



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Force sensing and transmission in human induced pluripotent stem-cell-derived pericytes

Iendaltseva, O.

Citation

Iendaltseva, O. (2022, November 15). *Force sensing and transmission in human induced pluripotent stem-cell-derived pericytes*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3485923>

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/1887/3485923>

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

SAMENVATTING

Pericyten, de wandcellen van bloedmicrovaten, werden voor het eerst beschreven in 1873 door de Franse wetenschapper Charles-Marie Benjamin Rouget als een subset van contractiele cellen rondom microvaten [1]. In 1923 introduceerde Zimmerman een nieuwe term “pericyten” om aan te sluiten bij hun ligging dicht bij de endotheelcellen die vaatbuizen vormen [2]. Pericyten bedekken de meerderheid van alle haarvaten en zijn in de loop der jaren naar voren gekomen als belangrijke regulatoren van vasculaire morfogenese en functie. Ondanks uitgebreide studies zijn er nog belangrijke onopgeloste vragen in verband met de mechanobiologie van pericyten [3], waarvan één van de meest intrigerende de controle van de vasculaire bloedstroom is [4–8].

Momenteel kan het mechanische gedrag van pericyten, hoewel van groot belang voor hun biologische functie, alleen worden afgeleid uit (post mortem) beeldvorming. De belangrijkste reden voor dit gebrek aan toegankelijkheid is de moeilijkheid om homogene cellen van primaire mid-capillaire pericyten te genereren, aangezien ze verschillen in fenotype en expressie van eiwitten vertonen die afhankelijk zijn van hun locatie op de capillaire boom, en zij geen unieke markers hebben [2, 9, 10]. Daarnaast bevinden zich “echte” of “goedgekeurde” pericyten op middencapillairen welke de meest duidelijke verschillen met gladde spiercellen vertonen [9, 11]. Pericyten op pre- of post-capillairen zijn gedefinieerd als “transitionele” pericyten [2]. Het genereren van een celcultuur van “echte”, midden-capillaire, primaire pericyten die geen expressie van α -gladde spier actine (α -SMA) vertonen en angiogenese ondersteunen is dus vrij-wel onmogelijk. Ter bevestiging, er zijn geen dergelijke, in de handel verkrijgbare, primaire pericyten te koop. *In vivo* experimenten missen de mate van controle over de experimentele omstandigheden en ondersteunen geen directe celkrachtmetingen, in tegenstelling tot *in vitro* studies.

In dit proefschrift is een poging gedaan om grenzen te verleggen en benaderingen te ontwikkelen om de mechanobiologie van pericyten *in vitro* te bestuderen. Ten eerste, door gebruik te maken van menselijke geïnduceerd pluripotente stamcellen-afgeleide pericyten die lijken op “echte” pericyten in middencapillairen. Deze zijn gekenmerkt door het ontbreken van α -SMA en het ondersteunen van angiogenese [12, 13]. Pericyten hebben een ingewikkelde biochemische en ruimtelijke organisatie van extracellulaire matrix eiwitten op de haarvaten, gecombineerd met veranderende stijfheid, bij veranderingen in de bloeddruk. Deze factoren hebben over het algemeen gevolgen voor het gedrag van de cellen en pericyten vormen daarop geen uitzondering [14–16]. Het is belangrijk om al deze factoren te combineren om de celmicro-omgeving nauwkeurig *in vitro* na te bootsen. In **hoofdstuk 2** is de bestaande kennis over de structuur en eigenschappen van de extracellulaire matrix van pericyten gebruikt om de meest geschikte methoden te identificeren de mechanische micro-omgeving van pericyten *in vitro* na te bootsen. Die ontwikkeling biedt nieuwe mogelijkheden om hun mechanobiologie te bestuderen.

Pericyten zijn ingebed in het capillaire basaalmembraan dat bestaat uit de drie hoofdbestanddelen – collageen IV, laminine-411/511 en fibronectine – die door cellen kunnen worden gebruikt voor hechting in de capillaire wand [17–20]. Recente bevindingen toonden aan dat laminine en type IV collageen niet georganiseerd zijn in één homogeen netwerk, maar twee lagen vormen, waardoor fibroblasten aan de ene kant kunnen interacteren met collageen en endotheelcellen aan de andere kant van het basaalmembraan met laminine [21]. Pericyten bleken zich “onder” de collageenlaag dicht bij endotheelcellen te bevinden met een dunne lamininerijke laag in de pericyte-endotheelcel interstitia. Bovendien bleek met elektronenmicroscopie dat deze lamininelaag kleine eilanden van fibronectine bevat [17, 20, 22]. Terwijl endotheelcellen zich voornamelijk hechten aan laminine, is dit voor pericyten onbekend. Het *in vitro* model van de basaalmembraan in de pericyte-endotheliale celinterstitia van het midden-capillaire gebied dat ik heb ontwikkeld, maakte het mogelijk in **hoofdstuk 3** aan te tonen dat pericyten fibronectine prefereren boven laminine. Dit wijst op een mogelijke rol van deze fibronectine-afzettingen als voornaamste verankeringspunten voor de mechanische hechting van pericyten aan haarvaten. Deze rol werd oorspronkelijk voorgesteld door Courtoy in 1983. Ik heb deze hypothese nu met een *in vitro* experiment kunnen bevestigen, met behulp van de recente vooruitgang in de

modellering van de extracellulaire matrix.

Ik heb verder aangetoond dat pericyten reageren op een variatie in fibronectine patroonstijfheid met veranderingen in kracht, spreiding en cel-matrix adhesie. Dit gebeurt op een niet lineaire wijze zoals bijvoorbeeld in menselijke of muizenfibroblasten waar de cellulaire trekkrachten samen met de cel spreiding en de grootte van cel-matrix adhesie structuren geleidelijk toenemen met toenemende substraatstijfheid [23–25]. Pericyten vertonen optimale spreiding en cel-matrix adhesie grootte op intermediaire substraatstijfheid. De door pericyten uitgeoefende krachten zijn juist omgekeerd lager op intermediaire substraatstijfheid en hoger op heel zachte en heel stijve substraten. Het stijfheidsbereik dat optimale pericytenspreiding ondersteunt, bleek dicht bij dat voor endotheelcellen en gladde spiercellen te liggen [26, 27]. Dit wijst erop dat het gevonden stijfheidsbereik een respons in een fysiologisch relevant stijfheidsregime vertegenwoordigt. Het in deze studie waargenomen gedrag van pericyten geeft inzicht in de manier waarop pericyten afwijkingen van de stijfheid van de microvaten onderscheiden van het normale weefsel, hoe zij reageren door de contractiele krachten te verhogen om een mechanische ondersteuning te bieden aan de wanden van de microvaten, waardoor overmatige dilatatie wordt voorkomen.

Zoals hierboven vermeld zijn pericyten, afhankelijk van de locatie langs de microvasculaire boom, onderverdeeld in drie subgroepen: pre-capillaire, midden-capillaire en post-capillaire pericyten. Mid-capillaire pericyten missen volledig α -SMA, terwijl pre- en post-capillaire pericyten een gradiënt vertonen in de α -SMA expressie van laag, naast mid-capillairen, naar hoog bij arteriolen en venulen waar gladde spiercellen aanwezig zijn [5, 9, 10]. Uit het *in vivo* en *in vitro* onderzoek aan pericyten en andere celtypes blijkt dat de expressie van α -SMA grotendeels wordt beïnvloed door oplosbare factoren, maar ook door mechanische prikkels zoals de stijfheid van het substraat en de extracellulaire matrix. Aangezien de verandering van de volgorde van de capillairen gepaard gaat met veranderingen in diameter, inwendige bloeddruk, dikte van het basaalmembraan en eiwitsamenstelling, ervaren pericyten verschillende mechanische signalen op verschillende delen van de microvasculaire boom. Dit kan invloed hebben op de expressie van α -SMA dat leidt tot contractiliteit. Eerdere bevindingen wezen al op een bijzondere rol van de mechanische eigenschappen van de extracellulaire matrix bij de regulering van α -SMA in myofibroblasten [28] en in mesenchymale stamcellen

[29]. Of en hoe deze factoren bij elkaar genomen de expressiegradiënt van α -SMA in pericyten in de rustende vasculatuur conditioneren blijft onduidelijk.

In **hoofdstuk 4** werd onze *in vitro* benadering van de mechanobiologie van pericyten gebruikt om te onderzoeken of parameters als vaatlumina diameter, basaal membraansamenstelling en stijfheid een effect kunnen hebben op de rekrutering van α -SMA in spanningsvezels in pericyten. Met behulp van beeldanalyse werden gegevens verkregen over de vorming van α -SMA-vezels met een resolutie van één cel. Er werd geconstateerd dat pericyten die op fibronectinestippen omgeven door laminine groeiden, een lager percentage rekrutering van α -SMA aan spanningsvezels vertoonden dan pericyten die op een monolaag van fibronectine groeiden. Het eerste patroon lijkt op de eiwitorganisatie in de interstitia tussen pericyten en endotheelcellen in het midden van de haarvaten, terwijl het tweede patroon meer voorkomt in arteriole- en venulegebieden van een microvasculatuur boom. Deze gegevens suggereren een remmend effect van het fibronectine dat in patches in het capillaire basaalmembraan is georganiseerd op de rekrutering van α -SMA aan het F-actine cytoskelet van pericyten. Ook vertoonden pericyten weinig tot geen correlatie tussen de rekrutering van α -SMA en de stijfheid of vaatlumina diameter in aanwezigheid van fibronectine, georganiseerd in een stippelpatroon. Daarentegen behielden menselijke gladde spiercellen het vermogen om α -SMA-vezels te vormen op een dergelijk patroon en reageerden zij op de afwijkende stijfheid en het beschikbare gebied voor verspreiding met verschillende α -SMA-recrutering snelheden, die echter hoger waren dan bij pericyten. Deze gegevens tonen aan dat na volledige rijping van pericyten tot gladde spiercellen zij het vermogen verliezen om het expressieniveau van α -SMA aan te passen in reactie op de fibronectine organisatie in het basaalmembraan en in plaats daarvan meer afhankelijk worden van de stijfheid en de diameter van het bloedvat. Deze bevindingen kunnen verder helpen bij het onderzoeken van de processen achter het handhaven van de α -SMA expressiegradiënt in pericyten en kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat zij in celkweek een contractiel fenotype krijgen.

De contractiliteit van pericyten is, ondanks enkele tegenstrijdige resultaten, gerapporteerd als betrokken bij de regulering van de cerebrale bloedstroom en bij hersenschade na ischemie bij muizen *in vivo* [4, 5, 8]. Toch is er geen direct bewijs in termen van directe mechanistische metingen. In **hoofdstuk 5** werd een nieuwe benadering ontworpen en

gekaracteriseerd die het mogelijk maakt om voortdurend de krachten van cellen te monitoren tijdens een snelle uitwisseling van celkweekmedia om cellen bloot te stellen aan verschillende omgevingscondities zoals: de temperatuur, de samenstelling van het celkweekmedium en de zuurstofconcentratie. Met deze aanpak kan het gedrag van pericyten tijdens hypoxie en ischemie worden bestudeerd. De techniek kan ook worden toegepast op alle andere cellen waarvoor de omgevingsomstandigheden moeten worden gewijzigd en waarbij reacties in celkrachttoepassing en morfologie worden gevolgd.

Samengevat, de in dit proefschrift ontwikkelde methodes en benaderingen om het gedrag van pericyten *in vitro* te bestuderen, en de verkregen resultaten, scheppen nieuwe mogelijkheden om de mechanobiologie van pericyten te onderzoeken en inzicht, begrip en bewijs te leveren voor processen die in *in vivo* experimenten onmogelijk waren.