

VU Research Portal

Generation and distribution of endothelium-derived contractile forces and their impact on vascular permeability

Valent, E.T.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Valent, E. T. (2016). *Generation and distribution of endothelium-derived contractile forces and their impact on vascular permeability*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Introductie

Bloedvaten vervullen een belangrijke transport functie binnen het gehele menselijke lichaam. Door het geleiden van bloed van - en naar verschillende vitale organen worden nutriënten, zuurstof en afvalstoffen uitgewisseld tussen diverse weefsels om zo te voldoen aan de lokale behoeften. Hierbij is een belangrijke rol weggelegd voor een gespecialiseerde laag cellen die zich aan de binnenzijde van alle bloedvaten bevindt, het endotheel. Deze monolaag van cellen vormt een fysieke barrière tussen de binnenzijde van het vat (het lumen) en de omliggende weefsels. De belangrijkste functie van het endotheel is het voorkomen van lekkage van bloedplasma uit het vat, terwijl er tegelijkertijd wel selectieve uitwisseling van bijvoorbeeld voedingsstoffen dient plaats te vinden. Om dit mogelijk te maken beschikt het endotheel over specifieke eigenschappen die een actieve controle en dynamische interacties met zijn omgeving mogelijk maakt. Door sterke verbindingen te onderhouden met zowel de naburige cellen (cel-cel) als met hun ondergrond (cel-matrix), waarborgt de cel de integriteit van deze uit cellen opgebouwde barrière.

De onder normale condities intacte endotheel monolaag, kan in verschillende pathologische condities ernstig bedreigd raken in zijn functioneren. Bij een actieve ontsteking komen ontstekingsmediatoren vrij in de circulatie waardoor de endotheelcellen worden geactiveerd. Dit heeft tot gevolg dat de fysieke verbindingen van cellen verstoord raken, wat kan leiden tot het ontstaan van kleine openingen tussen de cellen. Dit resulteert in een verhoogde permeabiliteit van de vaatwand waardoor vaatlekkage optreedt. Vaatlekkage en de daarop volgende ophoping van vocht in de ruimte tussen de cellen (het interstitium), vormt een directe bedreiging voor de homeostase van het vaatbed en de werking van omliggende weefsels. Hierdoor is het een kenmerk van veel levensbedreigende ontstekingsziekten zoals onder andere acute longschade en sepsis, ook wel bloedvergiftiging genoemd. Ondanks dat er veel onderzoek verricht wordt aan deze ziektes, is er nog altijd geen gespecialiseerde medicatie beschikbaar die hyperpermeabiliteit verminderd of voorkomt.

Een van de weinige overeenkomsten tussen de verschillende ontstekingsziekten, waaraan vaatlekkage ten grondslag ligt, is dat deze allemaal aanzetten tot de ontwikkeling van contractiele krachten binnen het endotheel zelf. Hierdoor wordt de spanning over de monolaag vergroot, wat leidt tot het uiteenvallen van de cel-cel gemedieerde verbindingen en uiteindelijk toegenomen permeabiliteit van de endotheel laag. Om een beter beeld te krijgen wat de precieze relatie is tussen deze contractiele krachten, de cel-cel en cel-matrix contacten en hun moleculaire mechanismen, is deze studie gestart. Hierbij trachten we inzicht te verschaffen in het ontstaan van vaatlekkage en nieuwe factoren bloot te leggen die het proces van endotheel permeabiliteit beïnvloeden.

Bepalen van contractiele kracht

Om het verband tussen contractiele krachten en vaatpermeabiliteit beter te kunnen begrijpen zijn we aangewezen op technieken die zowel kracht kunnen bepalen als informatie kunnen verschaffen over de endotheel monolaag. In het verleden is hier een geavanceerde methode voor ontwikkeld die wel wat weg heeft van technieken die worden gebruikt om menselijke bewegingen te bestuderen. Zo zou een

bewegingswetenschapper een proefpersoon op een loopband kunnen zetten om zijn geleverde kracht (ontwikkelde snelheid en uithoudingsvermogen) te bepalen tijdens het lopen. Dit zelfde principe van een bewegende ondergrond om kracht te bepalen heeft celbiologen geïnspireerd om ook cellen op een vervormbare ondergrond te zetten. Doordat de eigenschappen van ondergrond gecontroleerd en bekend zijn bij de onderzoekers, is het mogelijk om aan de hand van de vervormingen van deze ondergrond te bepalen hoeveel kracht er door de cel is ontwikkeld bij zijn spontane bewegingen. In het toepassen van deze techniek, beter bekend als de traction force microscopie methode, is het belangrijk de door de cel opgewekte deformaties zo accuraat mogelijk vast te stellen om zo nauwkeurig mogelijke data te verkrijgen. Hiervoor maakt men gebruik van fluorescerende markers die direct verbonden zijn aan de ondergrond van de cellen en die door middel van een microscoop over de tijd en op hoge vergroting te volgen zijn.

In het verleden is deze traction force techniek veelvuldig gebruikt om individuele cellen te volgen. Echter, deze opzet is in ons geval - bestudering van de endotheelpermeabiliteit - minder fysiologisch relevant en daardoor minder geschikt. Immers, endotheelcellen komen in het lichaam alleen voor in aaneengesloten monolagen van interacterende cellen. Hierdoor is het ook meteen een stuk lastiger om de ontwikkelde kracht te bepalen van een individuele cel, aangezien dit alleen te meten is op een achtergrond van allemaal kracht uitoefenende cellen. Door een recentelijk geïntroduceerde analysemethode, ontwikkeld door onze collega's uit Boston, is het nu mogelijk geworden om nauwkeurig en locatie specifiek de contractiele krachten te bepalen van cellen in een monolaag.¹ Met behulp van deze beschikbaar gestelde methode en na de succesvolle implementatie van deze techniek binnen het VU medisch centrum zijn we in staat de in een endotheellaag ontwikkelde contractiele krachten in de context van vaatpermeabiliteit nader te bestuderen.

Krachtontwikkeling en -regulatie

Met alleen in kaart brengen van de krachten ben je er echter nog niet. Het is ook van belang te begrijpen hoe deze krachten zich ontwikkelen om daar later eventueel wat aan te kunnen veranderen. Zo is het bijvoorbeeld van belang je te realiseren dat, als je kijkt naar hoe de krachtontwikkeling tot stand komt, er veel overeenkomsten zijn tussen endotheelcellen en de mens als organisme. Net als mensen beschikken cellen over een skelet, wat ook wel cytoskelet genoemd wordt, dat zorgt voor de structuur van de cel en dient als aangrijpingspunt voor contractie. Een belangrijk deel van deze structuur wordt gevormd door aaneengesloten actine dimeren. Deze ketens van eiwitten zijn verspreid door de gehele cel, maar aan de buitenzijde van de cellen bevindt zich een regio waarin het actine meer geconcentreerd aanwezig is, ook wel de corticale actine ring genoemd. Het actine cytoskelet interacteert met een groot aantal andere cytoplasmatische eiwitten, waarvan een van de belangrijkste partners het myosine eiwit is. Myosine is een motor-eiwit dat door middel van het sterk bindende hoofdgedeelte en het katalytische nekgedeelte voor de daadwerkelijke krachtontwikkeling zorgt. Deze actine-myosine interactie vormt ook de basis van de contractie in alle spieren van het lichaam. Dat de contractie gestuurde bewegingen in endotheel cellen belang is blijkt wel uit het feit dat ongeveer 16% van de totale hoeveelheid eiwitten in de cel bestaat uit actine en myosine eiwitten.²

Om de ontwikkelde kracht daadwerkelijk om te zetten in beweging is het noodzakelijk deze kracht ergens op uit te oefenen. Hiervoor hebben cellen gespecialiseerde transmembraaneiwitten die voor hechting zorgen aan omliggende structuren. Zo kunnen intern gegenereerde krachten over worden gedragen aan de onderliggende extracellulaire matrix via zogenaamde focal adhesions (te vergelijken met de voeten van een cel) of aan omliggende cellen via adherens junctions (te vergelijken met de handen). Echter deze route kan ook omgekeerd worden afgelegd, waarbij externe krachten, zoals de bloeddruk of de kracht van het langsstromende bloed (shear stress), zich via de gespecialiseerde eiwitcomplexen naar het intracellulaire milieu kunnen verplaatsen. Al deze interne en externe fysieke signalen dienen geregistreerd en gecoördineerd te worden binnen het cytoskelet en het netwerk van geleerde eiwitten in de cel. Dit is van cruciaal belang om accuraat te kunnen reageren op alle mechanische prikkels. Om dit mogelijk te maken zijn er gespecialiseerde kracht-gevoelige en -regulerende eiwitten. Binnen de groep van deze regulerende eiwitten vertolken vooral de Rho-GTPase familie een belangrijke rol. Deze eiwitfamilie werkt als een groep aan- en uit-schakelaars samen en leidt tot een dynamische reactie van de cel als geheel. Een voorbeeld van dit dynamische netwerk is dat wanneer er meer kracht wordt uitgeoefend op een specifieke locatie binnen een cel, hier het actine cytoskelet en de verbindende eiwitcomplexen worden verstevigd.

Binnen de groep van deze regulerende eiwitten ligt mogelijk ook de sleutel tot succes op het gebied van de preventie van vaatpermeabiliteit. Tijdens verschillende experimenten beschreven in dit proefschrift blijkt dat het uitschakelen van bepaalde regulerende eiwitten (ROCK, Arg, DRF/KLF, HIFs) ieder voor zich verschillende effecten kan hebben op de endotheelpermeabiliteit en op de krachtontwikkeling. Zo kan het zijn dat de krachten in de monolaag toenemen en dat de permeabiliteit toeneemt, zoals de eerste hypothese uit de introductie van dit proefschrift onderschreef. Echter ook de omgekeerde situatie kan voorkomen, namelijk dat de krachten afnemen maar de permeabiliteit nog steeds toeneemt. Hieruit blijkt wel de complexiteit van de situatie. Desondanks waren we in staat in het geval van ROCK2 (Hoofdstuk 4) en dat van Arg (Hoofdstuk 5) om het potentieel van gereduceerd endotheelpermeabiliteit als gevolg van een veranderde contractiele status of distributie aan te tonen.

Conclusie

In dit proefschrift laten we zien dat de door het endotheel zelf ontwikkelde actomyosine-gegenereerde krachten een belangrijke rol spelen in vaatlekkage als het gevolg van het verlies van de endotheel barrière functie. Ondanks het feit dat er geen directe link was gevonden tussen de contractiele kracht en de formatie van inter-endotheliale gaten, werd de correlatie met cel-cel interacties en het actine cytoskelet wel bewezen. Daarnaast is gebleken dat de formatie van actine gedreven cel uitstulpingen (zoals lamellipodia en filopodia) en de cellulaire reactie op substraatverstijving een duidelijke relatie vertoont met traction krachten. De regulatie van contractiele krachten, maar ook cel-cel en cel-matrix interacties is gereguleerd door kracht-gevoelig eiwitten in combinatie met de Rho-GTPases. Hierin spelen voornamelijk ROCK2 en Arg een fundamentele moleculaire rol die vasculaire lekkage kan verhinderen. Deze eiwitten hebben de potentie om aangrijpingspunten te vormen voor nieuw te ontwikkelen geneesmiddelen tegen ziektes zoals sepsis en acute longschade, waarvoor momenteel geen specifiek therapeutische mogelijkheden beschikbaar zijn.

Referenties

1. Trepap X, Wasserman MR, Angelini TE, Millet E, Weitz DA, Butler JP, Fredberg JJ. Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics*. 2009;5(6):426–430.
2. Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttrop N, Drenckhahn D. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *Journal of Physiology*. 1990;431:379–401.