

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43155> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Gkatzis, K

Title: In vitro and In vivo models for studying endothelial cell development and hereditary hemorrhagic telangiectasia

Issue Date: 2016-09-22

Samenvatting

Over de afgelopen twee decaden, significante vooruitgang is geboekt in het beter begrijpen van moleculaire en cellulaire mechanismen van vasculaire cel ontwikkeling en ziekte. PSC's hebben zich bewezen bruikbaar te zijn en een nieuw terrein om moleculaire mechanismen te bestuderen, betreffende fysiologische endotheelcel ontwikkeling en pathofysiologische staat van ziekte *in vitro*, zoals HHT. Muismodellen met HHT-gerelateerde genmutaties zijn essentieel om ons begrip van ziektemechanismen te vergroten.

Hoofdstuk 2 bestudeert het genereren van knock-in mESC cellijnen om de bi-allelische distributie van Nanog expressie op eiwit niveau te bestuderen. Nanog is een sleuteltranscriptiefactor welke tot expressie komt in pluripotente cellen, en is vereist voor zelf-vernieuwing *in vitro*. We bevonden dat deze knock-in fusie strategie de generatie van functionele Nanog fusie-eiwitten mogelijk maakt, kijkend naar normale eiwit distributie *in vivo* en *in vitro*. Dit zal in de toekomst waardevol zijn voor het maken van genetisch modellen van cardiovasculaire ziektes en reporter lijnen voor oa vasculair celspecificatie op basis van hiPSC.

Hoofdstuk 3 bestudeert de generatie van humane EC's van hESC's, gebruik makend van spin-EB differentiatie benadering. Hoewel significante vooruitgang moet worden geboekt in induceren van endotheel differentiatie vanuit hPSC's, nieuwe methoden zullen bruikbaar zijn om kritische regulatoren die de begeleiden inzet en diversificatie van endotheel voorlopercellen te identificeren en maken van weefselspecifieke EC's mogelijk. De meest recente studies beschrijven dat ETV2 is een van de master regulatoren in EC ontwikkeling. In dit hoofdstuk laten we zien dat EC's stammen van VEGF-behandelde mesodermale populaties, en dat ETV2 expressie wordt verrijkt op dat 4 van de differentiatie in endotheelcel voorlopercellen in zowel PDGFR α ⁺APJ⁺KDR⁺ als PDGFR α ⁺APJ⁺KDR⁺ fracties. Daarnaast hebben we een nieuwe knock-in fusiestrategie ontwikkeld die ons toestaat om non-invasief ETV2-expressing cellen te kwantificeren.

Hoofdstuk 4 beschrijft de eerste humane iPSC cellijnen gemaakt in Nederland: twee van gezonde proefpersonen en een van een HHT patiënt. Deze humane iPSC cellijnen waren gemaakt van fibroblasten van huidbiopten en konden differentiëren tot verschillende celtypen, inclusief kloppende cardiomyocyten indien samengekweekt met viscerale entoderm-achtige END-2 cellen.

Hoofdstuk 5 bestudeert het gebruik van hiPSC-EC als een model om HHT1 *in vitro* te onderzoeken. HHT is een autosomaal-dominante vasculaire aandoening die ontstaat door mutaties in een of twee receptoren in de TGFbeta familie, ENG of ACVRL1, welke vooral tot expressie komen in EC's, en tot respectievelijk HHT1 of HHT2 leiden. We ontdekten dat celdensiteit in kweek gekoppeld worden aan SMAD fosforylatie in hiPSC-ECs en dat ENG haploinsufficiëntie het TGF β signaling kan beïnvloeden. Daarnaast hebben we MTUS1 geïdentificeerd als een nieuw TGF β signaling kandidaat gen welke significant worden zodra ENG levels gereduceerd zijn.

Hoofdstuk 6 bestudeert de rol van Gja5, welke de gap junction eiwit Cx40 encodeert in de ontwikkeling van AVM in het HHT2 muismodel. We identificeerden GJA5 als een downstream target gen van BMP9/ALK1 signaling pathway en vonden gereduceerde Cx40 hoeveelheden in een kleine groep HHT2 patiënten. In *Acvrl1*^{+/-} muizen, Gja5 haploinsufficiëntie leidt tot veranderingen in het capillair bed en vasodilatatie van arteriën waarin ROS productie verhoogd was. We toonden aan dat veranderde hemodynamische krachten in *Acvrl1*^{+/-};Gja5EGFP/+ muizen tijdelijke arterioveneuze shunts in de capillairvaten konden doen ontstaan, terwijl grote malformaties konden worden geïnduceerd bij omgevingsinvloeden