale implantatie. Een zeer uitgebreide en ver reikende uitgroei van neurieten is cruciaal voor een succesvolle implantatie van dopaminerge neuronen en voor de gunstige effecten op de symptomen van de ziekte van Parkinson in patiënten. Het is mogelijk om, aan het eind van de *in-vitro* differentiatie van iPS-cellen tot dopaminerge neuronen, de cellen zodanig (genetisch) te modifieren dat hun capaciteit tot vorming van uitgebreide neurietbomen specifiek gestimuleerd wordt. In **hoofdstuk 4**, beschrijven wij experimenten waarin wij de (over)expressie van 2 adhesie-factoren, PSA-NCAM (door transfectie van het gen coderend voor het PSA-transferase STX) en L1CAM, specifiek induceren in uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen. Na verificatie van de geïnduceerde over-expressie van PSA-NCAM en L1CAM, onderzochten wij de effecten op de neurietvorming in deze dopaminerge neuronen. Het bleek dat de over-expressie van beide adhesie-moleculen resulteerde in een significante toename in de uitgroei en complexe morfologie van de neurietbomen in de dopaminerge neuronen, tenminste als ze gekweekt werden op een laag van astrocyten. Echter, als de PSA-NCAM/L1CAM-getransfecteerde uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen uitgeplaat werden op *slices* van postnataal muizen striatum kon geen enkel effect meer op neuriet-uitgroei gedetecteerd worden; slechts een opvallend patroon van parallel-uitgroeïende neurieten was zichtbaar duidend op een specifieke interactie met het substraat. Ook na implantatie van de PSA-NCAM/L1CAM-getransfecteerde, uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen in het striatum van ratten met een 6-OHDA laesie in de substantie nigra, was de neuriet-uitgroei niet opvallend gestimuleerd en vergelijkbaar met de uitgroei op de striatale *slices in-vitro*. Daar kwam bij dat het aantal overlevende, geïmplanteerde dopaminerge neuronen uitermate gering was, waarschijnlijk toe te schrijven aan de sterk verzwakte conditie van de cellen na de lange traumatische procedures van virale transfectie en van (Pitx3-GFP) *FAC-sorting*. Het is duidelijk dat voor een succesvolle genetische modificatie van de uit iPS-cellen verkregen dopaminerge neuronen, de transfectie/transductie-methodieken geoptimaliseerd moeten worden.

Het is van cruciaal belang om inzicht te krijgen in de factoren die een rol spelen in de degeneratie en sterfte van dopaminerge neuronen in het brein van Parkinsonpatiënten; immers deze factoren kunnen uiteindelijk ook de nieuwe geïmplanteerde dopaminerge

neuronen weer gaan aantasten. Een interessante nieuwe factor is perforin, een uitermate krachtige cytotoxische component van het immuunsysteem: perforin kan *pores* vormen in de celmembraan en granzymes uitstoten, die direct leiden tot cellysis of apoptosis. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat intoxicatie van muizen met MPTP, een veel gebruikte methode om in muizen specifieke degeneratie van dopaminerge neuron en 'Parkinson-pathologie' na te bootsen, resulteerde in een toename in het serumniveau van perforin. Met behulp van transgene perforin-*knockout* (Pfp-/-) muizen hebben we de rol van perforin in de (MPTP-geïnduceerde) pathogenese van de ziekte van Parkinson onderzocht. Wij vonden dat de acute effecten van MPTP op het dopamine-niveau in het striatum van Pfp-/- muizen significant minder waren dan in de *wild-type* muizen; ook was het aantal dopaminerge neuron in de substantia nigra na MPTP-behandeling, in schrille tegenstelling tot de *wild-type* muizen, niet significant gereduceerd in de Pfp-/- muizen. Daarbij bleek dat de microglia-activatie in het striatum van MPTP-behandelde Pfp-/- muizen veel minder was dan in de MPTP-behandelde *wild-type* muizen. Onze studies laten voor het eerst zien dat perforin-deficiëntie, MPTP-geïnduceerde toxiciteit aan het nigrostriatale systeem voorkomt. Deze resultaten suggereren dat perforin een rol speelt in de directe of indirecte beschadiging van dopaminerge neuron tijdens de pathogenese van de ziekte van Parkinson. Perforin wordt met name geproduceerd in specifieke cytotoxische lymfocytensubpopulaties waarvan is aangetoond dat ze Parkinsonhersenen infiltreren en het is dan ook waarschijnlijk dat deze cellen betrokken zijn bij de perforin-effecten op de dopaminerge neuron. Jammer genoeg zijn we tot nu toe niet in staat geweest om de aanwezigheid van perforin-positieve lymfocyt in de substantia nigra van MPTP-behandelde muizen onomstotelijk aan te tonen. Daarnaast is in andere aandoeningen aangetoond dat perforin de bloed-hersen-barrière kan aantasten en wellicht speelt perforin ook een indirecte rol in Parkinsonpathogenese doordat het zo het binnendringen van cytotoxische lymfocyt faciliteert. Het lijkt zeer de moeite waard om de therapeutische mogelijkheden van (anti-)perforin voor de ziekte van Parkinson verder te onderzoeken.

Modificatie van de micro-omgeving van specifieke cellen door middel van de geforceerde expressie van relevante extracellulaire matrixcomponenten kan inflammatie reduceren en neuroprotectie en neuroregeneratie stimuleren. Met het oog op deze toepassing, hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht wat de meest geschikte manier is om bepaalde genen tot expressie te brengen in een beschadigde regio van het centraal zenuwstelsel. Een probleem daarbij is dat door glia-littekenvorming en necrose een rigide barrière is ontstaan die verspreiding van virale transfectievectoren belemmert. Een geschikt experimenteel diermodel om de afgifte van genen via transfectie in de vijandige omgeving van het beschadigde zenuwstelsel te bestuderen, is het muismodel met een gestandaardiseerde geïnduceerde ruggenmerg-beschadiging. Het adeno-associated virus (AAV) is veelvuldig getest in klinische *trials*, maar de efficiëntie van verschillende serotypes is zeer variabel en weefsel-specifiek. Met GFP als reporter gen, hebben wij de efficiëntie van verschillende serotypes van AAV's (d.w.z. verschillende capsides met het zelfde genoom) onderzocht in muizen met een beschadigd ruggenmerg. In vergelijking met het in de kliniek gebruikte

AAV2, bleek het AAV5 zich veel verder te verspreiden van de injectie-plek in het beschadigde ruggenmerg. Meer cellen waren getransduceerd door AAV5 dan door AAV2 en de totale transgen-expressie was veel hoger in het AAV5-getransduceerde ruggenmerg.

CONCLUSIES

Gezien de aard van de ziekte van Parkinson zou een optimale therapie moeten bestaan uit een combinatie van dopaminerge neuronvervanging en een blokkering van het verdere verlies van nog resterende dopaminerge neuronen.

Met de ontdekking van iPSC-cellen in 2006, is er een onuitputtelijke bron van autologe dopaminerge neuronen voor celtransplantatie beschikbaar gekomen. Met een aanzienlijke toename in het begrip van onderliggende reprogrammeringsmechanismes, zijn in recente jaren tal van verbeteringen in de iPSC-protocollen doorgevoerd, met name met het oog op een veilige klinische toepassing, die in de nabije toekomst onafwendbaar lijkt. Ons onderzoek laat zien dat de *in-vitro* processen van iPSC-reprogramming en daaropvolgende differentiatie leidt tot kleine afwijkingen in het (epi)genoom van de resulterende dopaminerge neuronen die met name consequenties hebben voor hun neuriet-uitgroei na transplantatie; verdere optimalisatie van het reprogrammeringsprotocol en toepassing van additionele genetische modulatie zou hierin een verbetering kunnen brengen.

Wat betreft het stoppen of beperken van het verdergaande verlies van dopaminerge neuronen bij Parkinsonpatiënten, kan immuunmodificatie-therapie in de toekomst wellicht nieuwe mogelijkheden bieden, b.v. door schadelijke lymfocyten uit te schakelen en/of protectieve lymfocyten selectief te stimuleren. Zo bleek passieve immunisatie van muizen met anti- α -synucleïne antilichamen degradatie van α -synucleïne-aggregaten te bevorderen en dopaminerge neuronen te redden. De transfer van T-lymfocyten, geïsoleerd uit een muis die behandeld was met copaxone, bleek neuroprotectief in MPTP-behandelde muizen. Copaxone is in staat cytotoxische T-lymfocyten te veranderen in een meer anti-inflammatoir phenotype. Ook de transfer van een specifieke T-lymfocytsubpopulatie, de regulatoire T-cellen of *Tregs*, leidde tot een verminderde neurodegeneratie in MPTP-muizen waarschijnlijk doordat ze de overreactiviteit van T-lymfocyten onderdrukken.

ACKNOWLEDGMENTS

Dear all, finally it comes to my favorite part of every thesis, the acknowledgments! If this is the first part of this thesis you read, don't take me wrong, I have serious work in the previous chapters. The main purpose of this book is to record the findings from the bench work, and the relevant scientific thinking during my PhD life, which has been leading me towards the PhD title by giving various questions and problems. Looking back at my PhD time, I see you guys, it was you who helped me to find the answers to the questions and give me the strength to deal with the problems. It was you who made my PhD life enjoyable.

I would like to thank my supervisors **Prof. Erik Boddeke**, **Prof. Melitta Schachner**, **Dr. Sjef Copray** and **Prof. Yan-Qin Shen**. I am really grateful that you took me into your groups and gave me the chance to work on the cutting-edge projects. As a master student in Microbiology who was very interested in Neuroscience, I was so lucky to get the offer from **Melitta** and **Shen**, while not having the relevant background. Thank you for opening the door to the field of Neuroscience for me. I was lucky again two years later, when **Erik** and **Sjef** opened another window for me, guess what, this time was iPS cells! And most importantly (joking) in this new place I worked, Google, Facebook, YouTube, Dropbox... work perfectly.

Sjef and **Shen**, you are both great supervisors, always kind and patient! You listened to troubles and uncertainty no matter it was related to work or not. Dear **Shen**, in the early days of my PhD study, you not only shared your experience of being a PhD in Bordeaux and postdoc in Michigan, but also your communications with other scientists and reviewers. Even till now, I'm still learning a lot from your experience of being a deputy dean. And besides these serious and busy duties, you are a wonderful mother to a lovely girl and puppy. Dear **Sjef**, thank you so much for all the help with the animal experiments! All those long days in CDP, even after I left Groningen, you were still taking care of my animals. I remember there was a time when we were working together in the CDP and you told me that your son finally became a 'pirate'. It sounded so cool to me, because I always wanted to be a pirate when I was a child. But it turned out to be 'pilot'. I think this was a sign already of the difficulty that we would face when writing this thesis. Without you, it could not have been finished in a nice way!

Erik and **Melitta**, it was a great experience to work with you! I was so impressed by both of your schedules. Dear **Melitta**, whenever you arrived in Shantou, the first place you would go is the office, even after a long flight from Hamburg or Rutgers. The days you spent in Shantou always started with saying 'Hi' in the morning and saying 'Good night' late in the evening to the students who were working in the lab. You are the best example of a hardworking person. I do believe that the hard moments will eventually show their value. Thanks for telling me that 'still water runs deep'. And I like your stories about 'mushrooms' and 'candles' at our English hour. Dear **Erik**, I appreciate the meetings and discussions that we had, they are so important for making the appropriate changes in strategies to keep my projects on the right track. Thank you so much for asking me to be your Chinese language teacher when I first arrived in Groningen. I always think that it was your trick to make me feel more at home abroad, and to teach me how to correct my supervisor (Chinese student

tend to say 'yes' more often). But you really have a talent for languages; I believe when you finally have time one day, you will be able to master the Chinese language very fast.

I would like to acknowledge the members of the reading committee **Prof. P.P. de Deyn**, **Prof. E.M. Hol** and **Prof. L.A. 't Hart** for reading and approving my thesis.

Greetings to the new PIs in the department: **Prof. Jon Laman** and **Dr. Armagan Kocer**. Good luck with your career, hope you enjoy working in the **Med Fys**.

I would like to thank the collaborators, **Prof. Sebastian Kügler** from the University of Göttingen for providing us the AAV vectors; and **Prof. Andrey Irintchev** from Friedrich-Schiller-University Jena for helping me to set up the spinal cord injury model.

Being a foreign student who knows little Dutch, it would be impossible to deal with administrative work of the university and the city. Special thanks to **Gerry** for helping me out with filling in tax forms and many other forms. Thank you **Harry** and **Henk** for your help with my UMCG guest account. Thanks to **Diana** of BCN graduate school for arranging so many activities, and helping to keep track of my PhD. Many thanks to **Prof. Gu** of SUMC; **Prof. Huo**, **Dr Zhang** and **Zheng Min** of the graduate school of SUMC. Thank you for your work on the joint-training PhD program of UMCG-SUMC.

I would like to express my gratitude to the FACS facility team: **Geert**, **Henk**, **Roelof Jan** for the long sorting and jokes; and also the animal facility staff, thanks to **Catriene** for supervising the project, **Natascha**, for taking care of my animals; **Michel** and **Annemieke** for technical support; **Juul** for giving me the surplus mice.

Many many thanks to all the current and former members of the Center for Neuroscience, SUMC. **Dr. Zhao**, it was a lot of fun to work with you! You were always cheerful, even the complains sounded cheerful. Your dedication to science was a great inspiration for me at my down moments. **Dr. Yu**, thanks for sharing your experience as a PhD in Japan. **Xuanjun** and **Peizhi**, it was not easy to take care of everything and everyone in the lab as a secretary and at the same time take care of the mice in the animal center. But you both did a wonderful job! **Hongchao**, the zebrafish guy, we got recruited at the same time. We have quite different personalities and views on running a lab, but that was never a problem for us to be friends. **Zhang Hao**, **Jinfei**, **Zhikui**, **Wang Yan** and **Yongjian**, I think you will agree with me that it was great fun to work in a newly established lab. We made our own rules and work regulations, we enjoyed the free atmosphere at journal clubs, work meetings and share our opinions on every issue related to work and the lab. And I really appreciate your help with my animal experiments. **Zhang Hao**, you become a close friend all these years. It always feels great no matter what we do together, yoga, fitness, movies, travelling... It is so nice that we can talk about everything in our life, and benefit from the talks. **Jinfei**, good luck with your company, but take some time to think about other aspects of life, not just work. **Zhikui**, you were always willing to help everyone around you. Wish you and **Xuanjun** lots of happiness. **Wang Yan**, you were a guy of few words. But every conversation with you was an interesting one. **Yongjian**, nice that you went back to the medical work that you like. You are the first one among us to start a family, wish you good luck and lots of happiness. **Fang Ping**, **Xie Lin**,

Qinghui, Danyang, it was really nice that you joined the lab. You brought more diversity to the lab and also very nice company for basketball, day trips, BBQ, hot pot and trying nice restaurants in Shantou. **Fang Ping**, nice that we still keep in touch, good luck with your research in Munich. **Zhang Ye, Yu Yang, Liu Yang, Tianli**, and **Liu Dan**, you came to the lab when I was almost leaving for Groningen. It is nice that we still keep in touch through our NSC Wechat group. **Zhang Ye**, thanks a lot for taking over my project after I left Shantou, I appreciate your contribution. And best wishes to the new members at the Center for Neuroscience, **Prof. Yang, Dr. Wei, Grace, Zhihua, Chunjie, Houde**, and many other new students, good luck with your work! Greetings to the colleagues in Jiangnan University. I had a great time there! **Dr. Cui**, thanks for the discussion on iPSCs and your help with my cover design. **Dr. Zhao** and **Dr. Sun**, nice that I can always get the Chinese medical help from you when I have an allergy or a cold. **Dr Chu**, thank you for your help during my stay in Jiangnan University. Good luck to the research assistants **Yao Li** and **Yuhong**; the master students, **Shixiao, Shubin, Linfang** and **Yida**, hope your projects will go well.

Many many thanks to the current and former members of **Med Fys., UMCG. Trix**, I cannot imagine how the 8th floor would be without you. You are always cheerful and work so efficiently. I have been wondering how you can handle everything within 3 days per week. That answer may have helped me to save half the time of my PhD. Thanks for sharing the office with us and making it a very cozy place with coffee, tea and candies. **Bart**, thank you for helping me out with the cloning problem. And I enjoyed the fun talks during the coffee breaks and the Berlin trip. **Evelyn**, thanks a lot for your help with cloning and q-PCR. I really liked to play badminton with you at the company competition. **Michel**, thanks for showing me how to do confocal and performing the electrophysiology for me. **Ietje**, it was great that you were always there when I needed help with slicing and staining. **Loes**, I was so impressed by the way you organized the cell culture labs, everything we needed was within reach, only sometimes the lazy (tired, stressed) PhD students (also me) forgot to do their tasks. **Nieske**, thanks for always reminding and helping me to do the registration for the animals on time. You were right, it saves time to do it when it is still a fresh memory. **Tjalling**, thank you very much for fixing the rota-8 system, the optical microscope, and also my bike. **Rob, Inge**, and **Wieb**, it is nice to have you at the work meetings and section meetings, your questions always made me to think about my research in a broader view. **Kumar, Ming-San, Zhilin, Thaiany, Koen, Javier, Chaitali**, my dear (former) office mates, it was really nice to share the office with you! I miss the talks with you guys about your hometowns, your traditional culture, and our language lessons. **Kumar**, thanks a lot for helping me with the animal experiments; also the kind words when I was so down. **Ming-San**, I still have the list of names of people in the lab that you made for me on my first day in the lab. That really helped, it was my first time abroad, very difficult to remember the faces and names. **Zhilin**, you were the 'present' that Erik brought for me from China! It made me feel at home, because I could finally talk in Chinese. We have very different personalities, but I appreciate seeing the world from your angle. **Thaiany**, you are the sweetest one! Miss you a lot! I love our 'girls' talk, and thank you for the make-up and dancing lessons. **Koen**, thanks for the candies that you shared with

us. It was also a lot of fun to go to an Arnold Schwarzenegger movie when you and **Wandert** were there. **Javier** and **Chaitali**, thank you for making it comfortable and easy in the office when I was so nervously preparing for the defense.

Reinhard, I can never thank you enough for teaching me the iPSC reprogramming and differentiation step by step! I love your joke: that the first Dutch word you learned when you came to the Netherlands was 'BIER'. I will never forget it because it was told so many times ;) It was very 'nice' of you and **Romy** not to stop me from ordering the Irish coffee out of curiosity, I have no idea how I got home that night. **Marcin**, there was always the comfortable and funny atmosphere when you were in the lab. Thank you for helping me with animal work. We were the only cell transplantation team in the lab at that time. I think we were also a good team in basketball with **Lasse**. Good luck to you and **Kasia** with your child, career and study in Poland. **Arun**, it was so nice that we could do a lot of sports together, basketball, squash, badminton with the Chinese group, Dutch group, company competition... Your squash schedule is impressive! **Duco**, thanks for calling 'lunch' at 11:50 everyday ;) **Divya**, thank you for being nice and warm. The Indian dinners and Chinese dinners we did together were great! We could have spent more time together if I would have come back to Groningen earlier. **Zhuoran**, thank you for being my paranympth! I miss the exciting board game evenings. Wish you and **Kaitao** lots of happiness. **Inge**, you are such a nice pianist, your music brings so much fun at our parties. I also enjoy talking with you! Your way of talking about the subtle political issues of China were very interesting. That helped me to better understand the 'western' opinion about China and to take a relaxed attitude when talking about subtle issues. **Wandert**, thank you for telling me that it is possible to switch the mind from a sad mood to a happy mood, you just need to remember the feeling when you are happy. **Thais**, **Corien**, and **Rianne**, your office is the center of fun in the lab. The tea breaks there were a lot of fun. It helped me to work efficiently in the late afternoon. **Xiaoming**, your vegetable cutting skills are impressive. I love all the dishes **Xu Ping** and you made for us in the 2014 spring festival dinner. **Sabrina**, your shining smile and laugh warm up the atmosphere in the lab. **Ria**, you are the most professional basketball player in our group, it was a pity that you did not come often to play with us. Good luck with your defense! I think I will get pretty nervous when you are defending, because mine is shortly after yours. **Vishnu**, relax and cheer up! Hope you are doing well in India, Good luck! **Sham**, we met when you came back for a short stay for your defense. That was the first RUG PhD defense I have ever been to, much more fascinating than the Chinese defenses. Good luck in the USA! **Esther** from the genetics department, it was fun to learn iPSC work together with you. **Khayum**, it was a lot of fun and laughter when you were playing basketball with us, and sometime a bit of tears when I did not manage to escape from your movements. Greeting to the new colleagues, **Susanne**, **Hilmar**, **Clarissa**, **Alain**, **Claudio** and **Hiske**, the labday this year was fun!

Many thanks to the (former) master students, **Laura** and **Silvia**, how are you in Spain? Miss you a lot! The dinners, parties we had together were great! It was only with you crazy girls that I drank alcohol. Can't believe you made me drink tequila, and the sangria you made was fantástico. **Marissa**, **Anna**, **Chiwan**, **Michelle**, **Christina**, **Katja**, **Lasse**, **Elisa**, **Marisela**, and

Ossian, although we didn't work much together, it was fun to know you, wish you all the best with your career.

I would like to thank my perfect former flat-mates, **Yang Jing, Cuifeng** and **Edyta**. It was great to live with you. We all work in UMCG, so that we perfectly understood each other's complains. Thank you all for being so supportive. Thanks to **Ai Hui, Yixian, Xiaolei, Qin Jing, Liwen, Wang Qi**, for the girls' nights, shopping, dancing, Sushi Mall time and board games! Thanks to my dear friends from Shantou, **Wu Rui, Xueting, Zeng Xiang, Junjun**, nice to work with you together in the joint-training PhD program of UMCG-SUMC, it was important to have your support during the difficult times. Many thanks to the house-mates in Blekerslaan 4. Miss you, **Yana, Daniela, Luke, Uli**, and **Jamie**.

I would like to thank my friends at BCGO!, **Ingemarie, Gab, Stefan, Mark, Arno & Ada, Zhang Lu, Rudolf, Kristborg, Wart, Garrelt, Sander**; and in the Chinese badminton team, **Zetao, Xiaobao, Sun Ze, He Tao, Ding Ning, Qibing, Kexin, Shuhai, Chengyong...**, I love to play badminton with you, and I enjoyed the competitions that we play together and also the other activities like going out and hot pot.

Many thanks to the friends of Sanguosha group, **Cao Qi, Hanbing, Jiang Yi & Zhao Ting, Li Jun, Li Ming...** Every Sanguosha evening was great, especially we had dumpling and hotpot sections next to it.

I would like to thank **Shu, Liu fei, Zhenran**. It was nice to travel with you guys. You are all wonderful guides! With the local history, maps and train schedules ready in your mind. **Inez & Rob**, the Tango course was awesome.

感谢一起长大，一路相伴的老朋友们，叶婵，旭曼，丽敏，妙纯，楚姗，楚伟，锦素；还有袁姐，晓玲姐，谦豫，谦豫爸爸，写论文的日子里有你们的陪伴特别幸福！

I would like to thank **Ilia**, this could not have happened without you! Thank you for being so supportive and patient during my seemingly endless medium changes, CDP, confocal work... and thesis writing. Thank you for your help with q-PCR data analysis, graph making, cover design, and being my paranymph for the defense. It was also great fun to play badminton, basketball, board games, go to movies, tango courses with you and dinners with your family. Thank you **Liia, Rita** and **David** for the nice dinners, help and constructive suggestions for the thesis.

Finally, I would like to thank my family. 我特别感谢爸爸妈妈这么多年来支持和谅解。从初中开始我就是个贪玩不着家的小孩，直到最近才发现你们一直默默期盼着我回家，才知道什么是‘在家千日好’。往后的日子，希望有更多的时间视频，回家，带你们出去玩。谢谢弟弟，阿绵，多多，妹妹在我离家的日子里照顾着我们的家。