



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Elucidating the pathogenesis underlying bicuspid aortic valve disease using new disease models

Pol, V. van de

### Citation

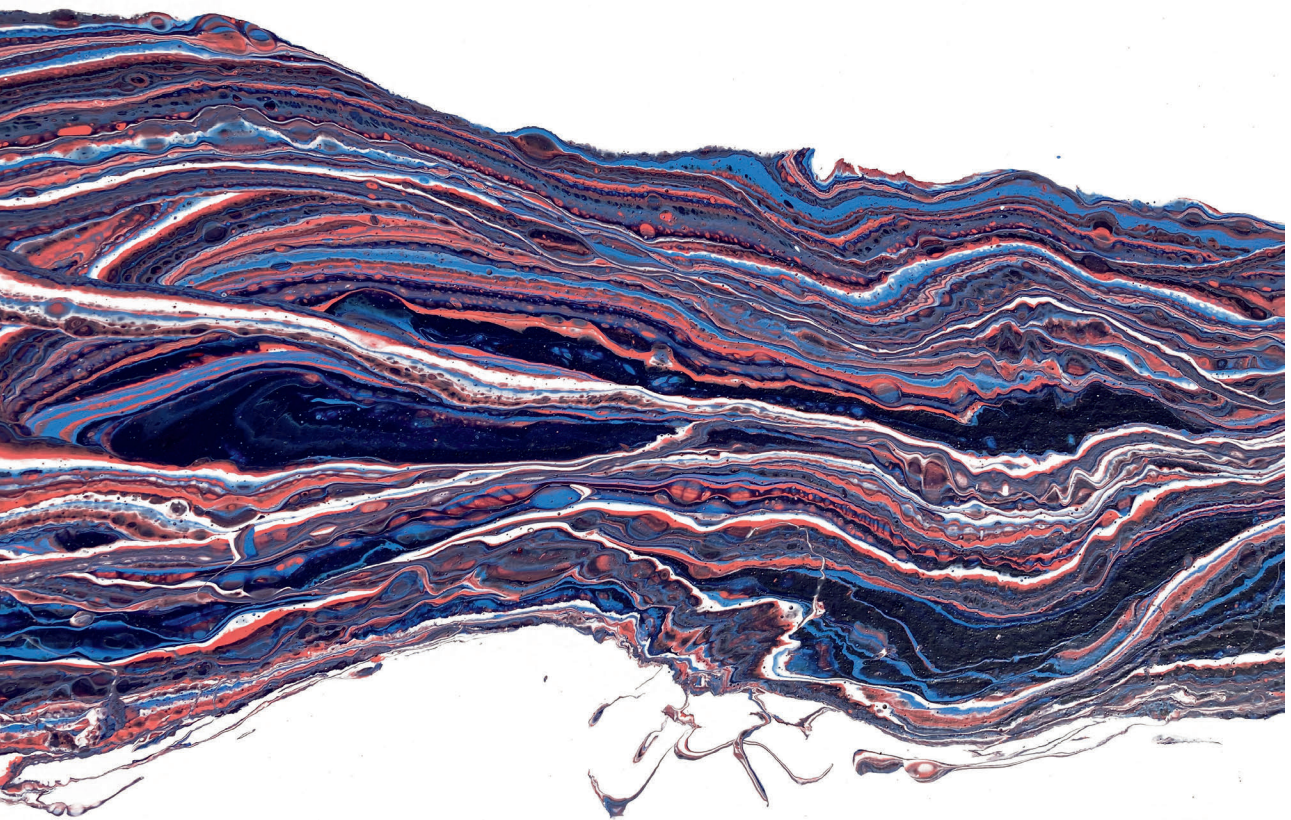
Pol, V. van de. (2022, January 12). *Elucidating the pathogenesis underlying bicuspid aortic valve disease using new disease models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3249566>

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/1887/3249566>

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

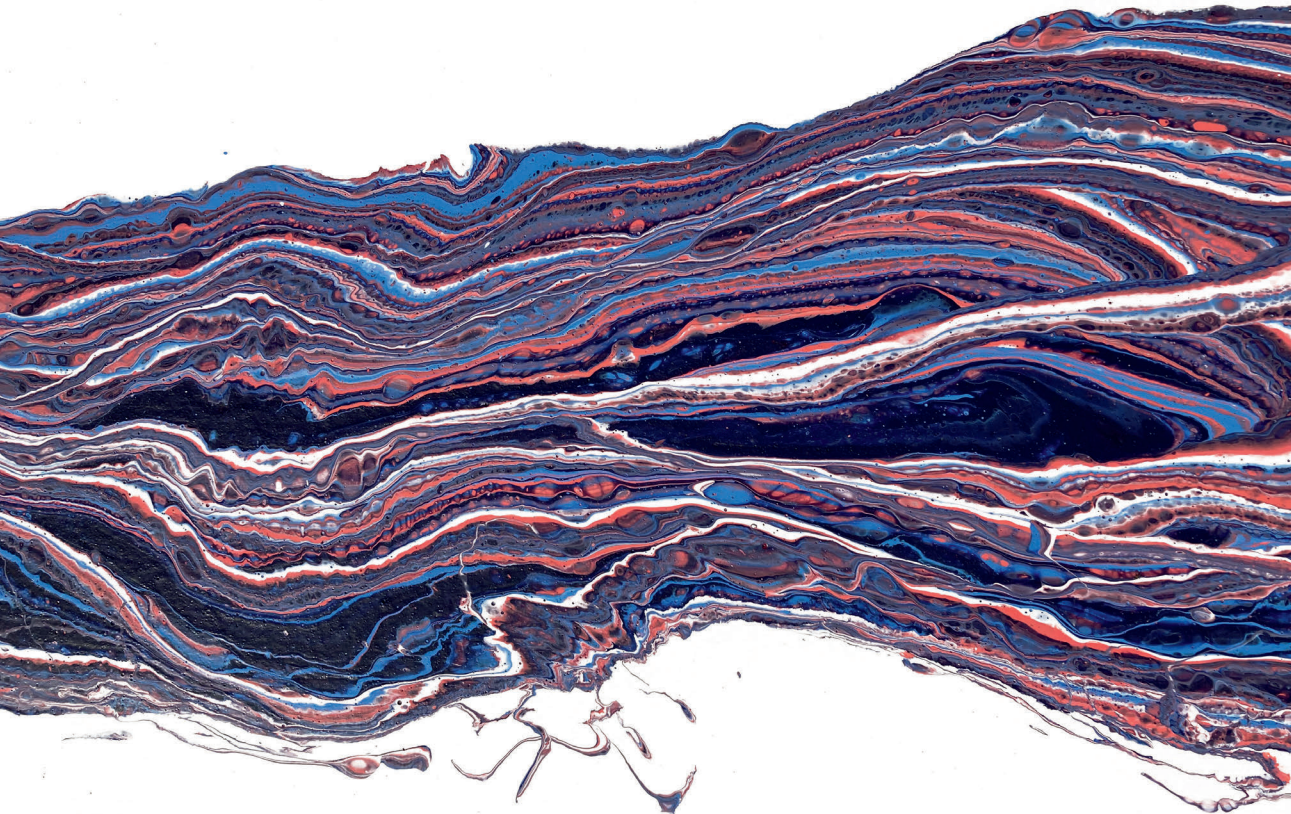


Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitea

Dankwoord

List of publications





## Nederlandse samenvatting

### Achtergrond

Een bicuspid aortaklep (bicuspid aortic valve - BAV) is een aangeboren hartafwijking waarbij de hartklep tussen de linker hartkamer en de grote lichaamslagader, de aorta, uit twee in plaats van de normale drie klepslipjes bestaat (tricuspid aortic valve - TAV). Hoewel een BAV goed kan functioneren, treedt er bij een groot deel van de mensen met een BAV al vroeg in het leven verkalking van de hartkleppen op of ontstaat er een verwijding van de aorta. Beide complicaties zijn levensgevaarlijk; omdat het hart harder moet werken om bloed langs verkalkte hartkleppen te pompen kan dit leiden tot hartfalen en een verwijde aorta kan op een gegeven moment scheuren. Er is geen andere behandeling beschikbaar dan een hartoperatie om de klep en/of aorta te vervangen. Hoewel er meerdere theorieën zijn waarom een BAV tot deze problemen kan leiden, is het nog niet duidelijk waarom patiënten met een BAV gevoelig zijn voor het ontwikkelen van hartklepverkalking en aortaverwijding. Ook is het niet duidelijk waarom sommige BAV patiënten hun gehele leven zonder complicaties blijven en andere patiënten al op jonge leeftijd ernstige problemen ervaren.

De vaatwand en hartkleppen bestaan uit verschillende celtypes die een rol spelen bij de vorming en het onderhoud van een gezonde weefselstructuur. De wand van de aorta bestaat voor het grootste deel uit gladde spiercellen. Aan de binnenkant is deze laag spiercellen met een dunne laag endotheelcellen bekleed. De hartkleppen bestaan voor een groot deel uit fibroblasten, die ook bedekt zijn met een laag endotheelcellen. Endotheelcellen vormen niet alleen een fysieke barrière tussen het bloed en het onderliggende weefsel, maar ze hebben ook een regulerende functie voor de gezonde balans van de gladde spiercellen en fibroblasten in de aorta en hartkleppen. Het belang van deze regulerende functie wordt duidelijk wanneer endotheelcellen niet goed functioneren. Als de endotheelcellen niet goed functioneren leidt dit in veel gevallen tot structurele veranderingen in de vaatwand en hartkleppen. De functie van het endotheel in relatie tot de ontwikkeling van aortaverwijding en hartklepverkalking is nog niet goed bestudeerd. Dit komt mede omdat het isoleren van endotheelcellen lastig is, maar ook omdat het moeilijk is om deze ziekten te bestuderen in de vroege beginfase van de verwijding en verkalking. Immers kan je niet zomaar een stukje uit een prima functionerende hartklep halen om te bestuderen. Daarnaast ondergaat de laag spiercellen een overduidelijke veranderingen in aortaverwijding, waarbij ze overgaan van een rustig (contractiele) staat naar een actieve (synthetische) staat. Hierdoor is veel aandacht besteed aan het bestuderen van deze veranderingen in de gladde spiercellen. Wel zijn BAV en

endothelcellen los van elkaar uitvoerig bestudeerd. **Hoofdstuk 2** beschrijft, op basis van recent onderzoek naar BAV, aorta verwijding en endothelcellen, hoe endothelcellen een effect kunnen hebben op BAV en de geassocieerde aorta verwijding en klepverkalking.

## Doel

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om het ziekteproces van aortaklepverkalking en aortaverwijding bij BAV-patiënten te bestuderen met een speciale aandacht voor de rol van endothelcellen in deze processen.

## De rol van endothelcellen in BAV

Bij een normale hartklep wordt het bloed vanuit het hart door het midden van de klepslippen naar buiten gepompt. Het bloed volgt een vloeiende lijn om efficiënt door het lichaam te worden verspreid. Een BAV heeft een afwijkende vorm, waardoor het bloed niet in een vloeiende lijn, maar met wat turbulentie door de aorta heen vloeit. Hierdoor wordt één zijde van de aortawand blootgesteld aan een verhoogde bloedstroomsnelheid ("jet kant") terwijl de tegenoverliggende zijde te maken heeft met een onregelmatige (oscillerende) stroming ("niet-jet kant"). Endothelcellen kunnen de stroming van het bloed voelen, en reageren wanneer de stroming verandert. Hierdoor worden endothelcellen geactiveerd en geven signalen door aan de gladde spiercellen. Zo kunnen de bloedvaten reageren op de veranderende bloedstroom. Wanneer de bloedstroming te turbulent of oscillerend is, kunnen de geactiveerde endothelcellen echter ontstekingen en afbraak in het gladde spierweefsel veroorzaken.

Het is nog niet bekend of de veranderde bloedstroom in BAV activatie van endothelcellen in de aortawand veroorzaakt. Daarom hebben wij in **hoofdstuk 3** onderzocht of deze stromingsverschillen bij BAV-patiënten de activatie van het endothel beïnvloedt door de weefselstructuur op microscopisch niveau te bekijken aan twee kanten van de aorta: de jet kant en de niet-jet kant. Hoewel er geen waarneembare verschillen zijn in de hoeveelheid van elastisch bindweefsel (elastine) tussen de jet en niet-jet kant, is er wel een significant grotere hoeveelheid van het eiwit von Willebrand Factor aan de jet kant van de aorta van BAV-patiënten vergeleken met de niet-jet kant. De aanwezigheid van Von Willebrandfactor is een aanwijzing dat endothelcellen meer geactiveerd zijn, maar het is wel een indirecte relatie. Daarom hebben we ook gekeken naar directe kenmerken van activatie in de aanwezige endothelcellen zelf. De endothelcellen vertonen een trend naar een hogere expressie van activatie markers van endothel-naar-mesenchymale overgang, celdeling en ontsteking aan de

niet-jet kant vergeleken met de jet kant. Dit wijst op een verhoogde endotheel activatie aan de niet-jet kant.

Omdat het lastig is om endotheelcellen van de aorta uit patiënten te isoleren hebben wij in **hoofdstuk 4** endotheel voorlopercellen uit het bloed van patiënten geïsoleerd. Deze cellen hebben in kweeksituaties dezelfde eigenschappen als endotheelcellen die de vaatwand bekleden. Met deze cellen hebben we de eigenschappen van de endotheelcellen van BAV patiënten bestudeerd. We ontdekten dat het niet mogelijk is om deze cellen te kweken van BAV patiënten die een verwijding hebben van de aorta. Er zitten geen verschillen in de snelheid van celdeling, celgrootte en de aanwezigheid van markers voor endotheel-naar-mesenchymale overgang (EndoMT) tussen de cellen geïsoleerd van mensen met een TAV en van patiënten met een BAV zonder aortaverwijding. De beweeglijkheid (migratie) van de BAV patiënt cellen is wel hoger dan de cellen van mensen met een TAV. Daarnaast is de verkalking van de endotheel voorlopercellen vermindert in BAV in vergelijking met TAV endotheel voorlopercellen.

In **hoofdstuk 5** beschrijven we het onderzoek waarin we de rol van ontsteking in EndoMT en verkalking van de vaatwand bestuderen. Dit onderzoek laat zien dat de pro-inflammatoire signaal moleculen (cytokines) tumornecrosefactor (TNF)- $\alpha$  en interleukine-1 $\beta$  EndoMT veroorzaakt in aorta endotheelcellen. Hierdoor zijn de cellen gevoelig geworden voor verkalking door de groeifactor bone morphogenetic protein (BMP)-9.

### **Een kweekmodel van muis-hartkleppen en het eiwit Four-and-a-Half-LIM domain 2**

Om hartklepverkalking te kunnen begrijpen, zijn naast goede celmodellen, ook weefselkweek en diermodellen noodzakelijk. In **hoofdstuk 6** wordt het onderzoek beschreven waarin we twee verschillende verkalkingsmethoden met elkaar hebben vergeleken met behulp van cel- en weefselkweek modellen. Er zijn namelijk meerdere manieren waarop verkalking kan optreden. Endochondrale verkalking is een manier van verkalken zoals ook bij het vormen van bot gebeurt, waarbij er eerst kraakbeen ontstaat wat daarna vervangen wordt door bot. Dystrofe verkalking is een vorm van verkalking waarbij ontsteking en celdood een belangrijke rol speelt. Om de complexe klepstructuur te behouden hebben we een miniatuur weefselkweekstelsel (MTCS) gebruikt waarin we hele muisharten kunnen kweken. Aortakleppen en aortaklepcellen werden blootgesteld aan twee verschillende verkalkende kweekvloeistoffen (OSM en PI). We hebben bestudeerd of met beide methoden verkalking van de hartkleppen optreedt en, zo ja, op welke manier dan. In de aortaklepcelkweek treedt verkalking op bij blootstelling aan OSM én PI, maar in de aortakleppen tijdens

weefselkweek treedt alleen dystrofe verkalking op bij blootstelling aan PI. De intacte weefselstructuur van de hartkleppen, aorta en het hart stelde ons in staat om daarnaast endochondrale differentiatie te detecteren in zowel PI- als OSM-omstandigheden in de wand van de aorta. Beide vormen van verkalking lijken sterk op verkalking die wordt gevonden in menselijke hartklepverkalking, qua locatie van verkalking en type verkalking.

Omdat het ex vivo hartkweekstelsel een goede weergave geeft van menselijke hartklepverkalking gebruikten we dit systeem om verkalking te bestuderen in een diermodel. Dit is beschreven in **hoofdstuk 7**. De harten van de muizen die we hebben onderzocht, missen het eiwit Four-and-a-Half-LIM domain 2 (FHL2). FHL2 is een eiwit dat onder andere een grote rol speelt in botvorming. Nadat we in coupes van verkalkte menselijke aortakleppen FHL2 hebben aangetoond, onthulde de weefselkweek significante verschillen in de locatie van verkalking in de aortakleppen van FHL2 deficiënte muizen vergeleken met kleppen van controle muizen. De verkalkte gebieden in de FHL2 deficiënte aortakleppen bevinden zich voornamelijk aan de aortazijde van de klep, terwijl in de controle harten de verkalking zich met name aan de kant van de hartkamer bevindt.

FHL2 is niet alleen betrokken bij botvorming maar ook bij de overgang van een rustige, contractiele naar geactiveerde staat van gladde spiercellen. Daarom beschrijven we in **hoofdstuk 8** de studie waarin is gekeken naar de aanwezigheid van FHL2 in aortaweefsel van verwijde en niet-verwijde aorta van patiënten met een TAV of BAV. Wanneer we FHL2 zichtbaar maken met kleuringen laat FHL2 in het midden van de aortawand een ander patroon zien (voornamelijk aanwezig buiten de cellen, in het extracellulaire ruimte) dan in de binnenste en buitenste lagen van de aorta (waar het zich met name in de cel bevindt). Ook is FHL2 in grote hoeveelheden aanwezig in gebieden zonder kernen en  $\alpha$ -gladde spiercelactine. In de celkweek hebben we ontdekt dat FHL2 deficiënte gladde spiercellen hun contractiele eigenschappen sneller verliezen dan gladde spiercellen met FHL2. Cellen scheiden kleine blaasjes uit, en in dit onderzoek hebben we ook ontdekt dat gladde spiercellen FHL2 uitscheiden in deze blaasjes. Deze blaasjes komen ook voor in het bloed, en hoewel we hebben aangetoond dat FHL2 aanwezig is in deze blaasjes in bloed, is er geen relatie gevonden tussen de hoeveelheid FHL2 in de blaasjes in het bloed en een BAV en/of een verwijde aorta.

Tot slot beschrijven we in **hoofdstuk 9** de studie naar hoe FHL2 de ontstekingsreactie van gladde spiercellen in de vaatwand beïnvloedt. We hebben ontdekt dat zowel de cytokinen in het bloed als de hoeveelheid ontstekingscellen verhoogd zijn in FHL2 deficiënte vaatwanden vergeleken met controle vaatwanden wanneer de bloedstroom wordt afgesloten met een hechting. Bovendien scheiden FHL2 deficiënte gladde spiercellen meer cytokinen uit en is de



activering van de inflammatoire (NFκB-)signalering versterkt. De inflammatoire toestand in FHL2 deficiënte gladde spiercellen kan worden genormaliseerd door het blokkeren van de NFκB-signalering.

Met het onderzoek beschreven in dit proefschrift hebben we onder andere aangetoond dat endotheelcellen van BAV patiënten anders reageren dan cellen van mensen met een TAV. Ook is de endotheelcel activatie in de vaatwand van BAV patiënten anders en afhankelijk van de bloedstroom. We hebben twee goede weefselkweekmethoden gevonden waarmee verkalking van de hartkleppen kan worden bestudeerd en hebben deze gebruikt om de rol van het eiwit FHL2 te bestuderen in dit proces. Het blijkt dat FHL2 een rol speelt in de signalering waardoor verkalking op een andere locatie kan optreden. Daarnaast is FHL2 aanwezig in de verwijde aortavaatwand en beïnvloedt het de contractiele eigenschappen en ontstekingsreactie van gladde spiercellen.