



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Imaging Von Willebrand Factor during storage and upon secretion by light and electron microscopy

Mourik, M.J.

Citation

Mourik, M. J. (2015, May 6). *Imaging Von Willebrand Factor during storage and upon secretion by light and electron microscopy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/32930>

Version: Corrected 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/1887/32930>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32930> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Mourik, Marie Johanne

Title: Imaging Von Willebrand Factor during storage and upon secretion by light and electron microscopy

Issue Date: 2015-05-06

Samenvatting & Toekomstperspectief

Samenvatting

Endotheelcellen bekleden de binnenste laag van bloedvaten en vormen de barrière tussen het bloed en het onderliggende weefsel. Ze zijn betrokken bij verschillende processen waaronder de regulatie van bloeddruk, ontsteking, angiogenese en het controleren van bloedstolling.¹ In veel van deze processen geeft het endotheel bioactieve moleculen af die afkomstig zijn uit specifieke opslagorganellen zoals de Weibel-Palade bodies (WPBs).^{2,3} Het voornaamste eiwit dat opgeslagen zit in WPBs is Von Willebrand Factor (VWF).⁴ Dit plakkerige eiwit is betrokken bij de eerste stappen van de bloedstolling en zorgt ervoor dat bloedplaatjes ophopen op plekken met vaatschade waardoor de bloeding zo snel mogelijk stopt.

Mutaties in VWF kunnen de bloedstolling verstoren en veroorzaken daardoor de ziekte van Von Willebrand (VWD)⁵, één van de meest voorkomende erfelijke bloedingsziektes. Om de biologische processen te begrijpen die VWD veroorzaken, is het belangrijk om te weten hoe VWF wordt geproduceerd, opgeslagen en uitgescheiden. Om VWF op te slaan in WPBs wordt het eiwit in karakteristieke, buisvormige structuren gevouwen die de WPB een typische, langgerekte vorm geven.^{2,6,7} De capaciteit van VWF om zich in een buisachtige structuur te vouwen wordt gezien als een kenmerk van normaal VWF.⁵ In dit proefschrift zijn de morfologische karakteristieken van VWF bestudeerd tijdens opslag en secretie om nieuwe inzichten te verkrijgen in de moleculaire mechanismen die mogelijk ten grondslag liggen aan VWD. Hiervoor zijn de meest geavanceerde elektronenmicroscopische technieken gebruikt.

De voornaamste beeldvormingstechniek gebruikt voor het VWF onderzoek in dit proefschrift is correlatieve licht- en elektronenmicroscopie (CLEM). Met CLEM wordt fluorescente kleuring gebruikt om specifieke structuren te lokaliseren met lichtmicroscopie voor een daaropvolgende morfologische analyse met elektronenmicroscopie. **Hoofdstuk 2** beschrijft in detail onze aanpak om fluorescentie microscopie te combineren met transmissie-elektronenmicroscopie (TEM)

om zo structuren die betrokken zijn bij VWF secretie te kunnen lokaliseren en identificeren. Voor CLEM gebruikten we speciaal ontworpen kweekschaltjes die een glazen bodem bevatten waarin een coördinatensysteem is gegraveerd. Dit coördinatensysteem gebruikten we om met de lichtmicroscopie nauwkeuring vast te leggen waar interessante regio's gelokaliseerd waren voor analyse met TEM. Tijdens de preparatie procedure voor TEM worden de interessante regio's opnieuw gelokaliseerd in het coördinatensysteem om van dezelfde regio ultra dunne coupes te snijden. We laten zien dat deze techniek ook gecombineerd kan worden met elektronentomografie om een driedimensionale reconstructie van het exocytosemoment te maken. Aangepaste versies van dit protocol worden gebruikt om vormende WPBs te bestuderen aan het Golgi apparaat (**Hoofdstuk 4**) en om VWF te analyseren in Factor VIII bevattende WPBs (**Hoofdstuk 5**).

Om de structurele kenmerken vast te leggen die inzicht geven in de mechanismen betrokken bij WPB formatie, hebben wij geëxperimenteerd met 'serial block face-scanning electron microscopy' (SBF-SEM) waarmee, ten opzichte van TEM, grote volumes geanalyseerd kunnen worden. In **Hoofdstuk 3** laten wij de veelbelovende potentie van deze relatief nieuwe techniek zien en bespreken we de beperkingen die nog overwonnen moeten worden om de techniek optimaal in te zetten voor WPB onderzoek.

In **Hoofdstuk 4** bestuderen we de biogenese van WPBs met behulp van immunogoud kleuring op TEM coupes, met CLEM en met SBF-SEM. Voor de CLEM experimenten gebruikten we getransfecteerde cellen waarin we de WPBs gekleurd hebben met 'green fluorescent protein' (GFP) om de vorming van de WPBs te kunnen volgen in de tijd. We laten zien dat WPBs volledig gevormd worden aan het Golgi apparaat. Onze data geeft aanwijzingen dat WPB formatie begint in speciale regio's in het Golgi apparaat, op plekken waar geconcentreerd VWF zich herschikt in een buisachtige conformatie. Gedurende dit vormingsproces komt de WPB gedeeltelijk uit het Golgi terwijl het verbonden blijft via talrijke membraanverbindingen. Nabij deze verbindingen observeerden we dicht opeengepakte clusters materiaal. We vermoeden dat deze clusters ophopingen zijn van niet buisvormig VWF die bestemd zijn voor vormende WPBs om bij te dragen aan de groei van WPBs.

In **Hoofdstuk 5** bestuderen we de structurele organisatie van WPBs in endotheelcellen waarin Factor VIII tot expressie is gebracht. In deze endotheelcellen wordt Factor VIII samen met VWF opgeslagen waardoor de WPBs rond worden. We laten zien dat deze bolvormige WPBs korte, ongeorganiseerde VWF buizen

bevatten. Deze observatie suggereert dat Factor VIII interfereert met het buisvormingsproces van VWF. Daarnaast laten we zien, dat het VWF uit deze WPBs in staat is om lange VWF strengen te maken. Vergeleken met normaal VWF, observeerden we echter wel een afname in de capaciteit van de VWF strengen om bloedplaatjes te binden. Deze verminderde binding wordt veroorzaakt door gebonden Factor VIII dat de bindingsplek voor bloedplaatjes afschermt, of door een Factor VIII geïnduceerde verandering van het VWF die ertoe leidt dat deze minder plaatjes kan binden.

Een adequate vorming van functionele VWF strengen is essentieel voor de eerste stappen van de primaire hemostase. Om functionele VWF strengen te vormen is er voldoende VWF secretie nodig. In **Hoofdstuk 6** beschrijven we een recent ontdekt secretiemechanisme dat endotheelcellen in staat stelt om grote hoeveelheden VWF uit te scheiden. In gestimuleerde endotheelcellen observeerden we grote blaasjes (1-2 micron) die gevuld waren met VWF die een hechte relatie leken te hebben met nabij gelegen WPBs. Deze grote VWF blaasjes leken daarnaast ook de bron te zijn van uitgescheiden VWF dat was omgevormd in VWF strengen. We laten zien dat deze blaasjes worden gevormd voordat VWF secretie plaats vindt, wat suggereert dat er sprake is van multigranulaire exocytose. Tijdens multigranulaire exocytose fuseren secretieblaasjes eerst met elkaar voordat deze met het plasmamembraan fuseren. We hebben deze grote VWF gevulde blaasjes daarom 'secretory pods' genoemd. Met behulp van fluorescente VWF antilichamen konden we het uitgescheiden VWF op de plek van exocytose fixeren om zo de exocytoseplaats nader met CLEM te kunnen bestuderen. Op deze manier hebben we vast kunnen stellen dat secretory pods inderdaad VWF secretiestructuren zijn.

In **Hoofdstuk 7** visualiseren we de secretie van VWF in levende cellen en laten we zien dat secretory pods gevormd worden door de fusie van meerdere WPBs. Daarnaast hebben we onderzocht hoe VWF uit secretory pods herschikt wordt tot VWF strengen. Met een tweede serie CLEM experimenten, waarin VWF strengformatie niet geblokkeerd wordt door antilichamen, konden we aantonen dat uitgescheiden VWF in eerste instantie een bolvorm aanneemt. Daarnaast laten we zien dat de vorming van VWF strengen mogelijk wordt gemaakt dankzij de schuifspanning van stromende vloeistof en door stevige VWF verankering aan het celoppervlak. Deze observaties dragen bij aan nieuwe pathofysiologische mechanismen bij het ontstaan van VWD.

Toekomstperspectief

Dit proefschrift beschrijft nieuwe inzichten betreffende WPB biogenese, VWF secretie en VWF strengformatie. Daarnaast leveren we aanwijzingen voor nieuwe pathofysiologische mechanismen die mogelijk aangetast zijn in VWD. Onze bevinding hebben we verkregen door WPBs in gezonde endotheel cellen te bestuderen met behulp van verschillende microscopie technieken.

In dit proefschrift laten we ook de kracht zien van geavanceerde microscopie-technieken zoals CLEM. CLEM speelde vaak een centrale rol in ons onderzoek omdat het een effectieve methode is waarbij fluorescentiemicroscopie gecombineerd wordt met hoge resolutie elektronenmicroscopie. Het geeft de mogelijkheid om de specifieke morfologische stadia gedurende WPB formatie en VWF secretie gericht te bestuderen. Toepassing van CLEM, als een algemene biologische assay, heeft de potentie om nieuwe cellulaire en sub-cellulaire relaties bloot te leggen die anders onopgemerkt zouden blijven wanneer ze alleen met licht- of elektronenmicroscopie bekeken worden. Toekomstige CLEM ontwikkelingen zouden idealiter resulteren in een workflow die makkelijk, snel, betrouwbaar en toepasbaar is op een breed scala van biologische systemen. Het is echter een hele uitdaging om een dergelijke workflow te ontwikkelen. Het is misschien wel onmogelijk omdat iedere toepassing zijn eigen randvoorwaarden en beperkingen heeft ten opzichte van de biologische vraag. De vele workflows die momenteel beschikbaar zijn voor CLEM illustreren dan ook de verscheidenheid aan toepassingen. CLEM wordt namelijk gebruikt met verschillende eisen aan de correlatienauwkeurigheid. Dit kan variëren tussen het lokaliseren van een individuele cel in een stukje weefsel tot het karakteriseren van moleculaire en sub-cellulaire structuren in een cel.

In het veld van het VWD onderzoek zal de toepassing van CLEM essentieel zijn om gedetailleerde informatie te verkrijgen op een moleculaire schaal. Om veranderingen in de moleculaire structuur van VWF te kunnen afbeelden met elektronenmicroscopie is het gebruik van cryo-CLEM noodzakelijk. Voor cryo-CLEM wordt cryo-fluorescentiemicroscopie gecombineerd met cryo-elektronentomografie⁸. Een belangrijke voorwaarde van deze techniek is dat de cellen dun genoeg moeten zijn voor cryo-elektronentomografie. Eerdere studies hebben laten zien dat endotheelcellen geschikte kandidaten zijn omdat deze cellen dun genoeg zijn in hun periferie voor cryo-tomografie.^{7,8} Voor het bestuderen van VWD zouden endotheelcellen die uit bloed geïsoleerd en gekweekt kunnen worden, 'blood outgrowth endothelial cells' (BOECs), geschikt zijn. Op deze manier kunnen er

endothelcellen gekweekt worden uit bloed van VWD patiënten. Voorgaande studies hebben laten zien dat BOECs een goed modelsysteem zijn voor de analyse van VWD.^{9,10}

Om CLEM op VWD BOECs toe te kunnen passen is het essentieel dat de WPBs fluorescent gelabeld kunnen worden. Het zal een uitdaging zijn om de juiste condities hiervoor te vinden, maar zodra een dergelijke transfectie werkt is het bijvoorbeeld ook mogelijk om de fluorescentie eerst in levende cellen te bekijken voordat het preparaat vitreus wordt ingevroren. Fluorescentiemicroscopie op levende cellen zou bijvoorbeeld gebruikt kunnen worden om exocytose te bestuderen. Nadat de samples vitreus zijn ingevroren, kan cryo-fluorescentiemicroscopie gebruikt worden om regio's te lokaliseren die geschikt zijn voor cryo-elektronenmicroscopie.⁸ In de setup zoals die hierboven beschreven is, zijn observaties met betrekking tot het vastleggen van WPB morfologie en secretie alleen mogelijk in de dunnere delen van de cel (100 – 300 nm). Om ook de dikkere delen te bekijken is het wel mogelijk om een dunne lamel (200 – 500 nm) te maken van een specifieke regio in het dikke deel van de cel met behulp van een gefocusseerde ionen bundel (Focussed Ion Beam, FIB). Op de gecreëerde lamel kan vervolgens cryo-elektronentomografie toegepast worden.¹¹

Met toepassing van cryo-CLEM op VWD BOECs zal het mogelijk zijn defecten te visualiseren op een moleculair niveau. Dit zal het VWD onderzoek vele nieuwe perspectieven geven en mogelijk kunnen bijdragen aan nieuwe behandel strategieën.

Naast het onderzoek dat gericht is om de fundamenteën van VWD te ontrafelen, hebben we ook elektronenmicroscopie technieken laten zien die geschikt zijn om WPBs in vivo te karakteriseren. Het zou bijvoorbeeld interessant kunnen zijn om WPBs in de verschillende vaatbedden te bestuderen die te vinden zijn in het vaatstelsel van zoogdieren. Tot op de dag van vandaag zijn de WPBs uit verschillende soorten weefsel slechts beperkt gekarakteriseerd en dat is opmerkelijk omdat er steeds meer aanwijzingen zijn dat er een aanzienlijke heterogeniteit is tussen de WPBs van verschillende soorten weefsel. Een elektronenmicroscopie techniek waarmee stukjes weefsel gemakkelijk geanalyseerd zouden kunnen worden is SBF-SEM. Met SBF-SEM kunnen grote drie dimensionale datasets verkregen worden waarin de morfologie van WPBs geanalyseerd kan worden op nanometer schaal en in de context van het weefsel. Het zou bijvoorbeeld interessant zijn om het long endotheel nader te onderzoeken om vast te stellen of deze cellen dezelfde ronde, mogelijk ook Factor VIII bevattende, WPBs produceren als de endotheelcellen

waarin Factor VIII door transductie tot expressie is gebracht. Het karakteriseren van WPBs in verschillende soorten endotheel kan mogelijk ook bijdragen aan andere onderzoeksvelden en zou kunnen helpen verklaren waarom sommige gebieden gevoeliger zijn voor trombose dan andere.

Ter conclusie, de verschillende hoofdstukken in dit proefschrift presenteren een variatie aan beeldvormingstechnieken waarbij gebruik wordt gemaakt van geavanceerde licht- en elektronenmicroscopie. De toepassing van deze technieken kan nog veel meer informatie verschaffen ten behoeve van VWD en van andere vasculaire ziekten. Echter om onze bevindingen in een breder perspectief te plaatsen is het essentieel om de verkregen microscopiedata te combineren met data verkregen uit moleculaire en klinische studies. Om de translatie tussen die verschillende onderzoeksvelden (b.v. klinisch, moleculair en microscopie onderzoek) te kunnen maken is het van belang dat er grote toegankelijke databases beschikbaar zijn waarin verkregen resultaten gedeeld kunnen worden. Toegang tot data die verkregen is met behulp van microscopie is, tot op de dag van vandaag, zeer beperkt. Dit komt mede doordat het lastig is om visuele data te kwantificeren in zijn biologische context. Het ontbreken van kwantificatie en identificatie van structuren die afgebeeld zijn in een beeld maakt het lastig om beeld-gerelateerde informatie op te slaan in toegankelijke databases. Door beeldvormingstechnieken, zoals licht- en elektronenmicroscopie, te combineren kan er zowel morfologische als functionele informatie uit hetzelfde preparaat verkregen worden. Hierdoor kan microscopiedata gekwantificeerd worden doordat morfologische structuren gekwantificeerd kunnen worden op basis van functionele informatie verkregen door specifieke kleuringen. Technieken zoals CLEM geven daarom de handvatten om licht- en elektronen microscopie data bruikbaar en toegankelijk te maken voor datamining en voor gebruik binnen andere studies nu en in de toekomst.

References

- [1] W. C. Aird, *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. structure, function, and mechanisms*, *Circ Res* **100**, 158 (2007).
- [2] E. R. Weibel and G. E. Palade, *New cytoplasmic components in arterial endothelia*, *J Cell Biol* **23**, 101 (1964).
- [3] T. Nightingale and D. Cutler, *The secretion of von willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story*, *J Thromb Haemost* **11 Suppl 1**, 192 (2013).
- [4] D. D. Wagner, J. B. Olmsted, and V. J. Marder, *Immunolocalization of von willebrand protein in weibel-palade bodies of human endothelial cells*, *J Cell Biol* **95**, 355 (1982).
- [5] K. M. Valentijn and J. Eikenboom, *Weibel-palade bodies: a window to von willebrand disease*, *J Thromb Haemost* **11**, 581 (2013).
- [6] R. H. Huang, Y. Wang, R. Roth, X. Yu, A. R. Purvis, J. E. Heuser, E. H. Egelman, and J. E. Sadler, *Assembly of weibel-palade body-like tubules from n-terminal domains of von willebrand factor*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 482 (2008).
- [7] J. A. Berriman, S. Li, L. J. Hewlett, S. Wasilewski, F. N. Kiskin, T. Carter, M. J. Hannah, and P. B. Rosenthal, *Structural organization of weibel-palade bodies revealed by cryo-em of vitrified endothelial cells*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17407 (2009).
- [8] L. F. van Driel, J. A. Valentijn, K. M. Valentijn, R. I. Koning, and A. J. Koster, *Tools for correlative cryo-fluorescence microscopy and cryo-electron tomography applied to whole mitochondria in human endothelial cells*, *Eur J Cell Biol* **88**, 669 (2009).
- [9] R. D. Starke, K. E. Paschalaki, C. E. Dyer, K. J. Harrison-Lavoie, J. A. Cutler, T. A. McKinnon, C. M. Millar, D. F. Cutler, M. A. Laffan, and A. M. Randi, *Cellular and molecular basis of von willebrand disease: studies on blood outgrowth endothelial cells*, *Blood* **121**, 2773 (2013).
- [10] J. W. Wang, E. A. Bouwens, M. C. Pintao, J. Voorberg, H. Safdar, K. M. Valentijn, H. C. de Boer, K. Mertens, P. H. Reitsma, and J. Eikenboom, *Analysis of the storage and secretion of von willebrand factor in blood outgrowth endothelial cells derived from patients with von willebrand disease*, *Blood* **121**, 2762 (2013).
- [11] A. Rigort, F. J. Bauerlein, E. Villa, M. Eibauer, T. Laugks, W. Baumeister, and J. M. Plitzko, *Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4449 (2012).

