



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Angiogenesis, proteases and angiogenic factors during the inception of pregnancy. Crucial contributors or trivial bystanders?**

Plaisier, G.M.

### **Citation**

Plaisier, G. M. (2008, May 7). *Angiogenesis, proteases and angiogenic factors during the inception of pregnancy. Crucial contributors or trivial bystanders?*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12861>

Version: Corrected Publisher's Version

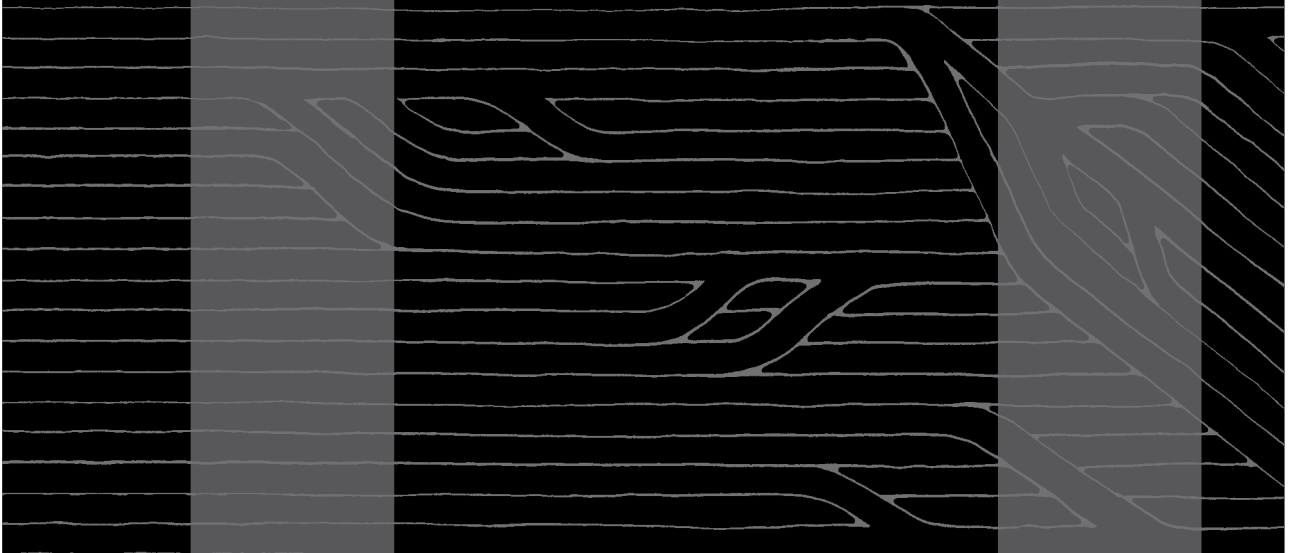
License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12861>

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

# Chapter 11

Summary & Samenvatting





## SUMMARY

Endometrial angiogenesis is indispensable for the formation of a richly vascularised receptive endometrium and decidua. The endometrium is a unique tissue which undergoes rapid remodelling during each menstrual cycle. During the secretory phase endometrial receptivity is enhanced by stimulation of oestradiol and progesterone. This process is called pre-decidualisation. By secretion of prostaglandin, cytokines and hCG the blastocyst will further induce decidualisation of the endometrium at the implantation site, and eventually throughout the endometrium. Vascularisation during decidualisation and in the decidua is of importance for the success of the embryo-maternal interaction. Disturbances in vascular development may play an important role in pathologies during pregnancy. For instance, early pregnancy wastage, pre-eclampsia (PE) and foetal growth restriction (FGR) are disorders associated with impaired angiogenesis.

Angiogenesis is a multi-step process involving degradation of the basal membrane, activation, migration and proliferation of endothelial cells and finally the formation of capillaries and the recruitment of pericellular smooth muscle cells. Numerous factors are involved in these processes, e.g. vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PlGF), angiopoietins and proteases, each of which can regulate the process in different ways. Pericellular proteolysis plays an important role in angiogenesis being required for endothelial cell migration, invasion and tube formation. Key regulators of proteolysis belong to the family of matrix metalloproteinases (MMPs), in particular to the subgroup of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs), and to the plasmin/plasminogen system. However, neither the timing of vascular growth during the menstrual cycle and implantation, nor the mechanisms by which vessels are formed are currently completely understood.

In **Chapter 2** we studied the expression of MMPs and urokinase-type plasminogen activator (uPA) by human endometrial microvascular endothelial cells (hEMVEC) and their involvement in the formation of capillary tubes. We demonstrated that both uPA/plasmin and MMPs, expressed by hEMVEC, contribute to the invasion and tubular structure formation of hEMVEC in 3D fibrin matrices. MT<sub>1</sub>-, MT<sub>2</sub>- and MT<sub>3</sub>-MMP are known inducers of capillary-tube formation and their mRNA levels increase during tube formation *in vitro*. Experiments with overexpression of MMP inhibitors (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) -1 and -3), which are also expressed by endometrial endothelial cells *in vivo*, indicated that hEMVEC utilise a unique pattern of MT-MMPs during angiogenesis compared to endothelial cells originating from other tissues. The relative high expression of MT<sub>3</sub>-MMP mRNA in hEMVEC, the presence of MT<sub>3</sub>-MMP protein on endometrial endothelial cells and the inhibition of capillary tube formation by

inhibiting MT<sub>3</sub>-MMP are strongly in favour of a contribution of MT<sub>3</sub>-MMP in capillary-like tube formation by hEMVEC. This was a striking finding, since up to now MT<sub>1</sub>-MMP was thought to be the most important MT-MMP involved in angiogenesis.

Although membrane-type-3 metalloproteinase (MT<sub>3</sub>-MMP) appeared associated with endometrial capillary-like tube formation *in vitro*, the involvement of MT-MMPs with endometrial angiogenesis *in vivo* is unknown. **Chapter 3** describes the presence of MT-MMPs (MT<sub>1</sub>-MMP to MT<sub>6</sub>-MMP) in human endometrium and their correlation with endometrial neovascularisation. The various MT-MMP antigens were expressed in the various cell types of the endometrium. Their presence was decreased during the early secretory phase, which might suggest a contribution to the generation of a stable environment in preparation for embryonic implantation. Only MT<sub>2</sub>-, MT<sub>3</sub>- and MT<sub>4</sub>-MMP antigens were expressed by endothelial cells. Strikingly, this vascular expression of MT<sub>2</sub>- MT<sub>3</sub>- and MT<sub>4</sub>-MMP correlated with angiogenic episodes of the cycle. These findings support earlier *in vitro* data on the regulatory role of MT<sub>3</sub>-MMP in endometrial angiogenesis. Additionally, MT<sub>2</sub>-MMP appears to be associated with endometrial neovascularisation as well.

Whereas the previous chapters concentrate on endometrial angiogenesis, **Chapters 4-8** focus on decidual angiogenesis. We demonstrated in **Chapter 4** that the human blastocyst is able to stimulate *in vitro* angiogenesis via the production of significant amounts of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). This inducing effect was counteracted by adding soluble VEGF-R<sub>1</sub> (flt-1). Other mediators, which have been described as produced by the early embryo/trophoblast, had no effect on tube formation by hEMVEC. This confirmed the hypothesis that VEGF-A plays a key role during early pregnancy and supports the finding that VEGF-A expression is reduced in trophoblastic tissue and in maternal endometrium of recurrent miscarriage cases.

**Chapter 5** evaluates vascular adaptation to implantation by studying vascularisation and angiogenic factors in decidual secretory endometrium (DSE) decidua parietalis (DP), and basalis (DB) of first-trimester pregnancies. The vascularisation pattern differed among the three tissues, for example an enhanced vascular and luminal surface and reduced vessel density were found at the implantation site. This raised questions regarding the regulation of decidual vascularisation. Comparing the three tissues provided information about the regulation of vascularisation and showed that both pregnancy-induced hormones and extra-villous trophoblast (EVT) influenced vascularisation.

The observed vascular differences were also correlated to the differential expression of angiogenic factors. VEGF-A mRNAs and proteins were abundantly, but not differentially, expressed in all decidual tissues and KDR, flt-1 and VEGF-A proteins were expressed on

endothelium of both DB and DP. These findings suggest a role for VEGF-A in supporting decidual angiogenesis throughout implantation and further confirm the hypothesis of VEGF-A being an important factor during implantation.

Other mediators, like PlGF and the angiopoietins, appeared to have a specific role at the implantation site. These factors may, partially, account for the vascular changes at the site of embryonic implantation in decidua basalis.

Proteolysis is essential for decidual development during embryonic implantation. Therefore, the decidual expression of pericellular proteases was studied in **Chapter 6**. The expression of MT-MMPs and urokinase/urokinase receptor (uPA/uPAR) varied between decidua basalis (DB), decidua parietalis (DP) and decidual secretory endometrium (DSE). This enabled hypothesising about their regulation by pregnancy-induced hormones, immune cells and/or the extra-villous trophoblast (EVT) and their relationship with decidual remodelling, trophoblast invasion and vascularisation. uPAR and MT1-MMP appeared to be regulated by pregnancy-induced hormones and uPA, MT2-, MT3-, and MT5-MMP by EVT. All proteases were expressed by the EVT themselves and might be involved in trophoblast invasion. Furthermore, MT2- and MT3-MMP may also regulate vascularisation at the implantation site.

Additionally, decidual vascularisation and its regulation were compared between early and late first-trimester in **Chapter 5 and 6**. As gestation progresses, vascular adaptation continues and is represented by decreased vessel density and a non-significant increased luminal surface in DB and DP. These vascular changes correlated with increased endothelial expression of PlGF and VEGF-A in late first-trimester. Also, decreased total and endothelial expression of MT1-, MT2- and MT3-MMP proteins were observed in later gestation, which might function in controlling a too destructive infiltration of endothelial cells and extra-villous trophoblasts.

**Chapter 7** describes vascular adaptation to implantation in missed abortions. A significant decreased vessel density and increased luminal surface was demonstrated in DB and DP in decidua of miscarriages. Strikingly, these differences in vascularisation patterns resemble the differences between early and late first-trimester vascularisation, suggesting that too fast maturing vasculature is associated with the pathogenesis of miscarriages.

The vascular differences between missed abortions and controls correlated with the differential expression of angiogenic factor, showing an induction of VEGF-A, VEGF-receptor-1 and -2 (flt-1 and KDR), the angiopoietins Ang-1 and Ang-2, angiopoietin receptor TIE-2, MT2- and MT5-MMP and reduction of MT3-MMP at the implantation site. Furthermore, the endothelial expression of flt1, KDR, MT2- and MT5-MMP antigens were

enhanced in DP and DB of missed abortions cases. Surprisingly, placental growth factor (PlGF), the most regulated factor in uncomplicated first-trimester decidua, appears not to be involved in the pathogenesis of missed abortions.

Differential inflammatory or apoptotic events, in response to foetal death, were excluded in our specimens, since cases and controls showed equal amounts of proliferation and apoptosis and comparable numbers of uNK cells in DP and DB. However, uterine natural killer (uNK) cells numbers were significantly increased in DSE. Most reports on the relation of uNK cells to miscarriages describe increased numbers of uNK cells in receptive endometrium of patients with recurrent miscarriages (RM). The abundant presence of uNK cells in our DSE samples may reflect these observations.

Current knowledge suggests that the pathogenesis of pre-eclampsia (PE) includes defective vascular remodelling of maternal spiral arteries, non-invasion of trophoblasts, placental insufficiency and ischemia and that foetal growth restriction (FGR) has been proposed to originate from defective angiogenic factor expression and angiogenesis in placental villi in response to relatively high oxygen levels.

Whether decidual angiogenesis is also affected was studied in **Chapter 8**. We showed the differential mRNA expression of various angiogenic factors in first-trimester decidua of third-trimester PE and FGR patients compared to matched controls. The expression of VEGF-A, PlGF, KDR, Ang-1, Ang-2 and TIE-2 appeared unregulated in FGR cases and PlGF, Ang-1 and TIE-2 appeared upregulated in PE cases. Significance was not reached, which is probably due to the large inter-individual variation. This is rather normal for a pilot study but restricts data interpretation. However, the 10- to 100-fold gene induction in these small groups promises significant differences in expanded groups. The early first-trimester changes in angiogenic factor expression may well occur as a compensatory mechanism, but in turn may unintentionally induce increased non-branching angiogenesis, altered decidual and placental vascularisation and insufficiency that result in PE and/or FGR during late gestation.

In **Chapter 9** the results of the studies of this thesis are discussed. The obtained knowledge generated through this thesis adds to a better understanding of physiologic and pathologic conditions regarding menstruation and pregnancy. Additionally, recommendations for future research are given. **Chapter 10** provides a final conclusion.

## SAMENVATTING

Angiogenese is essentieel voor het ontstaan van een zwangerschap, omdat het zorgt voor het ontstaan van een rijk gevasculariseerd en receptief endometrium dat toegankelijk is voor implantatie van de blastocyst. Het endometrium is een uniek weefsel, dat gedurende elke menstruele cyclus enorme veranderingen doormaakt. De receptiviteit van het endometrium wordt gedurende de secretoire fase van de cyclus gestimuleerd door progesteron en oestradiol. Dit proces wordt pre-decidualisatie genoemd. De blastocyst zal daarna op de plaats van implantatie verdere decidualisatie induceren door het lokaal uitscheiden van prostaglandinen, cytokinen en hCG. Uiteindelijk zal het gehele endometrium decidualiseren. Dit wordt gekarakteriseerd door oedeem en de extravasatie van macromoleculen ter bevordering van de receptiviteit. Daarnaast is voldoende vascularisatie belangrijk voor het succes van de implantatie. Verstoringen in de vasculaire ontwikkeling lijken een rol te spelen bij het ontstaan van zwangerschapscomplicaties, zoals miskraam, pre-eclampsie (PE) en intrauteriene groeivertraging (IUGR).

Angiogenese is een proces dat uit verschillende stappen bestaat, te weten degradatie van de basaalmembraan; activatie, migratie en proliferatie van endotheelcellen; en uiteindelijk de formatie van capillairen en het aantrekken van peri-vasculaire gladde spiercellen. Verschillende factoren zijn betrokken bij de regulatie van deze processen, zoals vascular endothelial growth factor (VEGF-A), placental growth factor (PlGF), angiopoietinen en proteases. Daarnaast speelt peri-cellulaire proteolyse een belangrijke rol in het angiogenese proces. Het is noodzakelijk voor endotheelcel-migratie, -invasie en capillairvorming. Belangrijke regulatoren van proteolyse zijn het plasminogeen activator/plasmine systeem, met onder meer urokinase (uPA) en zijn receptor (uPAR), en de matrix metalloproteïnases (MMPs), in het bijzonder de membraangebonden MMPs (MT-MMP's).

Zowel de manier waarop nieuwe vaten worden gevormd als de timing van vasculaire groei in de menstruele cyclus en de embryonale implantatie, zijn tot op heden grotendeels onbekend.

In **Hoofdstuk 2** wordt de expressie van MMP's en uPA door humane endometriale micro-vasculaire endotheelcellen (hEMVEC) en hun betrokkenheid bij de vorming van capillairen *in vitro* bestudeerd. Zowel uPA als MMP's blijken een rol te spelen bij het tot stand komen van capillairen door hEMVEC. Naast uPA werden verschillende MMP's aangetroffen in deze cellen.

Het is bekend dat MT1-MMP, MT2-MMP, en MT3-MMP angiogenese kunnen induceren, en dat hun mRNA niveau stijgt tijdens capillairvorming *in vitro*. Een experiment dat gebruikmaakt van twee MMP-remmers (tissue inhibitor of matrix metalloproteïnases



(TIMP-1 en -3)) toonde aan dat hEMVEC een unieke set MT-MMPs voor angiogenese gebruiken in vergelijking met endotheelcellen uit andere weefsels. De relatief hoge expressie van MT<sub>3</sub>-MMP mRNA in hEMVEC, de aanwezigheid van MT<sub>3</sub>-MMP eiwitten op endometrium endotheelcellen en de remming van capillairvorming door anti-MT<sub>3</sub>-MMP wezen allen op een rol van MT<sub>3</sub>-MMP in endometrium angiogenese. Dit was een verrassende observatie, aangezien tot op heden MT<sub>1</sub>-MMP als de belangrijkste MT-MMP in angiogenese werd beschouwd.

MT<sub>3</sub>-MMP lijkt dus geassocieerd met endometriale capillairvorming *in vitro*, maar het is onduidelijk of dit ook *in vivo* het geval is. **Hoofdstuk 3** beschrijft de expressie van MT-MMP's en hun correlatie met vascularisatie in humaan endometrium. Alle MT-MMP's werden aangetoond in diverse celtypen in het endometrium en waren verminderd aanwezig tijdens de vroege secretoire fase van de cyclus. Dit wijst op een bijdrage van MT-MMP's aan de stabilisatie van het endometrium in voorbereiding op de embryonale implantatie. Alleen MT<sub>2</sub>-, MT<sub>3</sub>- en MT<sub>4</sub>-MMP antigenen kwamen tot expressie in endotheelcellen. Deze vasculaire expressie correleerde met angiogene perioden gedurende de menstruele cyclus. Deze bevindingen ondersteunen eerdere data met betrekking tot de rol van MT<sub>3</sub>-MMP in endometrium angiogenese. Bovendien lijkt MT<sub>2</sub>-MMP ook geassocieerd met neovascularisatie in humaan endometrium.

De eerste hoofdstukken beschrijven angiogenese in het endometrium, maar de **Hoofdstukken 4 t/m 8** richten zich op angiogenese in humaan first-trimester decidua. Diermodellen tonen aan dat het embryo zijn implantatie voorbereidt door het stimuleren van angiogenese, voordat sprake is van fysiek contact tussen embryo en endometrium. In **Hoofdstuk 4** wordt aangetoond dat de humane blastocyst in staat is tot het stimuleren van *in vitro* angiogenese door de productie van significante hoeveelheden VEGF-A. Dit effect kon worden geremd door toevoeging van oplosbaarflt-1. Eerder werd al aangetoond dat VEGF-A één van de eerste genen is die geactiveerd wordt tijdens de embryonale ontwikkeling in de pre-implantatie periode. De hypothese dat VEGF-A een sleutelrol vervult bij het tot stand komen van een jonge zwangerschap wordt verder bevestigd door de observatie dat de VEGF-A expressie in trofoblastweefsel verminderd is in endometrium van patiënten met herhaalde miskramen.

**Hoofdstuk 5** bestudeert de aan implantatie gerelateerde vasculaire veranderingen. Daartoe werden het vaatpatroon en de expressie van angiogene factoren bepaald in 1<sup>o</sup> trimester decidaal secretoir endometrium (DSE), decidua pariëtalis (DP), en decidua basalis (DB). Deze deciduale weefsels toonden een verschillend vaatpatroon. Zo toonde decidua basalis, de plaats van implantatie, een toegenomen totale vasculaire oppervlakte in vergelijking met DP en DSE.

Het vergelijken van de drie weefsels toonde dat zowel zwangerschapsgeïnduceerde hormonen als de extravillieuze trofoblast (EVT) vascularisatie beïnvloeden. Welke mediators betrokken zijn bij de regulatie van deze vasculaire veranderingen in de verschillende typen decidua werd bestudeerd in **Hoofdstuk 5**. VEGF-A mRNA en proteïnen kwamen uitbundig tot expressie in alle typen decidua. VEGF-A proteïnen zowel als de receptoren voor VEGF-A, KDR en flt-1, werden aangetroffen op endotheelcellen in zowel DB als DP. VEGF lijkt dus angiogenese te ondersteunen in alle onderzochte decidua-typen. Dit bevestigt wederom de hypothese dat VEGF-A een belangrijke rol speelt in het implantatieproces.

Andere mediators, zoals placental growth factor (PlGF) en de angiopoïetinen, kwamen verhoogd tot expressie in decidua basalis (DB). Zij lijken dus specifiek een rol te spelen bij vascularisatie op de plaats van implantatie en zijn dus mogelijk medeverantwoordelijk voor de vasculaire veranderingen in decidua basalis.

Proteolyse is belangrijk voor de ontwikkeling van decidua. De expressie van pericellulaire proteases in decidua werd daarom bestudeerd in **Hoofdstuk 6**. Ook de regulatie door zwangerschapshormonen, immuuncellen en de EVT, en de relatie tot trofoblastinvasie en vascularisatie werden beschreven. De drie typen decidua toonden verschillende hoeveelheden MT-MMPs, urokinase-type plasminogeen activator (uPA) en uPA receptor (uPAR). MT1-MMP en uPAR bleken gereguleerd te worden door zwangerschapshormonen; uPA, MT2-, MT3- en MT5-MMP door EVT. Alle proteases kwamen tot expressie in EVT en spelen mogelijk een rol bij trofoblastinvasie. Daarnaast lijken MT2- en MT3-MMP ook de vascularisatie te reguleren in decidua basalis.

In **Hoofdstuk 5 en 6** wordt vascularisatie vergeleken in vroege en late 1<sup>e</sup> trimester zwangerschappen. Naarmate de zwangerschap vordert worden de aan implantatie gerelateerde vasculaire veranderingen steeds duidelijker, zoals een verminderde vaatdichtheid en een verhoging van lumen-oppervlakte in DB en DP. De veranderingen in het vaatbed correleren met een verhoogde expressie van PlGF en VEGF-A in endotheelcellen. Verder bleken de expressies van MT1-, MT2- en MT3-MMP in verschillende celtypen, inclusief endotheelcellen, verminderd in de late 1<sup>e</sup> trimester groep. Dit heeft mogelijk een functie in het controleren van de destructieve infiltratie van endotheel- en trofoblastcellen.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de vasculaire aanpassingen aan implantatie in missed abortions (MA) in vergelijking met ongecompliceerde zwangerschappen. Een significant afgenomen vaatdichtheid en lumen-oppervlakte werden aangetoond in DB en DP van missed abortions. De verschillen in vaatpatronen tussen MA en controles zijn vergelijkbaar met de gevonden verschillen tussen vroege en late first-trimester zwangerschappen. Dit kan duiden op het te vroeg uitrijpen van het vaatbed in MA.

De verschillen op vasculair gebied correleren met verschillende expressie van angiogene factoren. MA decidua toonde een verhoogde expressie van VEGF-A, VEGF receptor-1 en -2 (flt-1, KDR), de angiopoietinen Ang-1 and Ang-2, angiopoietine receptor TIE-2 MT2- en MT3-MMP en verlaagde expressie van MT3-MMP in decidua basalis. Verder bleek de expressie van flt-1, KDR, MT2- en MT5-MMP verhoogd in endotheelcellen in DB en DP van MA. PlGF, de meest gereguleerde factor in ongecompliceerde zwangerschappen, lijkt niet betrokken bij de pathogenese van MA.

De mogelijkheid dat de verschillen tussen beide groepen veroorzaakt worden door ontsteking en apoptose in reactie op foetale dood lijkt verworpen te kunnen worden. De missed abortion en de controle groep tonen namelijk vergelijkbare apoptose-, proliferatie- en ontstekingsparameters. Alleen het aantal uNK cellen in DSE was significant verhoogd in missed abortions. Enkele publicaties over de relatie van uNK cellen met miskramen wijzen op een verhoogd aantal uNK cellen in receptief endometrium van patiënten met herhaalde miskramen. De verhoogde aanwezigheid van NK cellen in DSE zou dit kunnen weerspiegelen.

Recente inzichten suggereren dat pre-eclampsie is geassocieerd met verstoorde remodelling van maternale spiraalarteriën, gevolgd door non-invasie van trofoblasten, placenta-insufficiëntie en ischemie. Intrauteriene groeivertraging (IUGR) lijkt te worden veroorzaakt door relatieve hyperoxie, gevolgd door angiogenese en expressie van angiogene factoren in villi. Of ook deciduale angiogenese een rol speelt, wordt onderzocht in **Hoofdstuk 8**. De expressie van angiogene factoren in 1<sup>e</sup> trimester decidua van uiteindelijke PE en IUGR patiënten is vergeleken met de expressie in decidua van een gematchte controlegroep. De expressie van VEGF-A, PlGF, KDR, Ang-1, Ang-2 en TIE-2 was verhoogd in IUGR, en de expressie van PlGF, Ang-1 en TIE-2 was verhoogd in PE. Vanwege de grote inter-individuele verschillen in deze pilot-studie zijn de bevindingen niet significant. Dit bemoeilijkt de interpretatie, echter de 10-100-maal inductie doet significante verschillen verwachten bij grotere groepen. De 1<sup>e</sup> trimester verschuivingen in de expressie van angiogene factoren lijken te functioneren als een compensatiemechanisme. Dit verstoorde expressiepatroon kan tegelijkertijd non-branching angiogenese veroorzaken, met verstoorde deciduale vascularisatie en PE en IUGR in een later trimester tot gevolg.

In **Hoofdstuk 9** worden de resultaten van deze thesis bediscussieerd, en worden aanbevelingen gedaan voor toekomstig onderzoek. **Hoofdstuk 10** geeft beknopt de conclusies van deze thesis weer.