



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **TGF- $\beta$ family signaling in endothelial cells and angiogenesis**

Ma, J.

### **Citation**

Ma, J. (2021, September 30). *TGF- $\beta$  family signaling in endothelial cells and angiogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3214214>

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/1887/3214214>

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

## Nederlandse Samenvatting

Leden van de transformerende groeifactor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) familie zijn multifunctionele eiwitten die door cellen worden uitgescheiden naar de lokale omgeving, en welke een belangrijke functie vervullen in de cellulaire communicatie. Een groot aantal onderzoeken heeft aangetoond dat deze eiwitten een sleutelfunctie vervullen in de regulatie van vele normale en pathologische processen, waaronder embryogenese, wond genezing, fibrose en kanker. Deze TGF- $\beta$ -familieleden, waaronder TGF- $\beta$ s en bot morfogenetische eiwitten (BMP's), reguleren ook de functie van endotheelcellen, die gelegen zijn aan de binnenkant van bloedvaten. Via welke moleculaire mechanismen TGF- $\beta$  en BMP eiwitten de endotheelcel proliferatie, migratie en differentiatie beïnvloeden is niet duidelijk. De activering van TGF- $\beta$ -signalering kan de endotheelcellen aanzetten tot een fenotypische omschakeling naar mesenchymaal-uitziende cellen. Deze verandering wordt ook wel endotheel naar mesenchymale transitie (EndMT) genoemd. EndMT is onmisbaar voor de vorming van het hart- en vaatstelsel in de embryonale ontwikkeling, maar draagt ook bij aan sommige ziekten, zoals fibrose en kanker. Enerzijds biedt de stimulatie van TGF- $\beta$  geïnduceerde EndMT therapeutische mogelijkheden voor weefselregeneratie, anderzijds zou remming van TGF- $\beta$  signaaltransductie in de endotheelcellen potentieel een therapeutisch effect kunnen bewerkstelligen voor de behandeling van EndMT-gerelateerde ziekten. In **Hoofdstuk 2** hebben we de mechanismen van de TGF- $\beta$ -signalering in het EndMT-proces en de TGF- $\beta$ -geïnduceerde EndMT-bijdrage aan de ontwikkeling van fibrotische ziekten en kanker samengevat. Ook hebben we de mogelijke toepassingen weergegeven voor het gebruik van TGF- $\beta$ -geïnduceerde EndMT in weefselmanipulatie en -herstel.

EndMT is een zorgvuldig uitgebalanceerd proces dat wordt gereguleerd door meerdere transcriptiefactoren, die ofwel bevorderend of remmend kunnen werken. Nog steeds worden nieuwe potentiële factoren die dit proces reguleren geïdentificeerd. Om de fysio-pathologische betekenis van deze factoren voor EndMT te bepalen, is een efficiënte en betrouwbare workflow nodig. In **Hoofdstuk 3** hebben we deze workflow beschreven om de rol van cytokines, regulatoren en effector eiwitten in EndMT te bepalen. Dit wordt onder meer gedaan door de veranderingen in de cel morfologie en endotheliale en mesenchymale markers te onderzoeken. De methode van CRISPR/Cas9-gen manipulatie is beschreven en hoe deze kan worden toegepast om de rol van specifieke factors bij inductie of regulatie van EndMT te analyseren.

TGF- $\beta$  staat bekend als de belangrijkste stimulator van EndMT, terwijl de effecten van BMP's op dit proces onduidelijk zijn. In **Hoofdstuk 4** hebben we aangetoond dat TGF- $\beta$ 2, maar niet BMP9, EndMT kan induceren in muizen endotheel MS-1 en 2H11 cellen. Mechanistisch hebben we aangetoond dat de verhoogde expressie van transcriptie factoren SNAIL (en SLUG) die door TGF- $\beta$ 2 wordt geïnduceerd bepalend zijn voor EndMT. Waarom BMP9, ondanks het induceren van SNAIL- en SLUG-expressie, EndMT niet activeert, hebben we opgehelderd. We ontdekten dat dit komt doordat BMP9 de expressie van remmers van DNA-bindende (ID)-eiwitten sterk verhoogt, en dat endotheel cellen hierdoor hun oorspronkelijke eigenschappen behouden. De balans in expressieniveaus tussen ID-eiwitten en SNAIL/SLUG is bepalend voor het wel of niet induceren van EndMT.

Kanker is een groep ziekten waarbij genetische veranderingen gezonde cellen aanzet om zich sterk te vermenigvuldigen en de bloedcirculatie binnen te dringen, om zich vervolgens te verspreiden naar andere organen of weefsels in het lichaam. Bovendien kunnen tumorcellen nieuwe bloedvatvorming stimuleren, om daarmee niet alleen voedingsstoffen en zuurstofsupplementen voor tumorgroei te verkrijgen, maar ook om de verspreiding naar andere weefsels te stimuleren. Dit laatste is de belangrijkste reden voor het overlijden van vele kankerpatiënten. Om nieuwe behandelingsopties voor kankerpatiënten te ontwikkelen zijn meer efficiënte, goedkope en tijdbesparende in-vivo-modellen nodig. In **Hoofdstuk 5** beschrijven we de methodes om de invasie van borstkankercellen en tumor-angiogenese te bestuderen, door gebruik te maken van humane xeno-transplantaatmodellen in embryonale zebrafissen. In het bijzonder hebben we ons gericht op hoe we de functies die TGF- $\beta$  familieleden in deze processen vervullen kunnen besturen, en hoe we de effecten van genetische en farmacologische manipulatie kunnen uitlezen.

Veranderingen in het gedrag van endotheelcellen hebben invloed op bloedvatvorming. Overactiviteit van endotheelcellen en daarmee verhoogde angiogenese kan bijdragen aan tumorgroei. In **Hoofdstuk 6** hebben we twee nieuwe macrocyclische BMP type I receptor (BMPRI)-kinaseremmers gesynthetiseerd en geïdentificeerd. De code van deze remmers zijn OD16 en OD29. Beide verbindingen remmen efficiënt de BMPRI-gemedieerde signalering, en OD29 remt ook vasculaire endotheel groei factor (VEGF)-geïnduceerde extracellulair gereguleerde kinase MAP-kinase-fosforylering in endotheelcellen. OD16 en OD29 remmen endotheelcel functies in vitro, waaronder endotheelcel migratie, invasie en buisvorming. Gebruik makend van zebrafis embryo's, hebben we aangetoond dat beide verbindingen ook remmende effecten hebben op normale angiogenese en tumor angiogenese in vivo. Bij elkaar genomen suggereren onze gegevens dat OD16 en OD29 potentieel veelbelovende therapeutische middelen tegen tumor angiogenese zijn.

Samenvattend, de studies die in dit proefschrift staan beschreven zijn gericht op het verkrijgen van nieuwe inzichten in de onderliggende mechanismen van endotheelcel differentiatie en angiogenese. We hebben onthuld dat BMP9 er niet in slaagt EndMT te induceren vanwege de inductie van ID eiwitten, die het stimulerende effect van SNAIL tegenwerken. De balans in expressieniveaus van ID en SNAIL eiwitten bepalen het vermogen van TGF- $\beta$  om EndMT te induceren. Interessant is ook dat we twee nieuwe macrocyclische BMPRI-kinaseremmers hebben gevonden met therapeutische potentie om tumor angiogenese te remmen. Ik hoop dat de verkregen inzichten in mijn proefschrift zullen bijdragen aan een betere behandeling van ziekten met vasculaire aandoeningen zoals kanker.