

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19061> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Egorova, Anastasia Dmitrievna

Title: Ciliary regulation of endothelial response to shear stress : consequences for Tgf-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition

Date: 2012-06-07





Samenvatting

Резюме

Samenvatting

Endotheelcellen vertalen biomechanische krachten in functionele en fenotypische veranderingen die een belangrijke rol spelen in de embryonale cardiovasculaire ontwikkeling. In dit proefschrift hebben wij de rol van primaire ciliën in de reactie van endotheelcellen op shear stress onderzocht. Wij hebben ons gericht op de regulatie van de Krüppel-like factor familie van transcriptiefactoren, en van de Transforming growth factor β (Tgf β) en Hedgehog (Hh) signaaltransductie cascades.

In Hoofdstuk 1 wordt een inleiding gegeven van de endotheliale respons op shear stress. Ook wordt het signaleringsmechanisme beschreven van Tgf β geassocieerde endotheel-mesenchym transitie (EndoMT), en die van Hh in de aan- en afwezigheid van primaire ciliën.

Hoofdstuk 2 bevat achtergrondinformatie over de structuur, distributie, en functie van endotheliale primaire ciliën. Daarnaast wordt de rol van shear stress in de normale cardiovasculaire ontwikkeling uitgelegd en wordt de functie van primaire ciliën in endotheliale mechanotransductie beschreven.

Hoofdstuk 3 beschrijft de universele respons van endotheelcellen op shear stress. Wij laten zien dat endotheliale voorlopers (endothelial progenitor cells) op een soortgelijke wijze reageren als gedifferentieerde volwassen arteriële en veneuze endotheelcellen, onder andere met een vergelijkbare inductie van de transcriptiefactor Krüppel-like factor 2 (Klf2). Hiermee wordt aangetoond dat de reactie van endotheelcellen op vloeistofstroom onafhankelijk is van de differentiatiestatus.

In Hoofdstuk 4 bestuderen wij het effect van shear stress op Klf2 expressie en Tgf β geassocieerde signalering in embryonale endotheelcellen. Endotheelcellen in gebieden van hoge shear stress, met name in het cardiale uitstroomgebied en in het atrioventriculaire kanaal, zijn gekenmerkt door een hoge expressie van Klf2 en door Tgf β gedreven EndoMT. Extraembryonale veneuze obstructie leidt tot een lokale toename van shear stress en verandering in Tgf β signalering. Dit resulteert op termijn in een spectrum van aangeboren hartafwijkingen. Wij tonen aan dat, in tegenstelling tot volwassen endotheel, in embryonale endotheelcellen shear stress leidt tot activering van Tgf β /Alk5 (een Tgf β receptor type I) signalering en dat de inductie van Klf2 een Alk5 afhankelijk proces is.

In Hoofdstuk 5 wordt de rol van primaire ciliën in het reguleren van de endotheliale respons op shear stress beschreven. Het distributiepatroon van gecilieerde endotheelcellen in het embryonale hart is shear stress-gerelateerd. Ciliëring is beperkt tot gebieden van lage en oscillerende shear stress. Ongecilieerde endotheelcellen in gebieden van hoge shear stress, zoals in de cardiale uitstroom en het atrioventriculaire kanaal, ondergaan *in vivo* EndoMT. Gecilieerde en niet-gecilieerde endotheelcellen werden blootgesteld aan shear stress en vervolgens werd de expressie van een aantal markers voor shear stress en Tgf β signalering geanalyseerd, en werden de fenotypische veranderingen van

de cellen bekeken. Het blijkt dat ongecilieerde endotheelcellen een sterke activering van Tgf β /Alk5 signalering laten zien en EndoMT ondergaan. Dit respons is afhankelijk van de inhibitie van Klf4. De rescue van primaire ciliën leidt tot verminderde Tgf β signalering en tot de remming van EndoMT. Deze resultaten demonstreren een functionele relatie tussen het endotheliale ciliëringspatroon en de flow-gerelateerde endotheliale functie.

Hoofdstuk 6 bespreekt de complexe wisselwerking tussen shear stress, primaire ciliën en Tgf β signalering in endotheelcellen op basis van de resultaten verkregen in Hoofdstukken 4 en 5.

Hoofdstuk 7 toont de structuur van endotheliale ciliën, zoals bepaald met immunofluorescentie en elektronenmicroscopie. Gezien de 9+0 microtubuli configuratie van endotheliale ciliën, behoren zij tot de groep van onbeweeglijke (primaire) ciliën. Introductie van een fluorescent tubuline eiwit in de cellen maakt het mogelijk om de beweging van endotheliale ciliën te zien terwijl de cellen werden blootgesteld aan oscillerende flow. Wij laten zien dat endotheliale ciliëring afhankelijk is van het patroon en niet van het niveau van shear stress en dat oscillerende shear stress ciliëring van endotheelcellen induceert. Daarnaast toonden wij aan dat het calcium transiënt en de transcriptie van shear stress-afhankelijke genen onafhankelijke parameters zijn in de respons van endotheelcellen op flow.

Hoofdstuk 8 is gewijd aan de rol van Hh signalering in Tgf β gemedieerde EndoMT van ongecilieerde endotheelcellen onder flow. Wij hebben aangetoond dat een alternatief, niet-eerder beschreven, Hh activatiemechanisme verantwoordelijk is voor de hoge niveaus van GLI-Krüppel family member 1 (Gli1) in ongecilieerde cellen. Gli1 en Tgf β 2 spelen beide een belangrijke rol in shear stress-geïnduceerde EndoMT van ongecilieerde endotheelcellen. Wij concluderen dat primaire ciliën een schakelaar zijn tussen de ligand-afhankelijke en -onafhankelijke Hh signaaltransductie en tussen lage en hoge activatie van Tgf β 2, waarmee zij een centrale rol spelen in de endotheliale respons op bloedstroom.

Wij besluiten in Hoofdstuk 9 met een uitgebreide samenvatting en een algemene discussie over de rol van primaire ciliën in de endotheliale respons op shear stress en de consequenties hiervan voor Tgf β signalering en EndoMT.

Резюме

Эндотелиальные клетки переводят биомеханические силы в функциональные и фенотипные изменения, которые играют важную роль в эмбриональном кардиоваскулярном развитии. В этой диссертационной работе мы изучили роль первичных ресничек в ответной реакции эндотелиальных клеток на напряжение сдвига. Мы уделили особое внимание регуляции транскрипционных факторов семейства Krüppel-like factor (Klf), Трансформирующего фактора роста β (Transforming growth factor β , Tgf β) и Ёжик- (Hedgehog, Hh) зависимых сигнальных каскадов.

Глава 1 содержит введение, описывающее влияние эндотелиальной ответной реакции на напряжение сдвига. Также описываются механизмы переноса сигналов: Tgf β -индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход (endothelial-mesenchymal transition, EndoMT) и механизм Hh в присутствии и отсутствии первичных ресничек.

Глава 2 содержит литературный обзор, посвященный строению, распределению и функции эндотелиальных первичных ресничек. Здесь объясняется роль напряжения сдвига в нормальном кардиоваскулярном развитии, и описывается функция первичных ресничек в эндотелиальной механотрансдукции.

Глава 3 описывает универсальную ответную реакцию эндотелиальных клеток на напряжение сдвига. Мы показали, что эндотелиальные клетки-предшественники реагируют по аналогии с дифференцированными артериальными и венозными эндотелиальными клетками взрослых, в частности, с похожей индукцией фактора транскрипции Klf2. Этим подтверждается, что реакция эндотелиальных клеток на кровоток не зависит от степени их дифференциации.

В Глава 4 мы изучаем действие сдвига напряжения на экспрессию Klf2 и Tgf β -зависимой каскады переноса сигналов в эмбриональных эндотелиальных клетках. Эндотелиальные клетки в области высокого напряжения сдвига, именно в пути оттока области желудочка сердца и в атриовентрикулярном канале, характеризуются высокой экспрессией Klf2 и Tgf β -индуцированным EndoMT. Экстрозембриональная венозная обструкция приводит к местному увеличению напряжения сдвига и изменению сигналов Tgf β сигнального каскада. Это приводит к различным видам врожденного порока сердца. Мы подтверждаем, что в отличие от эндотелиальных клеток взрослых, в эмбриональных эндотелиальных клетках напряжение сдвига приводит к активированию сигнального каскада Tgf β /Alk5 (Tgf β рецептор типа I), и что индуцирование Klf2 зависит от активирования Alk5.

В Глава 5 описывается роль первичных ресничек в регуляции эндотелиальной ответной реакции на напряжение сдвига. Распределение реснитчатых эндотелиальных клеток в сердце эмбриона зависит от напряжения сдвига. Наличие ресничек ограничивается областями низкого и колебательного напряжения сдвига. Безреснитчатые эндотелиальные клетки, находящиеся в областях высокого напряжения сдвига, таких как в пути оттока области желудочка сердца и атриовентрикулярном канале, подвергаются EndoMT *in vivo*. На реснитчатые и безреснитчатые эндотелиальные клетки было оказано действие напряжения сдвига, после чего был проведен анализ экспрессии маркеров по отношению к напряжению сдвига и Tgf β -зависимому сигнальному каскаду и рассмотрены фенотипные изменения клеток. Оказывается, что безреснитчатые эндотелиальные клетки вызывают сильную активацию Tgf β /Alk5 сигнального каскада и подвергаются EndoMT. Эта реакция зависит от ингибирования транскрипционного фактора Klf4. Появление первичных ресничек приводит к ослаблению Tgf β сигнального каскада и торможению EndoMT. Эти результаты демонстрируют функциональную связь между эндотелиальным распределением ресничек и эндотелиальной функцией, связанной с кровотоком.

На основании результатов, полученных в Глава 4 и 5, в Главе 6 обсуждается сложное взаимодействие между напряжением сдвига, первичными ресничками и Tgf β -зависимым сигнальным каскадом в эндотелиальных клетках.

В Глава 7 описано строение эндотелиальных клеток при определении методами иммунофлуоресценции и электромикроскопии. На основании 9+0 микротрубчатой конфигурации эндотелиальных ресничек видно, что они относятся к группе неподвижных (первичных) ресничек. При помощи флуоресцентного тубулинового белка наблюдали движение эндотелиальных клеток при колебательном потоке. Мы показали, что наличие эндотелиальных ресничек зависит от типа, а не от степени напряжения сдвига, и что колебательное напряжение сдвига стимулирует появление ресничек эндотелиальных клеток. Наряду с этим мы подтвердили, что перенос кальция и транскрипция зависимых от напряжения сдвига генов являются независимыми друг от друга в ответной реакции эндотелиальных клеток на поток.

Глава 8 посвящена роли передачи Hh-зависимых сигналов в Tgf β -индуцированном EndoMT для безреснитчатых эндотелиальных клеток при кровотоке. Мы продемонстрировали, что альтернативный, не описанный ранее механизм Hh активации отвечает за высокое содержание транскрипционного фактора, относящегося к семейству GLI-Krüppel типа 1 (GLI-Krüppel family member 1, Gli1) в безреснитчатых клетках. Как Gli1 так и Tgf β 2 играют важную роль в вызванном напряжением сдвига механизме EndoMT безреснитчатых эндотелиальных клеток. Мы приходим к выводу, что первичные реснички служат переключателем между лиганд-зависимой и независимой Hh сигнальных каскадов и между низкой и высокой

активацией Tgf β 2; при этом им принадлежит важная роль в эндотелиальном ответе на кровопоток.

В Главе 9, содержащей обширное резюме и общее обсуждение результатов, мы приходим к заключению о роли первичных ресничек в эндотелиальной ответной реакции на напряжение сдвига и последующем влиянии Tgf β -зависимого сигнального каскада и EndoMT.

