



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The endothelial compartment as a disease modifier in bleeding disorders

Laan, S.N.J.

Citation

Laan, S. N. J. (2025, September 24). *The endothelial compartment as a disease modifier in bleeding disorders*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4262075>

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/1887/4262075>

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

Nederlandse samenvatting

Endotheelcellen vormen de binnenwand van bloedvaten en spelen een belangrijke rol in de primaire en secundaire hemostase. Een van de belangrijkste procoagulante functies van endotheelcellen is de productie van de Von Willebrand factor (VWF). Dit is een zeer groot eiwit dat na activatie bloedplaatjes aan de beschadigde vaatwand kan binden en het stollingsproces kan starten. VWF kan ook binden en bescherming bieden aan stollingsfactor VIII (FVIII). VWF wordt voornamelijk geproduceerd in endotheelcellen en opgeslagen in gespecialiseerde secretieorganellen, de zogeheten Weibel-Palade lichaampjes (WPBs). Deze celspecifieke organellen bevatten buisjes van VWF, waardoor snelle secretie mogelijk is na stimulatie. Bij de bloedingsstoornis de ziekte van Von Willebrand (VWD) is VWF in verschillende mate defect of afwezig, wat milde tot ernstige bloedingsafwijkingen veroorzaakt. Dit kan leiden tot bloedingsproblemen, zoals frequente neusbloedingen, menorrhagie, overmatig bloeden bij verwondingen of operaties, en bloedingen in spieren of gewrichten. VWD kan worden behandeld door het toedienen van stollingsfactoren of door toediening van 1-deamino-8-D-arginine vasopressin (DDAVP). Dit medicijn kan endotheelcellen stimuleren tot het vrijgeven van hun inhoud en leidt tot een snelle, tijdelijke verhoging van de hoeveelheid VWF en FVIII in het bloed. Het is bekend dat er een grote variatie in het bloedingsfenotype bestaat bij VWD patiënten. Deze variatie kan worden veroorzaakt door verschillende VWF mutaties, maar opvallend genoeg hebben ongeveer 30-50% van de patiënten met type 1 VWD geen pathogene varianten in het VWF gen. Bovendien is er een aanzienlijke groep VWD patiënten die niet reageren op behandeling met DDAVP zonder dat daar een duidelijk aanwijsbare oorzaak voor is. Onze hypothese was dat de verlaagde VWF niveaus of het niet reageren op DDAVP veroorzaakt zou kunnen worden door andere factoren die VWF kunnen beïnvloeden. Als primaire bron van VWF hebben we ons in dit onderzoek gericht op de endotheelcellen van deze patiënten. Een model dat gebruikt kan worden om endotheelcellen te bestuderen zijn de endotheel kolonievormende cellen (ECFCs). Een groot voordeel van ECFCs is dat ze de genetische achtergrond dragen van de donor uit wiens bloed de ECFCs zijn geïsoleerd. In dit proefschrift hebben we verschillende aspecten van de endotheelcel bestudeerd met behulp van het ECFC-model bij mensen met bloedingsstoornissen.

Ten eerste wordt in **hoofdstuk 1** een algemene achtergrond gegeven voor alle onderzoeken in dit proefschrift. Hierin geven we een meer gedetailleerde beschrijving van de functie van endotheelcellen, VWD, de behandelopties en de beschikbare onderzoeksmodellen voor endotheelcellen.

In eerdere studies zijn ECFCs al gebruikt als model om de pathofysiologie van bloedingsstoornissen te bestuderen. In **hoofdstuk 2** hebben we de gepubliceerde literatuur hierover verzameld om een overzicht van deze bevindingen te verkrijgen. De voor- en nadelen van het gebruik van ECFCs in patiëntspecifiek onderzoek wordt besproken en vergeleken met alternatieve modellen zoals geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs) of getransfecteerde modellen zoals de humane embryonale niercellen 293 (HEK293). Daarnaast hebben we de bevindingen samengevat die specifiek betrekking hebben op VWD, de uitscheiding van secretieorganellen en de rol van endotheelcellen in angiogenese.

Een veelgebruikte methode om cellen en weefsels te analyseren is microscopie. Dit geeft inzicht in de interne werking van cellen. Hoewel kwalitatieve observaties met het blote oog kunnen worden gedaan, is kwantificatie nodig om de gegevens statistisch te analyseren. Eén van de belangrijkste apparaten die wij gebruikten voor de analyse van de morfologie van endotheelcellen en WPBs was immunofluorescentie microscopie. Het kwantificeren van eigenschappen was uitdagend vanwege het grote aantal en de grote variatie van WPBs binnen de cellen. Daarom hebben we een geautomatiseerde kwantificatiemethode ontwikkeld voor de analyse van cellen en organellen met behulp van CellProfiler (**hoofdstuk 3**). De methode is specifiek ontworpen om het formaat, het aantal en de vorm van endotheelcellen te meten, evenals het aantal, de vorm, de lengte en de locatie van WPBs binnen de cel. Bovendien hebben we de morfologie van endosomen in HEK-cellen geanalyseerd om aan te tonen dat deze methode ook door andere onderzoeksgroepen voor andere doeleinden kan worden gebruikt.

Zoals eerder vermeld bieden ECFCs een uitstekend model om de pathofysiologie van bloedingsstoornissen te bestuderen. Door middel van een relatief eenvoudige bloedafname kunnen ECFCs worden verkregen uit het bloed. Na differentiatie produceren de ECFCs VWF en hebben ze alle algemene endotheelkenmerken. Het belangrijkste voor ons onderzoek is dat deze cellen ook de mutaties van de donor bevatten, waardoor patiëntspecifiek onderzoek mogelijk is. Er zijn echter ook uitdagingen bij het werken met ECFCs. Uit onderzoek blijkt dat er binnen gezonde controle-ECFCs grote variatie bestaat in aspecten zoals celgrootte en -vorm, proliferatiesnelheid en productie van VWF. Het is duidelijk dat het bestuderen van VWF-productie moeilijk is in een model waarin deze sterk varieert. Daarom bespreken we in **hoofdstuk 4** deze variatie, de uitdagingen die het met zich meebrengt en bieden we een oplossing voor dit probleem. Eerst onderzochten we het transcriptieprofiel van een grote groep controle-ECFCs door middel van RNA-sequencing. Dit toonde aan dat veel van de genen geassocieerd zijn met ontsteking en endotheel-naar-mesenchymaal-transitie (EndoMT). Deze genen kunnen mogelijk de fenotypische variatie aansturen. Op basis van deze

informatie hebben we een klein qPCR panel ontwikkeld dat eenvoudig kan worden gebruikt om ECFC-klonen te karakteriseren en te groeperen. Vergelijkingen tussen twee groepen van ECFCs tonen aan dat het aantal cellen, het aantal WPBs, hun vorm en de migratiesnelheid significant verschillen. Dit benadrukt het belang van karakterisering van ECFCs voordat ze worden gebruikt voor patiëntspecifiek onderzoek.

Een alternatief model voor endotheel onderzoek zijn iPSC-afgeleide endotheelcellen (iPSC-EC). Deze cellen kunnen worden afgeleid van elk celtype dat geïsoleerd is van een donor. Bijvoorbeeld, perifere mononucleaire bloedcellen kunnen uit volbloed worden geïsoleerd, geherprogrammeerd worden tot iPSCs en vervolgens weer gedifferentieerd worden tot iPSC-ECs. Deze cellen dragen ook de genetische achtergrond van de donor en kunnen worden gebruikt voor patiëntspecifiek onderzoek. iPSC-ECs lijken echter niet volledig te matureren. Ze vertonen namelijk lage niveaus van geproduceerd VWF en kleine, ronde WPBs. In **hoofdstuk 5** hebben we verschillende differentiatieprotocollen uitgevoerd en aangepast om de maturatie van WPBs te verbeteren. We laten zien dat verscheidene zaken de maturatie van iPSC-ECs niet significant verbeteren. Transfectie van iPSCs met de transcriptiefactor ETV2 leidde tot een snellere differentiatie met een licht verhoogde VWF-productie en secretie. Bovendien waren de WPBs langwerpiger, maar alleen nadat de iPSC-ECs meer dan 30 dagen in kweek waren.

Zoals eerder vermeld kan VWD worden behandeld met DDAVP, dat snel de niveaus van VWF en FVIII in het bloed verhoogt. DDAVP wordt ook gebruikt bij andere bloedingsstoornissen. Een aanzienlijk deel van de patiënten reageert echter niet of slechts gedeeltelijk op DDAVP. Deze patiënten hebben alternatieve behandelingen nodig, zoals factorconcentraten. Echter is de reden voor de slechte respons bij de meeste patiënten niet bekend. Daarom voerden we een systematische review en meta-analyse uit over de respons op DDAVP en de mogelijke determinanten van DDAVP respons bij patiënten met bloedingsstoornissen (**hoofdstuk 6**). In deze studie includeerden we 103 artikelen, waaruit we de gegevens van 1982 patiënten konden extraheren. Het responspercentage varieerde aanzienlijk tussen ziektes en subtypes, en de basale niveaus van stollingsfactoren waren belangrijke determinanten voor de respons. Onze bevindingen versterken de bestaande kennis en benadrukken de noodzaak van een gestandaardiseerde definitie van respons en verder onderzoek naar responsmechanismen.

Tot slot werden de bevindingen uit dit proefschrift toegepast in **hoofdstuk 7**. Hier analyseerden we ECFCs van twee groepen patiënten met VWD: patiënten zonder pathogene mutatie in VWF en patiënten met een bekende mutatie in VWF maar zonder respons op DDAVP. Onze hypothese was dat de factoren in endotheelcellen die VWF

kunnen beïnvloeden, bij deze patiënten zijn aangetast, wat kan leiden tot lage VWF-niveaus of geen respons. ECFCs werden geanalyseerd en gegroepeerd met behulp van het qPCR panel ontwikkeld in **hoofdstuk 4**. ECFCs van patiënten werden gekoppeld met controles en functionele aspecten van de ECFCs zoals VWF-productie, gestimuleerde secretie, migratie en morfologie, werden geëvalueerd. Alle morfologische aspecten werden geanalyseerd door middel van de kwantificatiepijplijn ontwikkeld in **hoofdstuk 3**. We vonden dat VWF-retentie in het endoplasmatisch reticulum de oorzaak kan zijn voor het niet reageren op DDAVP bij sommige patiënten. Daarnaast correleerden we het uitgebreide scala aan functionele kenmerken van endotheelcellen met hun proteoom. Hierin vonden we processen en eiwitten van belang in de secretie van VWF.

Samenvattend biedt dit proefschrift waardevolle inzichten in het gebruik van ECFCs en iPSC-ECs en laten we zien hoe ze gebruikt kunnen worden om patiëntspecifieke defecten te bestuderen. Het laat ook de uitdagingen zien van het gebruik van deze modellen en benadrukt het belang van hun ontwikkeling en optimalisatie.

