

VU Research Portal

Angiogenesis in a fibrinous matrix

Laurens, N.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Laurens, N. (2008). *Angiogenesis in a fibrinous matrix*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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

Angiogenese, ook wel neovascularisatie genoemd, is het proces waarbij nieuwe bloedvaten worden gevormd uit reeds bestaande bloedvaten. Angiogenese is een nauwkeurig proces dat essentieel is voor normale fysiologische gebeurtenissen zoals wondheling, maar ook onmisbaar is voor groei van tumoren en hun metastasen. Endotheelcellen vormen de binnenbekleding van een bloedvat. Zij kunnen na activatie door bijvoorbeeld groeifactoren, cytokinen of ontstekingscellen, hun onderliggende basaal membraan gedeeltelijk afbreken en passeren. Daarna zullen de endotheelcellen de extracellulaire matrix (ECM) dat het bloedvat omringt, binnendringen, waarbij zij delen en vervolgens een netwerk van nieuwe vaatjes vormen.

Bij weefselschade wordt fibrine gevormd om de wond te dichten. Dit fibrine vormt een tijdelijke matrix, waar de endotheelcellen in migreren en nieuwe vaatjes vormen, die bijdragen aan het weefselherstel. Om deze voorlopige matrix te kunnen invaderen moeten de endotheelcellen de juiste matrixreceptoren (integrines) en proteasen tot expressie brengen. Later, na het ingroeien van endotheel- en weefselcellen wordt een permanente matrix gesynthetiseerd.

Tijdens angiogenese spelen proteasen die een rol spelen bij het oplossen van fibrine (fibrinolyse) en andere matrixeiwitten, een belangrijke rol. Hoewel de exacte rol van fibrinolyse tijdens angiogenese nog niet helemaal bekend is, is de rol voor de fibrinolyse regulerende proteasen uPA en tPA (urokinase- en tissue-type plasminogeen activator) en plasmine wel aangetoond bij de uitgroei van vaatjes in kweek. Echter, over de rol van deze eiwitten bij angiogenese *in vivo* bestaat nog onzekerheid. Ook andere modulators van de fibrinolyse, met name het eiwit TAFI, zijn in verband gebracht met de regulatie van angiogenese. Hoewel een rol van TAFI in de heling van huidwonden is aangetoond, is het op dit moment onduidelijk of een effect via angiogenese hierbij betrokken is.

Naast fibrinolyse en matrixdegradatie speelt de migratie van endotheelcellen tijdens het proces van angiogenese een belangrijke rol. Voor dit proces zijn onder meer integrines van belang. Integrines zijn celadhesie moleculen die zorgen voor de binding van endotheelcellen met ECM componenten zoals fibrine, fibronectine en vitronectine. Er is met name onderzoek gedaan naar $\alpha v\beta 3$ - en $\alpha 5\beta 1$ -integrines, omdat deze integrines tot expressie worden gebracht op angiogene endotheelcellen. Kruisgewijze communicatie tussen integrines alsmede compenserende mechanismen van andere integrines laten zien hoe complex het werkingsmechanisme van integrines is. Op dit moment wordt er veel gespeculeerd over het werkingsmechanisme van integrines en is de exacte rol in

angiogenese nog niet helemaal bekend. Desalniettemin zijn de resultaten van preklinische studies met anti-integrine moleculen veelbelovend en hebben geleid tot verder onderzoek in klinische studies. Naast een rol in celadhesie dienen integrines ook als transmembrane receptoren die de binnenkant van de cel verbinden met de buitenkant van de cel. Op deze manier moduleren integrines signaaltransductie routes die leiden tot reorganisatie van het cytoskelet en uiteindelijk tot voortbeweging van de cel dat nodig is voor angiogenese.

Het onderzoek in dit proefschrift beschrijft de verschillende aspecten van angiogenese dat over het algemeen in drie delen kan worden ingedeeld. In het eerste deel wordt de rol van fibrine beschreven als belangrijke matrix component tijdens wondheling. Het tweede deel beschrijft modulators van het angiogenese proces zoals plasminogeen en TAFI. Integrines behoren ook tot modulators van angiogenese, omdat de expressie van integrines en de daar opvolgende activatie mede de mogelijkheid voor het vormen van vaten biedt. In het derde deel wordt er dieper ingegaan op cel signaaltransductie routes die betrokken zijn bij angiogenese, met name de routes die reorganisatie van het cytoskelet beïnvloeden.

In **hoofdstuk 1** wordt de huidige literatuur over angiogenese en de verschillende aspecten van het proces uitvoerig besproken. Dit omvat de rol van ECM componenten, proteolyse en groeifactoren, maar ook de regulatie van angiogenese door modulators zoals TAFI, integrines maar ook cel signaaltransductie moleculen die de regulatie van het cytoskelet beïnvloeden.

In **hoofdstuk 2** wordt de rol van fibrine tijdens wondheling nader gereviewd en wordt een overzicht gegeven van de belangrijke processen zoals de lekkage van fibrine in de wond, de ontwikkeling van een tijdelijke matrix, het stabiliseren van de bloedplaatjesprop en de ontwikkeling van een fibrine matrix. Achtereenvolgens worden proteolyse en modulering van het proces van angiogenese beschreven waarbij de interactie tussen fibrine en endotheelcellen een essentiële rol speelt tijdens wondheling. Samengevat is de conclusie van dit hoofdstuk dat de structurele compositie van fibrine en de binding van fibrine aan cellen en eiwitten in zeer hoge mate het proces van wondheling bepalen.

Het is reeds aangetoond dat activatie van plasminogeen een essentiële rol speelt tijdens de proteolytische degradatie van extracellulaire matrices in de modulering van het weefsel. In **hoofdstuk 3** hebben we de rol van plasminogeen bij de vorming van nieuwe bloedvaatjes tijdens weefselherstel beschreven. Bij dit onderzoek is gebruik

gemaakt van sponzen die subcutaan zijn ingebracht in muizen, waarbij plasminogeen deficiënte muizen en de wildtype muizen met elkaar vergeleken zijn. Aan de hand van immunohistochemische analyse van het granulatie weefsel is een significante afname van het binnenstromen van cellen in de tijdelijke matrix waarneembaar en een afname van de vaatvorming in plasminogeen deficiënte muizen in vergelijking tot de wildtype muizen. Met dit onderzoek hebben we niet alleen aangetoond dat het fibrinolytisch systeem van groot belang is voor effectieve angiogenese, maar ook dat in een fibrineuze matrix in plasminogeen deficiënte muizen angiogenese en modulering van het weefsel nog steeds kan plaats vinden, hoewel dit met een langzamere snelheid zal zijn.

In **hoofdstuk 4** is de rol van plasminogeen tijdens cel migratie en angiogenese verder geëvalueerd. Dit is onderzocht door TAFI en CPB, twee verwante carboxypeptidasen, die de fibrinolyse beïnvloeden, toe te voegen tijdens de vorming van vaten in het *in vitro* model, dat grotendeels afhankelijk is van plasminogeen. Toevoeging van TAFI of CPB aan de matrix resulteerde in een afname van de vaatstructuren. Voorbehandeling van endothelcellen met CPB in combinatie met toevoeging van CPB aan de matrix, resulteerde in een additionele afname van de vaatstructuren tot een niveau dat vergelijkbaar is met de remming van de plasmine remmer aprotinine. Dit zou kunnen betekenen dat het uPA/plasmine systeem interfereert met dit proces.

De ontwikkeling van capillair-vormige vaten in het *in vitro* model waarbij gebruik wordt gemaakt van een fibrineuze matrix, hangt grotendeels af van het uPA/plasminogeen systeem, maar vereist ook de betrokkenheid van RGD-bindende integrines. In **hoofdstuk 5** hebben we aangetoond dat vaatvorming beïnvloedt wordt door de toevoeging van ofwel een monoklonaal antilichaam LM609 dat het $\alpha v \beta 3$ -integrine remt, dan wel het monoklonaal antilichaam IIA1 dat het $\alpha 5$ -integrin remt. Opmerkelijk is dat indien zowel $\alpha v \beta 3$ - als $\alpha 5 \beta 1$ -integrine tegelijk worden geremd, vaatvorming significant zal afnemen. Deze afname gaat gepaard met een afname van uPA antigen accumulatie en minder afgifte van fibrine degradatie producten. Daarnaast vergroten $\alpha v \beta 5$ -integrine remmende antilichamen het remmende effect van LM609 en IIA1, maar al deze antilichamen hebben geen remmende werking als ze alleen worden gebruikt. Remming van neovascularisatie in het fibrineuze exudaat van een muis door het $\alpha v \beta 3$ - en $\alpha 5 \beta 1$ -integrine remmende peptide GRGDSP, laat een afname van 63% in vaatvorming zien, terwijl de αv -remmende peptide cRGD niet significant de neovascularisatie beïnvloedt. Deze resultaten laten zien dat het blokkeren van de vaatvorming in een fibrineus exudaat vereist dat zowel $\alpha v \beta 3$ - als $\alpha 5 \beta 1$ -integrine tegelijkertijd worden geremd en dat dit gevolg kan hebben voor pogingen om angiogenese te remmen in een fibrineuze omgeving.

In **hoofdstuk 6** hebben we de differentiële genexpressie tussen angiogene en niet-angiogene endotheelcellen in een fibrineuze matrix onderzocht. Indien VEGF, bFGF en TNF- α 7 dagen lang aan endotheelcellen uitgezaaid op een fibrineuze matrix werden toegevoegd, dan ontstond er een celcultuur van capillairvormige endotheelcellen en een monolaag van niet-angiogene endotheelcellen. Een methode is toen ontwikkeld om de twee populaties endotheelcellen van elkaar te scheiden, rekening houdend met het intact houden van de cellulaire compositie voor mRNA extractie en cDNA productie. Array analyse is toegepast en differentiële genexpressie is geverifieerd door middel van realtime PCR en dwarsdoorsnedes vervaardigd door laser-capture microdissectie. De resultaten laten zien dat CDC42GAP, een remmer van het actieve Rho GTPases, een van de genen is, waarvan de expressie omlaag gereguleerd wordt in angiogene endotheelcellen in vergelijking tot de monolaag niet-angiogene endotheelcellen. Overexpressie van CDC42GAP in endotheelcellen resulteerde in een afname van de vaatvorming, terwijl de onderdrukking van deze GTPase activerend eiwit door siRNA de vaatvorming enigszins deed toenemen. Daarom is CDC42GAP geïdentificeerd als een tegen-regulator van de vaatvorming.

In **hoofdstuk 7** is de algemene discussie weergegeven van het gehele onderzoek beschreven in dit proefschrift, in relatie tot de huidige ontwikkelingen in het angiogenese onderzoeksveld. De bijdrage van zowel de fibrine structuur als plasminogeen aan het wondhelings proces is verder bediscussieerd. De rol van plasminogeen, TAFI en integrines als modulators van het angiogenese proces is onderzocht tijdens de ontwikkeling van vaten in een fibrineuze matrix. Bovendien is er geprobeerd inzicht te krijgen in de rol van de GAP gen familieleden tijdens angiogenese met CDC42GAP in het bijzonder.