

VU Research Portal

Progenitor Cells and Hypoxia in Angiogenesis

Verloop, R.E.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Verloop, R. E. (2011). *Progenitor Cells and Hypoxia in Angiogenesis*.

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

Het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift heeft zich gericht op de verschillende onderdelen van neovascularisatie: de vorming van nieuwe bloedvaten. Neovascularisatie is essentieel voor het waarborgen van transport van zuurstof en energie-leverende brand- en bouwstoffen naar de weefsels. Tevens dienen toxische afvalproducten weggevoerd te worden door de bloedcirculatie. Neovascularisatie omhelst drie processen, te weten vasculogenese, angiogenese en arteriogenese. Bij al deze drie processen spelen endotheelcellen, de cellen waaruit de binnenste laag van alle bloedvaten zijn opgebouwd, en die in direct contact met het bloed staan, een essentiële rol. Bij vasculogenese worden compleet nieuwe haarvaatjes (capillairen) gevormd door endotheel-voorlopercellen, terwijl bij angiogenese de nieuwe vaatjes gevormd worden door endotheelcellen die aftakkingen maken aan reeds bestaande bloedvaten. Het mechanisme waarbij bestaande bloedvaten uitgroeien naar vaten met een grotere diameter wordt aangeduid als arteriogenese. Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar vasculogenese en angiogenese.

Slagaderverkalking (arteriosclerose), bloedstolsels (trombi) en circulerende stolsels, die zich op een andere locatie vastzetten aan de vaatwand (embolieën), veroorzaken vernauwingen of complete afsluitingen van bloedvaten, wat ischemie tot gevolg kan hebben. Dit proces wat kort samengevat kan worden als 'onvoldoende doorbloeding' resulteert in een stapeling van afvalstoffen en een verminderde aanvoer van zuurstof (hypoxie) en bouwstoffen. De weefsels en organen die verstopt blijven van een constante aanvoer van deze stoffen kunnen in problemen raken na een bepaalde tijdsduur die afhankelijk is van de metabole activiteit. Voorbeelden van metabool actieve organen zijn de hersenen en het hart, die al snel (binnen minuten) onomkeerbare schade oplopen, als hun bloedvoorziening niet op peil blijft.

Ondanks de medische vooruitgang in de laatste jaren hebben het verhoogde voorkomen van zwaarlijvigheid (obesitas) en suikerziekte (diabetes) alsmede de steeds ouder wordende bevolking ervoor gezorgd dat de incidentie van ischemische hart-en vaatziekten sterk is toegenomen. Naast medicijngebruik en chirurgische interventie zou het stimuleren van het lichaamseigen vermogen tot neovascularisatie een alternatieve benadering zijn om ischemie op te heffen. De postnatale groei en ontwikkeling, wondgenezing en vorming van granulatieweefsel zijn voorbeelden waarbij nieuwe bloedvaten gemaakt worden in het volwassen leven. Echter, de snelheid en capaciteit van dit systeem zijn vaak onvoldoende om de gevolgen van grotere vernauwing en verstoppingen op te vangen. Een beter begrip van de mechanismen van neovascularisatie kan helpen om nieuwe therapieën te ontwikkelen die deze

tekortkomingen kunnen overbruggen.

In de eerste drie hoofdstukken van dit proefschrift (**hoofdstuk 1-3**) worden overzichtsverhalen gepresenteerd die een solide basis vormen voor de daaropvolgende experimentele hoofdstukken over vascularisatie-ondersteunende endotheel-voorlopercellen (**hoofdstuk 4 en 5**), pro-angiogene stromale cellen (**hoofdstuk 6**) en de belangrijkste regulator en controleur van vascularisatie: hypoxie (**hoofdstuk 7**).

In **hoofdstuk 1** wordt het mechanisme van adulte neovascularisatie belicht, dat grofweg bestaat uit drie processen, die zorgdragen voor het herstel of adaptatie van het vaatbed. Ten eerste wordt het aftakken van nieuwe bloedvatjes van bestaande bloedvaten beschreven (angiogenese). Bij arteriogenese wordt het voorliggende vaatbed omgebouwd waardoor een hogere en grotere bloedstroom mogelijk wordt gemaakt en het nieuwe perifere vaatbed efficiënt voorzien wordt van bloed. Als laatste wordt adulte vasculogenese besproken, dat beschouwd wordt als een additionele manier van vascularisatie. Hierbij migreren en differentiëren voorloper-(progenitor)cellen in vaatwandcellen, die zowel de reeds aanwezige endotheelcellen ondersteunen, alsmede zelf nieuwe bloedvatjes bouwen.

Hoofdstuk 2 beschrijft sprouting (formatie van aftakkingen) angiogenese, en een van de belangrijkste regulatoren, te weten de membraangebonden proteasen. Deze proteasen bestaan uit een zeer diverse groep enzymen die eiwitten en ketens van aminozuren kunnen afknippen van matrixmoleculen. Dit hoofdstuk beschrijft de verschillende families van proteasen die buiten cellen werken en hun 'klassieke' rol in matrixafbraak, geleiding van cel invasie en lumen formatie (het creëren van een doorlopende opening binnen in nieuw gevormde bloedvaten). Hier houdt de functie van proteasen echter niet op. Dit hoofdstuk benadrukt de rol van proteasen in het onderhoud van de matrix buiten bloedvaten, modificatie van matrix en circulerende eiwitten die daardoor nieuwe eigenschappen verkrijgen, controle op het immuunsysteem, en het recruteren van beenmergafkomstige voorlopercellen die angiogenese versterken. De laatste paragrafen van dit hoofdstuk beschrijven de mogelijkheid van sommige proteases om als kandidaat biomarker te functioneren bij bepaalde aandoeningen, en het perspectief en de complexiteit van farmacologische remming van proteasen als therapie bij aandoeningen waarbij neovascularisatie een rol speelt.

Hoofdstuk 3 sluit aan op **hoofdstuk 2** en geeft een overzicht van de mobilisatie, gerichte migratie en participatie van voorlopercellen in de endotheellaag van nieuw gevormde bloedvaten. Nadruk wordt gelegd op de twee verschillende soorten endo-

theel-voorlopercellen die nu (h)erkend worden. De eerste populatie voorlopercellen bestaat uit zogeheten vroege-uitgroeï cellen, ook wel kolonie-vormende endotheelcellen (*colony-forming unit endothelial cell*, CFU-EC) genoemd. Deze celpopulatie bestaat uit myeloïde cellen (cellen die o.a. kunnen differentieren in monocyten en granulocyten) die bepaalde eigenschappen van endotheelcellen kunnen aannemen, maar zelf niet kunnen uitgroeien tot volwaardige endotheelcellen. Deze cellen stimuleren neovascularisatie door middel van de productie van groeifactoren en cytokinen, maar worden niet opgenomen in de endotheellaag van bloedvaten. De tweede populatie cellen bestaat uit endotheel kolonievormende cellen (*endothelial colony-forming cells*, ECFC). ECFC hebben een hoge delingscapaciteit, kunnen opgenomen worden in de endotheellaag, en vormen onder invloed van die correcte stimuli nieuwe bloedvaatjes. Dit hoofdstuk bediscussieert recente inzichten in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij mobilisatie en recrutering van voorlopercellen naar gebieden van neovascularisatie, waarbij proteasen en hun receptoren een vitale rol hebben.

De bijdrage van CD34-positieve cellen, als een gesuggereerde bron van endotheel-voorlopercellen, aan *in vitro* bloedvatvorming wordt behandeld in **hoofdstuk 4**. Wij demonstreren dat deze celpopulatie een specifieke vormkeur heeft om zich te nestelen op plaatsen waar het endotheel bloedvaatjes vormt. De CD34⁺ cellen vermeerderen zich, integreren in de endotheellaag en hebben een mild stimulerende werking op capillair formatie. Daarnaast wordt in de hoofdstuk bewijs aangedragen voor de ondersteunende functie van CD34⁻ op differentiatie van CD34⁺ cellen naar endotheelcellen en de sterke stimulering van neovascularisatie door co-culturen van CD34⁺ en CD34⁻.

Met het verloop van het onderzoek, zoals beschreven in dit proefschrift, nam ook de kennis toe van endotheel-voorlopercel karakterisatie en hun biologische functie. De CD34⁺ cellen, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, bleken na nieuwe/recentere studies niet te differentiëren in echte endotheelcellen, maar in zogeheten *colony-forming unit endothelial cells* (CFU-EC). Ondanks hun verwarrende nomenclature –CFU-EC blijken leukocytachtige cellen te zijn- zijn deze cellen wel in staat om angiogenese te ondersteunen. Zij ondersteunen dit proces niet door de levering van nieuwe endotheelcellen, maar door de productie van groeifactoren en aanverwante signaal moleculen. In **hoofdstuk 5** beschrijven we de tweede en later gedefinieerde *endothelial colony-forming cell* (ECFC) populatie en hun bijdrage aan een *in vitro* model voor bloedvatvorming. Dit type endotheel-voorlopercel (in dit hoofdstuk genoemd als *blood-outgrowth endothelial cell*, BOEC) bezit een hoge delingscapaciteit, brengt

een groot aantal endotheelmarkers tot expressie en stimuleert angiogenese zowel *in vitro* als *in vivo*. Wij rapporten in dit hoofdstuk een vergelijkende analyse van navelstreng- en perifeer bloed afkomstige BOEC. Deze twee bronnen leveren BOEC, die nagenoeg vergelijkbaar zijn in het endotheel fenotype dat zij vormen, en hebben eigenschappen die betrekking hebben op selectieve migratie, adhesie, ontsteking en *in vitro* angiogenese. Deze resultaten suggereren dat BOEC van beide bronnen potentie hebben als neovascularisatie-stimulerende celtherapie.

Een ander type voorlopercel, dat net zoals de CFU-EC niet differentieert in echte endotheelcellen, maar wel vascularisatie stimuleert, is de mesenchymale stromale cel (MSC). **Hoofdstuk 6** beschrijft deze MSC, die een hoge mate van plasticiteit bezit en kan differentiëren in een scala aan celtypen. Wetenschappelijke publicaties betreffende deze MSC hebben laten zien dat het therapeutische effect van deze cellen voornamelijk veroorzaakt wordt door de productie van groeifactoren die op andere cellen hun invloed hebben (paracrine stimulatie). Deze factoren die door MSC worden geproduceerd en uitgescheiden, zouden mogelijk angiogenese kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 6** beschrijven we een onderzoek naar dit mechanisme. MSC blijken aanzienlijke hoeveelheden pro-angiogene groeifactoren uit te scheiden, waarvan VEGF (vascular endothelial growth factor) en HGF (hepatocyte growth factor) de meest potente factoren zijn die endotheelcel proliferatie en bloedvatvorming stimuleren.

Tijdens ischemie, wanneer de doorbloeding van een weefsel gecompromeerd is, ontstaat snel hypoxie. Dit fenomeen is het gevolg van een disbalans tussen de aanvoer van zuurstof en de vraag van weefsels naar zuurstof. Het weefsel reageert hierop door adaptatie processen in gang te zetten die onder andere de vascularisatie en zuurstoftoevoer moeten herstellen. *Hypoxia inducible factors* (HIF) zijn een familie van zogeheten transcriptiefactoren die genen activeren om deze adaptatie processen op te starten. Omdat endotheelcellen een cruciale rol spelen in angiogenese is er een uitgebreide hoeveelheid data beschikbaar over het effect van hypoxie op het endotheel transcriptoom (het geheel van genen die tot expressie komen). Deze studies hebben zich voornamelijk gericht op het effect van *kortdurende* hypoxie. Aangezien ischemische aandoeningen voornamelijk *langdurige* hypoxie veroorzaken, hebben wij deze factor onderzocht in **hoofdstuk 7**. Wanneer wij onze data over langdurige hypoxie vergeleken met vijf gepubliceerde studies over kortdurende hypoxie, bleek dat er veel overlap was in de geactiveerde genen. Het bleek dat de duur van hypoxie voornamelijk een kwantitatieve respons op genen induceerde in

endotheel cellen in plaats van een kwalitatief effect. Met andere woorden, er werden geen andere genen geactiveerd onder langdurige hypoxie, maar de mate van activatie was verschillend. Daarnaast vonden wij in onze experimenten aanwijzingen voor de rol van de transcriptiefactor KLF2, die tot dan toe niet geïdentificeerd was als een hypoxie-gereguleerde transcriptiefactor.

Hoofdstuk 8 vat alle resultaten van dit proefschrift samen en geeft een model waarin hypoxie en voorloper cellen van verschillende origine samenwerken om de vascularisatie te herstellen, danwel te stimuleren. Dit is bijvoorbeeld belangrijk in het werkveld van de *tissue engineering*. Dit relatief nieuwe onderzoeksgebied richt zich op het verkrijgen van (bio)implantaten om uitgevallen, beschadigde of slecht werkende organen en weefsels te ondersteunen of te vervangen, of het regeneratieve vermogen van organen zelf te induceren. Het moge voor zich spreken dat na implantatie van deze weefsels een snelle aansluiting op de bloedcirculatie van de acceptor en adequate perfusie van het geïmplanteerde weefsel nodig is om het in leven te houden. Daarnaast is voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën bij hart- en vaatziekten een beter begrip nodig van de bijdrage van (endotheel) voorloper cellen en de specifieke aanpassingen van het endotheel tijdens langdurige/chronische hypoxie. Alleen dan zullen (pre)klinische studies met als doel het herstellen van een efficiënte doorbloeding meer succesvol worden.