

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

zoals verwondingen.

ΣΥΝΟΨΗ

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, αισθητές προόδους έχουν σημειωθεί για την βέλτιστη κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών της κυτταρικής ανάπτυξης των αγγείων σε φυσιολογικές και ασθενείς συνθήκες. Τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα ή PCs είναι μία χρήσιμη ανανεώσιμη πηγή για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις ασθενειών *in vitro*, όπως η Κληρονομική Αιμοραγική Τηλεαγγειεκτασία (KAT). Ακολουθώς ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με την KAT ασθένεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη αναγνώριση των μηχανισμών της ασθένειας.

Στο **2^ο κεφάλαιο** μελετήθηκε η παραγωγή μίας διαγονιδιακής κυτταρικής σειράς εμβρυονικών βλαστοκυττάρων ή mESCs (εκφράζουν μετάλλαξη τύπου knock-in) με σκοπό τη μελέτη της διαλλειλικής διανομής της έκφρασης του Nanog σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η πρωτεΐνη Nanog είναι ένας βασικός μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται στα πολυδύναμα κύτταρα και είναι απαραίτητη για την αυτο-ανανέωσή τους, *in vitro*. Η χρήση της knock-in τεχνολογίας μας επέτρεψε να πιστοποιήσουμε πως οι πρωτεΐνες Nanog ήταν λειτουργικές αντανακλώντας την φυσιολογική διανομή της πρωτεΐνης *in vivo* και *in vitro*. Η συγκεκριμένη προσέγγιση μπορεί να σταθεί χρήσιμη στο μέλλον για την παραγωγή νέων αγγειακών μοντέλων για τη μελέτη της ασθένειας και κυτταρικών σειρών αναφοράς για προδιαγεγραμμένη αγγειακή γενεαλογία κυττάρων.

Στο **3^ο κεφάλαιο** μελετήθηκε η παραγωγή ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ή ECs από ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα ή hESCs χρησιμοποιώντας την τεχνική διαφοροποίησης τύπου spin-EB. Έχουν σημειωθεί σημαντικές προόδους για την παραγωγή ενδοθηλιακής διαφοροποίησης από ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα ή hPSCs στο παρελθόν, ωστόσο νέες τεχνικές θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμες στο μέλλον για την αναγνώριση των σημαντικών ρυθμιστών που καθορίζουν τη δέσμευση και διαποικίληση των προγόνων του ενδοθηλίου και επιτρέπουν την παραγωγή του συγκεκριμένου ιστού των ECs κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναγνωρίσει το μόριο ETV2 σαν ένα πολύ-ρυθμιστή της ανάπτυξης των ECs κυττάρων. Σε αυτό το κεφάλαιο, αναγνωρίσαμε πως τα ECs κύτταρα προέρχονται από ένα πληθυσμό μεσεγγυματικών κυττάρων τύπου VEGF- και ότι η έκφραση του μορίου ETV2 αυξάνεται σημαντικά κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης στα πρόδρομα των ενδοθηλιακών κυττάρων, πιο συγκεκριμένα στα 2 κλάσματα, PDGFRA⁺APJ⁺KDR⁺ και PDGFRA⁻APJ⁺KDR⁺. Επιπλέον αναγνωρίσαμε μία νέα στρατηγική τύπου knock-in που επιτρέπει τη μη επεμβατική ποσοτικοποίηση των κυττάρων θετικών ως προς την έκφραση του μορίου ETV2.

Στο **4^ο κεφάλαιο** μελετήθηκε η πρώτη παραγωγή των «ηθικών» πολυδύναμων κυττάρων ή iPSCs από 3 ανθρώπινα δείγματα στην Ολλανδία: 2 υγιείς δείγματα και 1 που φέρει την KAT ασθένεια. Τα παραπάνω iPSCs από όλα τα δείγματα, προέρχονται από ινοβλάστες που έχουν καλλιεργηθεί από δείγματα δέρματος και ήταν ικανά για την παραγωγή διαφόρων καρδιοαγγειακών κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένου των ρυθμικών καρδιομυοκυττάρων, τοποθετούμενα στο σπλαχνικό ενδόδεσμα όπως τα κύτταρα τύπου END-2 (END: Ενδοθήλιο).

Στο **5^ο κεφάλαιο** έγινε χρήση των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων-Ενδοθηλιακών κυττάρων ή hiPSC-EC αντίστοιχα σαν μοντέλο για τη μελέτη της ασθένειας KAT1, *in vitro*. Η ασθένεια KAT είναι μία επικρατής αυτοσωμική αγγειακή πάθηση που προέρχεται από μεταλλάξεις σε ένα από τους δύο υποδοχείς της οικογένειας πρωτεϊνών TGFβ, ENG ή ACVRL1, όπου εκφράζονται κυρίως από τα EC κύτταρα και προκαλούν τις ασθένειες KAT1 ή KAT2, αντίστοιχα. Αναγνωρίσαμε πως η κυτταρική πυκνότητα σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας συνδέεται με τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης SMAD στα κύτταρα hiPSC-EC και πως η απλοανεπάρκεια του παράγοντα ENG μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδότηση TGFβ. Στη συνέχεια, αναγνωρίσαμε επιπλέον το μόριο MTUS1, σαν ένα νέο υποψήφιο γονίδιο που εμπλέκεται στη σηματοδότηση TGFβ και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα όταν τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα ENG μειώνονται.

Στο **6^ο κεφάλαιο** αναλύθηκε ο ρόλος του μορίου Gja5 που ελέγχει την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης των χασμοσυνδέσμων Cx40 κατά την ανάπτυξη της αρτηριοφλεβικής δυσπλασίας ή AVMs στο μοντέλου ποντικού για την ασθένεια KAT2. Πιστοποιήσαμε πως το μόριο GJA5 είναι ένα καθοδικό γονίδιο-στόχος του σηματοδοτικού μονοπατιού BMP9/ALK1 και επίσης επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα του μορίου Cx40 σε ένα μικρό δείγμα ασθενών KAT2. Στα ετερόζυγα ποντίκια *Acvrl1^{+/-}*, η απλοανεπάρκεια του μορίου Gja5 οδήγησε στην αραίωση των αγγειακών πλεγμάτων και της αγγιοδιαστολής των αρτηριών, όπου η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου ή ROS αυξήθηκε. Δείξαμε πως η τροποποίηση στις αιμοδυναμικές δυνάμεις στα ποντίκια με γονότυπο *Acvrl1^{+/-};Gja5^{EGFP/+}* είναι ικανή να αναπτύξει παροδικές αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις στα τριχοειδή αγγεία, όπου μπορούν να δημιουργηθούν μεγάλες δυσμορφίες ύστερα από έκθεση σε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τραυματισμοί.