

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 ?

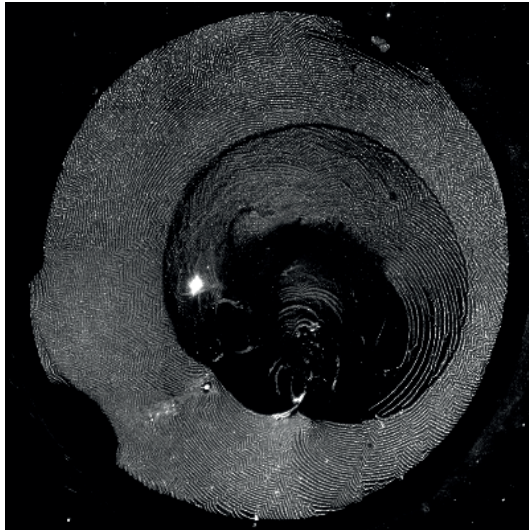
Take down policy

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

Chapter 9



List of Abbreviations

AC	adenyl cyclase
AJ	adherens junction
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
Arg	Abl-related gene
Ca ²⁺	calcium
CAB	circumferential actin bundle
CaM	calmodulin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
Cav-1	Caveolin-1
Cdc42	Cell division control protein 42
DAG	diacylglycerol
DDAB	dimethyldioctadecyl-ammonium bromide
DMOG	dimethyloxalyglycine
DRF	diaphanous related formin
EBA	Evans blue conjugated albumin
EBAE	EBA extravasation
EC	endothelial cell
ECIS	electrical cell substrate impedance sensing
ECM	extracellular matrix
F-actin	filamentous actin
FA	focal adhesion
FGD5	Facial-genitaldysplasia-5
FH	Formin homology
FIH	Factor inhibiting HIF
FN	fibronectin
FOV	field of view
FRET	fluorescence resonance energy transfer
G protein	GTP-binding regulatory protein
GAP	GTPase activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GJ	gap junction
GLUT1	Glucose transporter 1
GPCR	G-protein-coupled receptor
GTPase	guanosine triphosphatase
HIF	Hypoxia inducible factor
HPMVEC	Human pulmonary microvascular endothelial cell
HRP	horse radish peroxidase

HSA	Human serum albumin
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IEJ	inter-endothelial junction
IL	interleukin
IP3	inositol 1,4,5- triphosphate
JAM	junction adhesion molecule
JAIL	junction-associated intermitted lamellipodia
LARG	leukemia-associated Rho-GEF
LPA	lysophosphatidic acid
LPS	lipopolysaccharide (endotoxin)
MLC	myosin light chain
MLCK	myosin light chain kinase
MLCP	myosin light chain phosphatase
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase
MYPT1	myosin phosphatase target subunit 1
P-Rex1	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate–dependent Rac exchanger-1
PAK	p21-activated kinase
PAR	protease-activated receptor
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PH domain	Pleckstrin Homology domain
PHD	Prolyl hydroxylase domain
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC- β	phospholipase C- β
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxic substrate 1
Rasip1	Ras-interacting protein 1
Rho	Ras-homolog
RhoA	Ras homolog gene family member A
RMS	root mean square
ROCK	Rho-associated coiled-coil forming kinase
ROS	reactive oxygen species
S1P	sphingosine-1-phosphate
S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor1
Shrm2	Shroom2
STIM1	stromal interacting molecule 1
TEER	Trans Endothelial Electrical Resistance
TF	traction forces
TFM	traction force microscopy
TGF- β	tumor growth factor- β

Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis1
TJ	tight junction
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPPP	tubulin polymerization promoting protein
TRPC	transient receptor potential channel
VE-cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VE-PTP	vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase
VVO	vesiculo-vacuolar organelle
WT	wild-type
ZO	zonula occludens

Summary

All blood vessels of the human body are covered with a specialized cell layer, the endothelium, which forms a physical barrier between the vessel lumen and the surrounding tissues. This continuous monolayer is semi-permeable and actively controls the transport of oxygen, nutrients and waste products to meet the needs of the underlying tissues. Under normal physiological conditions endothelial cells are tightly connected to their basal substrate and neighboring cells and prevent blood plasma leakage. However, as described in **Chapter 1**, in pathological conditions these cells can become activated resulting in the formation of intercellular gaps, by which additional transendothelial permeability is mediated. This leakage is a direct threat for the homeostasis of the vasculature and forms a hallmark of many life-threatening inflammatory diseases. Despite the intense research and medical need, no specialized therapies are available to prevent or reduce hyperpermeability. One important similarity between all heterogeneous inflammatory syndromes is that it involves the generation of acto-myosin-based contractile forces by the endothelium itself. Hereby, monolayer tension is increased which can cause the loss of endothelial integrity by the disruption of cell-cell interactions. A better understanding of these contractile forces, in relation to the cell-cell and cell-matrix interactions and the underlying molecular pathways, will provide new insights into the mechanisms that drive vascular leakage.

To study endothelial derived forces a biophysical device is needed which enables measurements within a confluent cell monolayer under resting and activated conditions. Different potential techniques to quantify forces are reviewed in **Chapter 2**, as well as the important regulators of endothelial contractility, the Rho-GTPases. After comparing the different options, we concluded that the most suitable techniques to answer our questions is the traction force microscopy method, which is based on the displacement of fiducial markers at the top of a deformable substrate. By implementing this technique we obtained the ability to study the spatiotemporal distribution and stimulus-induced reorganization of traction forces. Subsequently, we showed that integral traction forces are heterogeneously distributed underneath the endothelial monolayers, with nuclear areas showing lower and cell-cell junctional regions higher forces than the whole-monolayer average. Moreover, a good correlation between force vector orientation and the organization of the F-actin cytoskeleton was found. In the final part of **Chapter 3** we revealed that unstable areas, showing high force fluctuations within the monolayer, are prone to form inter-endothelial gaps after the stimulation with a pro-inflammatory mediator.

The usefulness of measuring traction forces was demonstrated in **Chapter 4** in which we studied the isoforms specific contribution of Rho kinase (ROCK), a well-known and prominent inducer of actomyosin-generated forces. We were able to show that thrombin-mediated hyperpermeability is primarily ROCK2 dependent and involves a reduced passive junctional tension in the endothelium. However, to acquire a normal response to thrombin, also ROCK1 is required, contributing to prolongation of the hyperpermeability response by the formation of F-actin stress fibers.

Subsequently, **Chapter 5** relates Abl-related gene (Arg) activity in endothelial cells to an altered

cell-matrix interaction, in which the internalization of $\alpha 5\beta 1$ integrins facilitates cell retraction and agonist-induced endothelial barrier disruption. Moreover, this mechanism is shown to be relevant in inflammatory disorders *in vivo* and associates with endothelial barrier dysfunction. By the previously shown pharmacological inhibitor potential, Arg is a valuable new drug target with important clinical implications in the field of vascular leak.

In **Chapters 6 and 7** we addressed two physical parameters that can influence endothelial barrier function: blood flow and impaired oxygenation. In **Chapter 6**, we show that the biomechanical force applied by the flow of blood on endothelial cells (shear stress)- and Krüppel-Like Factor 2 (KLF2)-induced formation of actin shear fibers is specifically Diaphanous Related Formin 2 (DRF2) dependent. However, counter intuitively, the appearance of these actin structures was not accompanied by higher contractile forces exerted on the matrix and did not contribute to the thrombin-induced endothelial contraction. DRF2-dependent actin reorganization and stabilization of focal adhesions enables the endothelium to resist shear stresses and maintain integrity of the endothelium.

In **Chapter 7**, we show that the barrier protective effect under hypoxic conditions is mediated via increased VE-cadherin expression in the adherens junctions, resulting in improved cell-cell contacts. This effect is regulated by the stabilization of Hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α , but not HIF-1 α , in the absence of oxygen. Moreover, we observed decreased cell motility, - micromotion and lamellipodia formation, without significantly affecting the generation of traction forces after incubation in hypoxia. The hypoxia-mimetic DMOG improved the endothelial integrity in a similar, HIF-dependent fashion, but triggers additional effects on the cell-matrix interactions and traction force fluctuations, which probably relate to a rearrangement of F-actin cytoskeleton.

Finally, the implications of the studies presented in this thesis are discussed in **Chapter 8**. Here, we also elaborate on our initial hypotheses, new models and the identification of promising new candidates for future drug development against vascular leakage.

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.

Dankwoord

Mijn proefschrift is dan nu toch echt bijna afgerond. Met het schrijven van dit dankwoord sluit ik een periode af waar ik met veel plezier en voldoening op terug kijk. Zoals elke onderzoeker weet is promoveren niet iets wat mogelijk is zonder de onvoorwaardelijke steun van collega's, vrienden en familie. Bij deze wil ik dan ook iedereen bedanken die de afgelopen jaren direct en indirect zijn bijdrage heeft geleverd aan de totstandkoming van dit proefschrift.

Allereerst Dr. G.P. van Nieuw Amerongen. Beste Geerten, ik wil graag beginnen met het bedanken van iedereen bij jou. Jij bent immers de gene geweest die dit ambitieuze project heeft opgezet en mij de mogelijkheid heeft geboden om aan dit traject te beginnen. Je hebt me altijd uitgedaagd scherp te formuleren, nieuwe verbanden te leggen en mezelf te ontwikkelen als onderzoeker. Hierbij zijn vooral je gedrevenheid en enthousiasme me bijgebleven. Ik herinner me dan ook vooral mijn vers geprinte grafieken die je doormiddel van een aantal snelle halen met je vulpen voorzag met de meest innovatieve verbanden. Deze betrokkenheid en toegankelijkheid heb ik altijd erg gewaardeerd.

Prof. V.W.M. van Hinsbergh - Victor, het destilleren van de juiste boodschap uit een bepaalde dataset heb je verheven tot een ware kunst. Als je deze eigenschap dan ook nog eens combineert met een voorliefde voor het puzzelen met woorden, moet je wel de juiste persoon zijn om promovendi in hun laatste periode van hun promotie te ondersteunen. Ondanks onze ander visie op lichamelijke activiteit: "Bewegen is goed, maar het moet niet op sporten gaan lijken", heb ik altijd erg plezierig met je samengewerkt. Het is een groot gemis dat in het nieuwe O² gebouw de overweldigende stapels artikelen uit je kantoor zijn verdwenen. Op, voor mij nog steeds, miraculeuze wijze wist je daaruit altijd binnen afzienbare tijd het gewenste paper of figuur naar boven te vissen. Bedankt voor alle inzet en geboden hulp.

Prof. P.L. Hordijk, Beste Peter, met jouw aantreden bij het VUMC begon mijn laatste jaar als promovendus. Door je directe en open manier van communiceren, in combinatie met je altijd zorgvuldige en snelle commentaar, raakten we snel op elkaar ingespeeld en heb je je opgeworpen als voortreffelijk begeleider. Ik voel me dan ook bevoorrecht om de eerste VUMC promovendus te zijn die met jou als promotor promoveert.

Graag wil ik ook mijn promotiecommissie, bestaande uit: Prof. Dr. Coen Ottenheim, Prof. Dr. Elga de Vries, Prof. Dr. Niels van Rooijen, Prof. Dr. Kees Jalink, Prof. Dr. Jan Voorberg en Dr. Stephan Huveneers bedanken voor het zorgvuldig lezen van mijn proefschrift en het deelnemen aan mijn verdediging.

Ook ik wil graag mijn paranimfen even apart bedanken:

Iris, mijn zusje en tegenwoordig ook promovendus. Wat ben ik trots dat je je eigen weg hebt gevonden en dat je me straks wil bijstaan tijdens mijn verdediging. Het blijft leuk dat we nu in eenzelfde vakgebied werkzaam zijn en ik vind het vooral stoer dat je nu al weer je volgende internationale avontuur bent aangegaan.

Tessa, we zijn nagenoeg gelijktijdig begonnen aan ons promotietraject, werden al snel kamergenoten

en zijn zelfs nog een gezamenlijk project gestart. Bedankt voor alle adviezen, gezamenlijk lunches en gezellige congres bezoeken. Ik hoop dat je doorzettingsvermogen en harde werken op korte termijn zal worden beloond met je eigen PhD-titel.

Dan mensen van de vasculaire permeabiliteitsgroep: Joanna, Jurjan, Manon, Nina, Robbert en ook de mensen die later of tussentijds zijn aangesloten: Aziz, Igor, Marc, Natalija, Nicole, en Pan, bedankt voor alle hulp, wetenschappelijke discussies en input op mijn data. Daarnaast wil ik Jan nog even in het bijzonder bedanken als motor van de vasculaire permeabiliteit groep, om zijn technische expertise en zijn ondersteuning op het lab, maar vooral ook voor de leuke gesprekken over onze gezamenlijke hobby's.

Natuurlijk moet ik ook mijn kamergenoten bedanken voor de goede en vooral ook gezellig werksfeer van de afgelopen jaren: Constantijn, ondanks dat je maar parttime aanwezig was en je vaak druk bezig was met de voor jouw soms wat te basale lab werkzaamheden, heb ik genoten van de klinische verhalen en vooral je gevoel voor humor. Pleuni, ik ken maar weinig vrouwen die in het donker en in de kou, na het werk nog even snel solo een rondje ringvaart gaan fietsen a 34 gemiddeld, je bent echt een sportief talent. Toch herinner ik je vooral als goedlachse Brabantse flapuit met een driedubbel volgeboekte agenda. Erik van P., in je drukke bestaan als arts en onderzoeker vergat je nog wel eens de tijd en kwam je tussen je experimenten soms verwart binnen zetten, maar wat hebben we een lol gehad om jouw mooie weekend verhalen, je eeuwige strijd om naamsbehoud en je altijd levendige discussies. Paul, je was de laatste aanwinst op onze oude medische faculteitskamer, waardoor we maar beperkt onze werkplek hebben gedeeld. Ondanks dat heb ik je leren kennen als een sociale, gedreven collega en vooral ook trotse papa.

Ook de overige collega's van de afdeling fysiologie bedankt voor al het hulp, samenwerkingen en gezelligheid. Afdelingshoofden Geert Jan Tangelder en Jolanda van der Velden; maar ook Aimée, Andreas, Ariëlle en Duncan voor alle ondersteunende hulp. En dan nog een hele lijst, waarin ik hopelijk niemand ben vergeten: Alexander, Alice, Anouk, Aref, Barbara, Bianca, Bob, Charissa, Chris, Coen, Danielli, Diederik, Dimitar, Dop, Ed, Elza, Emmy, Ester, Femke, Frances, Ger, Gerrina, Hans, Ilse, Ingrid, Isabelle, Jeroen, Josine S., buurvrouw Josine de W., Kakkhee, Kim, Lynda, Maike, Marian, Marloes, Martijn, Max, Melissa, Michiel H., Michiel van W. , Nazha, Nicky, Pieter, René, Rick, Rob J., buurman Rob W., Rosalie, Rowan, Ruud, Silvia, Stefan, Sylvia, Ton, Vaishali, Vasco, Walter, Wies, Willem en Zeineb. Daarnaast heb ik tijdens mijn promotie traject hulp gehad van een drietal masterstudenten; Lona, Laween en Amar. Bedankt voor al jullie betrokkenheid en inzet tijdens deze periode.

I would like to devote a special word of acknowledgment to our devoted collaborator in Boston. Thank you Rama for opening up your lab for me during both my visits and teaching me the basics of the traction force microscopy method. Despite your busy schedule you helped me establish our own set-up in Amsterdam, provided us with your analysis software and came up with some good suggestions that improved my work significantly. Thanks for all the help and supervision.

Er is ook nog een onderzoeker van buiten de afdeling die ik even apart wil bedanken: Ruud Fontijn, bedankt voor onze fijne samenwerking in het DRF/KLF project.

Daarnaast moet ik natuurlijk even stil staan bij mijn uit de hand gelopen hobby; het marathon schaatsen en skeeleren. Ik durf gerust te stellen dat ik verslaafd ben aan deze sporten, waarin ik - naast mijn werkzaamheden als promovendus - de nodige tijd en energie investeerde. Gelukkig kreeg ik er zeker even veel energie voor terug, aangevuld met voldoening, ervaringen en mooie verhalen. Dit maakte alle opofferingen en het afzien meer dan de moeite waard en hiervoor wil ik dan ook de gehele organisatie van Team Port of Amsterdam/SKITS, de gewestelijke trainingsgroep, en specifiek mijn ploeggenoten tijdens deze periode - Antoine, Bart, Christoffel, Felix, Jan-Maarten, Johan, Kevin, Max, Pieter, Pim, Stan, Swen en Tijs - erg bedanken.

Glenn, Johan, Marnix, Mitchell, Rens, Paul en Shelley. Het is toch bijzonder dat we sinds onze middelbare schoolperiode al die tijd al bij elkaar zijn blijven komen. Het fanatisme bij de verschillende bordspelen is door de jaren heen nog bepaald niet verminderd en het dan ook altijd weer prachtig om te zien wat voor strategieën er nu weer worden bedacht om uiteindelijk te winnen. Hopelijk kunnen we dit ondanks onze drukke agenda's dit nog vele jaren blijven doen.

Mijn schoonfamilie; Huub, Sylvia en Sake, bedankt voor de vele gezellige etentjes en het altijd warme welkom in Haarlem.

Beste Pap en Mam, ik weet dat jullie erg trots zijn op Iris en mij als promoverende jong volwassenen, maar ik ben er van overtuigd dat dit vooral te danken is aan de stimulerende omgeving die jullie ons hebben geboden. Door het alsmaar stellen van vragen, jezelf te verwonderen en vervolgens op zoek te gaan naar antwoorden, werden we van jongs af aan (onbewust) getraind als echt onderzoekers. Hierbij herinner ik mij vooral het avondeten als uitgelezen moment voor openlijke discussies, waarbij veelvuldig de Bosatlas, encyclopedie of het woordenboek op tafel verscheen met de woorden (Jos): "Dat zoeken we op!" Daarnaast ben ik jullie eeuwig dankbaar voor alle tijd die jullie met mij hebben doorgebracht aan de keukentafel, bureau en in de auto. Was het niet om extra te oefenen met leren of lezen, dan was het wel weer halen en brengen naar remedial teaching of sport. Als ik daar nu op terug kijk heb ik daar niet alleen mijn zwakkere punten verbeterd, maar lag daar ook de basis van het doorzettingsvermogen en de discipline die me gevormd hebben tot wie ik nu ben.

Tot slot wil ik dan natuurlijk nog één iemand in het speciaal bedanken. Imke, bedankt voor al je liefde, zorg en betrokkenheid voor al weer bijna 10 jaar. Zonder jouw aan mijn zijde was mijn promotie periode nog een stuk saaier, zwaarder en hectischer geweest. Ook was de combinatie met de onze zo geliefde sporten zeker niet op dit niveau mogelijk geweest. Ik ben je erg dankbaar voor alle momenten die nu al samen hebben beleefd en ik hoop dat we ook in de toekomst nog lang van elkaar mogen genieten.

List of Publications

Amado-Azevedo J, **Valent ET**, van Nieuw Amerongen GP. Regulation of the endothelial barrier function: a film granum of cellular forces, Rho-GTPase signaling and microenvironment. *Cell and Tissue Research* 2014; 355(3): 557-576

Valent ET*, Beckers CML*, Knezevic N*, Tauseef M, Krishnan R, Rajendran K, Hardin CC, Aman J, van Bezu J, Sweetname P, van Hinsbergh VWM, Mehta D, van Nieuw Amerongen GP. ROCK2 primes the endothelium for vascular hyperpermeability responses by raising baseline junctional tension. *Vascular Pharmacology* 2015; 70: 45–54

Valent ET, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM, Hordijk PL. Traction force dynamics predict gap formation in activated endothelium. *Experimental Cell Research* 2016; 347: 161–170

Valent ET*, Nauta TD *, van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Aman J, van Hinsbergh VWM. HIF-2 α regulates hypoxia-induced strengthening of the human endothelial barrier by stabilizing adherens junctions. *Submitted*

Valent ET*, Fontijn RD*, Leyen TA, Szulcek R, Baggen JM, Geerts D, van Nieuw Amerongen GP, Horrevoets AJG. Diaphenous Related Formin 2 is essential for KLF2-induced resistance of endothelial cells to flow forces. *Submitted*

Valent ET*, Azevedo JM*, van Bezu J, Eringa E, Hoevenaars FMH, Margadant C, Krishnan R, Hordijk PL, van Hinsbergh VWM, van Nieuw Amerongen GP, Aman J. Arg mediates endothelial barrier disruption by impairing integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated cell adhesion. *Submitted*

*shared first authorship

Curriculum vitae

Erik Tijmen Valent was born in Amstelveen, The Netherlands, on June 23, 1988. After finishing his secondary education at the Hermann Wesselink College in Amstelveen, he started a study in Human Health and Life Sciences at the VU University Amsterdam. He obtained his bachelor degree in 2009 and subsequently enrolled for a master training in Cardiovascular Research at the same university. As part of this study he performed two internships, of which the first minor training was at the Department of Pathology from the VU University Amsterdam. He conducted his major master internship at the Department of Cardiovascular Physiology from the Ruhr University in Bochum, Germany. After obtaining his Master degree *cum laude* in 2011, he started as a Ph.D. student at the Department of Physiology/ Institute for Cardiovascular Research of the VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. His research concentrated on endothelial-derived contractile forces and their impact on vascular permeability, which was supervised by prof. V.W.M. van Hinsbergh, dr. G.P. van Nieuw Amerongen and later also prof P.L. Hordijk. For the implantation of the traction force microscopy method he visited twice dr. R. Krishnan of the Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA, in July 2012 and September 2014. These laboratory visits were additionally financed by the dr. W. Stiggelbout program of the Netherlands Heart Foundation. The results of his research are presented within this thesis.

Erik Tijmen Valent werd geboren in Amstelveen, Nederland, op 23 juni 1988. Na het afronden van het voortgezet onderwijs aan het Hermann Wesselink College in Amstelveen, begon hij met een studie Gezondheid en Leven aan de Vrije Universiteit van Amsterdam. Na het behalen van zijn bachelor diploma in 2009, startte hij met een master opleiding in de Cardiovasculaire Wetenschappen aan dezelfde universiteit. In het kader van deze opleiding verrichte hij twee stages, waarvan de eerste plaats vond op de afdeling van pathologie aan de Vrije Universiteit van Amsterdam. Zijn tweede, langere stage verrichte hij aan de afdeling voor Cardiovasculaire fysiologie van de Ruhr Universiteit van Bochum, Duitsland. Na het *cum laude* behalen van zijn master diploma in 2011, begon hij aan zijn promotie traject bij de afdeling voor fysiologie/ Instituut voor Cardiovasculaire onderzoek van het VU Medisch Centrum, Amsterdam. Zijn onderzoek was gericht op de door endotheel ontwikkelde contractiele krachten en hun impact op vaatpermeabiliteit wat plaatsvond onder begeleiding van prof. V.W.M. van Hinsbergh, dr. G.P. van Nieuw Amerongen en later ook prof P.L. Hordijk. Voor de implementatie van de gebruikte traction force microscopie methode bezocht Erik twee keer dr. R. Krishnan van het Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA, in juli 2012 en september 2014. Beide bezoeken werden additioneel gefinancierd door het dr. W. Stiggelbout programma van de Nederlandse Hart Stichting. De resultaten van zijn promotie onderzoek staan beschreven in dit proefschrift.

