



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Endothelial glycocalyx hyaluronan biosynthesis and function in microcirculation

Wang, G.

Citation

Wang, G. (2020, September 2). *Endothelial glycocalyx hyaluronan biosynthesis and function in microcirculation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136087>

Version: 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/1887/136087>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136087> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wang, G.

Title: Endothelial glycocalyx hyaluronan biosynthesis and function in microcirculation

Issue date: 2020-09-02

7

CHAPTER 7

Nederlandse Samenvatting
Curriculum Vitae
List of Publications
Acknowledgements

Nederlandse samenvatting

De cellen die een bloedvat bekleden, het endotheel, blijken een essentiële speler te zijn in regulatie van vasculaire homeostase en vasculaire integriteit. Als barrière tussen de bloedstroom en de onderliggende organen, heeft het endotheel een vitale positie en kan het reageren op fysieke en chemische signalen door de productie van factoren die vasculaire tonus, cel adhesie, trombus-resistentie, gladde spiercel proliferatie en ontsteking reguleren. Het endotheel is bedekt door een glycocalyx laag, een gel-achtige suikerlaag, bestaande uit de glycosaminoglycanen heparaan sulfaat (HS), hyaluronan (HA) en chondroïtine sulfaat, en gebonden eiwitten. Deze glycocalyx laag speelt een belangrijke rol in de functie en integriteit van het endotheel en beschadiging van de glycocalyx is geassocieerd met verscheidene vasculaire complicaties.

Samenvatting van de onderzoeksbevindingen

Endotheel cellen zijn zowel aan de kant van het bloedvat (lumen) als aan de kant van het orgaan (abluminaal) bedekt door een glycocalyx laag, deze bestaat uit proteoglycanen, glycosaminoglycanen verbonden aan eiwitten, zgn. core-proteïns, en gebonden eiwitten. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat de integriteit van deze laag cruciaal is voor de structuur en functie van de bloedvaten in glomeruli (filterelementen van de nier). Wij hebben een endotheel specifieke en induceerbare deletie in muizen gegenereerd van het hyaluronan synthase 2 enzym (Has2), waarbij dit enzym dat voornamelijk verantwoordelijk is voor de productie van HA door endotheelcellen wordt uitgeschakeld. Vier weken na inductie van de endotheel specifieke Has2-deletie laat zien dat ongeveer 80% van het glomerulair lumaal HA is gereduceerd. Afwezigheid van voldoende HA aan het oppervlak van deze endotheel cellen leidt tot activatie van de naastliggende mesangiale cellen en het opblazen van de haarvaten (capillairen), wat leidde tot micro-albuminurie (eiwit lekkage in de urine). Na verloop van tijd zorgde dit proces voor vermindering van het aantal aan glomerulaire capillairen en verlittekening van de glomeruli, wat vergelijkbaar is met het fenotype van progressieve humane diabetische nefropathie. Daarnaast observeerden we een verlies van glomerulair HA in het endotheel van nierbiopten van patiënten met diabetische nefropathie. De mechanistische oorzaak hiervan is dat HA een specifieke bindingsplek heeft voor een cruciale regulator van endotheel stabilisatie en glomerulaire barrière functie, namelijk angiopoietine 1 (Ang1), een ligand van de endotheliale receptor Tie-2 kinase. Wij laten zien dat bij verlies van endotheliaal HA er verstoring plaats vindt van Tie-2 kinase afhankelijke activatie waardoor glomerulaire endotheel cel destabilisatie volgt. Glomerulair HA is daarmee een belangrijke extracellulaire

matrix component, die noodzakelijk is voor glomerulaire structuur en functie, die verloren gaat in diabetes nefropathie.

Het verlies van de endotheliale glycocalyx leidt tot verlies van vaatstabiliteit in specifieke microcirculatoire gebieden, zoals in de nier en het netvlies (retina), en dit verlies van HA in de glycocalyx is karakteristiek voor diabetes. Omdat de glycocalyx ook de endotheliale sensor en conductor is van de krachten van het stromende bloed, shear stress of stroomweerstand, hebben we in **hoofdstuk 3** de invloed van de verstoring van de stroomweerstand op de glycocalyx onderzocht in de context van vasculaire infarcten (ischemie). We vonden dat in endotheliale Has2-deletie muizen verminderde HA bedekking gepaard ging met een lagere achterbeen perfusie terwijl de capillaire densiteit in bijvoorbeeld de kuitspier (*m. gastrocnemius*) even hoog was. Na een enkele ligatie van de *a. femoralis communis* in deze muizen, observeerden we een disregulatie van het angiogenese proces in de *m. gastrocnemius* wat een reductie in de perfusie veroorzaakte ten opzichte van de controles. Om dit te verklaren hebben we aangetoond dat er in deze aangedane spieren een verminderde binding van Ang1 geproduceerd door pericyten was in de capillairen van Has2-deletie muizen. *In vitro* endotheel proeven met endotheel-pericyt co-kweek bevestigden de verstoorde Ang1-Tie2 signalering en excessieve angiogenese wanneer oppervlakte HA werd vermindert door middel van RNA-blokkade van *HAS2*. Deze data kan relevant zijn voor patiënten met diabetes, waarbij we verlies van endotheliale HA in de microcirculatie van de spieren in de onderbenen laten zien. Het indiceert dat dit bijdraagt aan de verstoring in ischemie herstel. Samengevat destabiliseert het verlies van endotheliale HA de onderlinge endotheel contacten door verlies van Ang1-Tie2 signalering, wat de endotheliale stabiliteit en micro-vasculaire perfusie verstoort. Endotheliale HA is derhalve een potentieel doelwit voor angiogene-therapie bij patiënten met ernstige ischemie van de benen.

Uit **hoofdstuk 2 en 3** kunnen we concluderen dat de HA biosynthese cruciaal is voor vaatstabiliteit. De productie en het onderhoud van deze glycocalyx HA laag is afhankelijk van de intracellulaire suiker synthese, maar hoe dit gereguleerd wordt was onbekend. In **hoofdstuk 4** beschrijven we proeven die verklaren hoe de synthese van HA is gereguleerd door de invloed van de stroomweerstand. Zowel *in vitro* als *in vivo*, wordt HA expressie op het endotheliale oppervlak verhoogd door laminaire (constante) stroom en vermindert als cellen in aanraking komen met een verstoorde (oscillatoire) bloedstroom. Door het gebruik van een CRISPR-CAS9 techniek om een tetracycline label aan het endogeen *HAS2* DNA toe te voegen, konden we aantonen dat de laminaire stroom gepaard gaat met verhoogde synthese van HA en dat *HAS2* zich verplaatst naar het endotheliale celmembraan. Dit is afhankelijk van verhoogde expressie

van het Krüppel-Like Factor 2 (KLF2) een transcriptiefactor dat aanstaat wanneer de laminaire stroom weerstand door de endotheel cel wordt gevoeld. Verder laten we zien dat de HA productie door HAS2 afhankelijk is van de beschikbaarheid van de HA substraten UDP-glucosamine en UDP-glucuronzuur, twee glucose metabolieten. Met behulp van NMR technieken met ^{13}C -gelabeld glucose laten we zien dat de bekende KLF2 regulatie van het enzym 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3), de belangrijkste glycolyse activator, ervoor zorgt dat glucose tussenproducten ook naar het hexosamine- en de glucuronzuur biosynthese paden worden gestuurd. Dit zorgt ervoor dat de beschikbaarheid van de HA substraten in de cel toeneemt. Deze data laten zien hoe de endotheliale glycocalyx functie en functionele adaptatie aan de stroomweerstand gekoppeld is aan KLF2 gemedieerde regulatie van endotheliale glycolyse.

Om te bevestigen dat de regulatie van HA biosynthese de endotheel functie kan herstellen bij ziekte door het veranderen van de endotheliale glycolyse, hebben we de metabole regulatie van HA synthese in tumor endotheel cellen onderzocht in **hoofdstuk 5**. Het endotheel van de bloedvaten in melanoom metastasen in de lever wordt gekarakteriseerd door een verhoogde glycolyse en gaat gepaard met afname van lumaal endotheliaal HA. Wij laten zien dat deze verhoogde glycolyse in tumor endotheel direct de glucose flux naar de hexosamine en glucuronzuur biosynthese paden negatief beïnvloed en dus de intracellulaire concentraties van de HA substraten UDP-GlcA en UDP-GlcNAc verlaagd, wat de endotheliale HA synthese verstoort. Repriorisatie van HA synthese substraten naar de glycolyse de verhoogde activiteit van de glycolytische activator PFKFB3. Deze data wordt verder ondersteunt door de bevinding dat tumorvaten in muizen die haplo-insufficiënt zijn voor PFKFB3 in endotheel cellen een normale endotheliale HA glycocalyx hebben met daarbij normale angiopoietine signalering en vaatstabiliteit. Deze bevindingen laten de directe link zien tussen glucose flux, glycocalyx synthese en vaatstabiliteit in tumor endotheel, wat opnieuw suggereert dat restauratie van de endotheliale glycocalyx functie door manipulatie van de glycolyse een mogelijkheid kan zijn voor vaat stabilisatie en normalisatie.

Toekomstperspectieven

In dit proefschrift hebben we laten zien dat endotheliale HA een kritieke rol speelt in de integriteit van de endotheliale glycocalyx en daarmee ook endotheel homeostase. Vermindering van endotheliaal HA synthese leidt tot vasculaire destabilisatie, wat de Ang1/Tie2 signalering verstoort. HA biosynthese is afhankelijk van de metabole staat van de endotheel cel, zoals is aangetoond bij laminaire stroom weerstand en hyper-glycolytische condities in tumor weefsel. Het endotheel metabolisme blijkt een

belangrijk nieuw doelwit voor de normalisatie en stabilisatie van de functie van het endotheel. Verder hebben wij ook laten zien dat er verlies optreedt van endotheliaal HA in biopten van de nieren van diabetisch nefropathie patiënten en onderbeen spierweefsel van diabeten met ernstige ischemie. Echter de precieze regulatie van HA biosynthese in diabetes is nog steeds onbekend. Voor het ontrafelen van het dynamische proces van het HA metabolisme, met zowel biosynthese als degradatie, moeten er nieuwe methoden ontwikkelt worden om de HA flux te meten, om zo de verandering in HA metabolisme in ziekte te begrijpen. Hoe men efficiënt en veilig zou kunnen ingrijpen in het endotheel metabolisme en de endotheliale HA expressie, voor de behandeling van vasculaire complicaties bij diabetes, is een belangrijke vraag voor wetenschappers in de toekomst.