

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/23937> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Liu, Zhen

Title: Exploring the interplay between TGF- β and VEGF signalling in endothelial cell function

Issue Date: 2014-02-18

Nederlandse samenvatting

Nieuwe bloedvaten ontstaan uit reeds bestaande als tijdens de ontwikkeling van nieuwe weefsels de toevoer van zuurstof en voedingsstoffen en de afvoer van afvalstoffen beperkt wordt door diffusie (bekend als angiogenese). Endotheel cellen ontspruiten dan uit de moeder-vaten en vertakken zich in beginnende nieuwe vaten wanneer ze geactiveerd en beïnvloed worden door vasculaire groeifactoren. Voor stabilisatie van de nieuw gevormde vertakkingen worden vervolgens pericyten en vasculaire gladde spiercellen (murale cellen) gerecruiteerd. De primaire vasculaire plexus wordt gehermodelleerd via een zeer hiërarchische vasculaire genealogie. Waar angiogenese normaal gesproken gunstig is tijdens bijvoorbeeld wondheling en zwangerschap, is het zelfs een vereiste voor ontwikkeling. Abnormale angiogenese daarentegen wordt gerelateerd aan talrijke vasculaire afwijkingen zoals tumor-angiogenese, atherosclerose, hypertensie en ander cardiovasculaire aandoeningen.

De transforming growth factor (TGF)- β signaaltransductie route speelt een belangrijke rol in angiogenese. Het is aangetoond in genetische studies en *in vitro* celweeke modellen dat TGF- β signaaltransductie effect heeft op de functie van zowel endotheel als murale cellen. In volwassenen leidt aberratie in de TGF- β signaaltransductie cascade tot een abnormale hermodellering en maturatie van de primitieve vasculaire plexus en een verlaging van de integriteit van de vaatwand. Gerichte deletie van TGF- β signaleringsreceptoren in muizen, zoals ALK1, ALK5, T β RII of endoglin, resulteert in embryonale lethaliteit door verstoorde vasculaire ontwikkeling. In mensen worden mutaties in ALK1, ALK5, T β RII of endoglin geassocieerd met humane vasculaire ziekten zoals hereditaire hemorragische telangiectasia (HHT) en pulmonaire hypertensie (PAH). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is een multifunctioneel molecuul betrokken bij de groei en hermodellering van bloedvaten. In genetische muismodellen ontstaat op vergelijkbare wijze embryonale lethaliteit of ernstige vasculaire afwijkingen wanneer er sprake is van misregulatie in VEGF signaaltransductie. Verstoring in VEGF signaaltransductie in mensen draagt tevens bij aan de pathologie van tumor-angiogenese en cardiovasculaire aandoeningen.

In dit proefschrift wordt de interferentie tussen de signaaltransductie routes van TGF- β en VEGF, het effect van bone morphogenic protein (BMP)-9 op endotheelcel functie, en de rol van endoglin in VEGF-geïnduceerde angiogenese gekarakteriseerd. De resultaten van deze studies kunnen ons inzicht geven in de angiogenese-gerelateerde effecten van deze twee signaaltransductie cascades op endotheel cel functie, wat van toegevoegde waarde is voor het begrijpen van de etiologie van bepaalde vasculaire afwijkingen en de ontwikkeling van nieuwe behandelmogelijkheden in de toekomst.

De belangrijkste bevindingen in dit proefschrift zijn:

- Inhibitie van de TGF- β type I receptor door een farmaceutische kinase inhibitor versterkt VEGF-geïnduceerde angiogenese zowel *in vitro* als *in vivo*. Interferentie tussen TGF- β en VEGF leidt tot een inductie van de expressie van pro-angiogeen integrin $\alpha 5$. [Hoofdstuk 2]
- BMP-9 is een krachtige stimulator van ALK1 signaaltransductie in endotheelcellen en blokkeert VEGF-gestimuleerde angiogenese in hoge dosering. [Hoofdstuk 3]
- BMP-9 gaat een directe binding aan met endoglin en geeft een sterke inductie van endoglin expressie op transcriptieel niveau. [Hoofdstuk 3]
- Endoglin is noodzakelijk voor VEGF-geïnduceerde angiogenese in endotheelcellen. VEGF-geïnduceerde endotheelcel-ontspruiting is gereduceerd in endotheelcellen met een endoglin-specifieke knockdown, maar gereduceerde endoglin expressie heeft geen effect op de belangrijkste VEGF-geïnduceerde signaaltransductie routes. [Hoofdstuk 4]
- Het ontbreken van endoglin verhindert hermodellering van vasculaire structuren in embryoid bodies, maar heeft geen effect op endotheelcel differentiatie in embryoid bodies. [Hoofdstuk 4]
- ‘Shedding’ (verwijdering van het actieve gedeelte van het molecuul van het celmembraan) van endoglin wordt deels gereguleerd door MMP14. [Hoofdstuk 5]
- De oplosbare vorm van endoglin heeft een remmend effect op VEGF-geïnduceerde angiogenese. [Hoofdstuk 5]

Ons onderzoek demonstreert dat endotheelcel functie en angiogenese zowel *in vitro* als *in vivo* beïnvloed wordt door interferentie tussen VEGF en TGF- β signaaltransductie op receptor niveau. Met andere woorden, deze twee signaalroutes werken op een gecoördineerde manier samen (ook met andere routes) om zodoende de balans tussen endotheelcel functie en de optimale angiogene *output* te behouden via de regulatie van genexpressie. Zodra deze balans wordt verstoord, worden wijzigingen in het genexpressie profiel geïnduceerd, gevolgd door aanpassingen in de celmorfologie en eveneens in celfuncties zoals proliferatie en migratie. Deze veranderingen hebben invloed op endotheelcel functie en de vorming van vaten. Als gevolg hiervan zal de vasculatuur zich vormen naargelang de veranderingen in signalering.

De studies beschreven in dit proefschrift geven verdere bevestiging van de cruciale rol van TGF- β in de functie van het endotheel en voorziet in enkele nieuwe moleculair-mechanistische inzichten. TGF- β signaaltransductie in endotheelcellen verloopt via binding aan twee verschillende TGF- β type I receptoren, ALK1 en ALK5. Deze twee receptoren hebben een andere uitwerking op het gedrag van de endotheelcel, afhankelijk van het lokale milieu waarin de cel zich bevindt. Activatie van ALK1 door BMP-9 leidt tot remming van VEGF-geïnduceerde angiogenese, echter, inhibitie van ALK5 met farmacologische stoffen resulteert in een versterking van het vasculaire netwerk, gestimuleerd door VEGF.

Endoglin, een TGF- β co-receptor, wordt reeds lang bestudeerd en beschouwd als een belangrijk angiogeen molecuul. In dit proefschrift wordt bewezen dat endoglin noodzakelijk is voor efficiënte VEGF-geïnduceerde angiogenese, wat nogmaals de relatie tussen de VEGF en TGF- β signaaltransductie routes in endotheelcel functie onderstreept. Bovendien demonstreren wij dat oplosbaar endoglin (sol-Eng) en een endoglin neutraliserend antilichaam functioneren (TRC105) als een remmer van VEGF-geïnduceerde angiogenese (*hoofdstuk 4*). Sol-Eng beïnvloedt het angiogene potentieel van endotheel cellen negatief en gevonden is dat een stijging van het niveau van sol-Eng is geassocieerd met disfunctie van endotheelcellen in zwangere vrouwen met hypertensie en pre-eclampsie. Interessant hierbij is dat afwijkende concentraties van oplosbaar fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), ook bekend als de oplosbare vorm van de VEGF receptor, ook bijdragen aan het ontstaan van pre-eclampsie. Dit is opnieuw een duidelijke indicatie van het samenspel tussen deze twee signaaltransductie routes, en van hun noodzakelijkheid in het onderhouden van de endotheelcel homeostase. De mogelijkheid tot het detecteren van circulerend sol-Eng en sFlt-1 beloven dan ook een belangrijke bijdrage te leveren aan het in een vroeg stadium kunnen diagnosticeren van pre-eclampsie in patiënten.