

VU Research Portal

Regulation of vascular permeability by RhoGTPases

Coelho Amado de Azevedo, J.M.

2018

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Coelho Amado de Azevedo, J. M. (2018). *Regulation of vascular permeability by RhoGTPases: Fiat Lux! (Let there be light!)*. [, 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

De cellen die de bloedvatwand bekleden, endotheelcellen, vormen een barrière tussen bloed en weefsels en regelen een adequate toevoer van voedingsstoffen naar de weefsels. Soms lekken er, vanuit het bloed, kleine moleculen en beperkte hoeveelheden plasma-eiwitten tussen de endotheelcellen door naar de weefsels. Deze vasculaire permeabiliteit (doorlaatbaarheid) is een essentieel aspect van o.a. de groei van nieuwe bloedvaten of het herstel van beschadigingen, lokale ontstekingsreacties en wondgenezing. Echter, bij trauma, sepsis, kanker en acute longschade wordt de endotheliale barrière verstoord en neemt de lekkage vanuit het bloed sterk toe. Dit kan oedeem en zwelling veroorzaken in het hart, de hersenen, lever of nieren en zo tot levensbedreigende situaties leiden. De behandelingsmogelijkheden voor vasculaire lekkage zijn beperkt, reden waarom de aandacht van artsen zich met name richt op het beperken van weefsel schade en het onderhouden van adequate doorbloeding van organen. Effectieve geneesmiddelen die endotheel-disfunctie voorkomen en lekkage vanuit het bloed verminderen zijn dus van het grootste belang. In dit proefschrift beschrijven we resultaten van onderzoek, gericht op het vinden van nieuwe doelwitten voor de behandeling van bloedvat-lekkage.

RhoGTPases als therapeutische doelen bij het beheersen van vasculaire lekkage

RhoGTPases zijn fundamentele regel-eiwitten in de biologie van endotheelcellen en bloedvat-integriteit (of barrièrefunctie). Van 22 bekende RhoGTPases is slechts voor een aantal gedetailleerde informatie beschikbaar (RhoA, Rac1, Cdc42 en meer recent RhoB). De meerderheid van RhoGTPases schakelen tussen een actieve en inactieve toestand in reactie op externe of interne signalen. Deze schakeling wordt gestuurd door RhoGEFs (activatoren) en RhoGAPs (inactivatoren) terwijl in rust de GTPases inactief gehouden worden door binding aan RhoGDIs (stabilisatoren). Het RhoA GTPase stuurt het samentrekken (contractie) van endotheelcellen, wat verlies van de barrière-functie veroorzaakt. Omgekeerd sturen de GTPases Rac1 en Cdc42 barrière-onderhoud en -herstel. Echter, de situatie is complexer, reden om de rol van deze eiwitten in meer detail te bestuderen.

I - Regulatie van de endotheliale barrière in niet-geactiveerde endotheelcellen

Ondanks het belang van de meeste RhoGTPases als doelwit voor het beheersen van vasculaire lekkage, is het remmen van hun functie in een levend dier of mens niet haalbaar. Dit komt omdat deze GTPases in veel weefsels belangrijk zijn. Dieren die, na genetische manipulatie, GTPases helemaal misten gingen vaak al dood tijdens de vroege ontwikkeling. Een alternatieve aanpak is om deze eiwitten uit de endotheelcellen te halen.

Wij hebben daarom 270 genen (22 RhoGTPases en 248 geassocieerde genen) tijdelijk één voor één verwijderd uit menselijke endotheelcellen, geïsoleerd en gekweekt uit de navelstreng (**hoofdstuk 3**). Van deze 270 genen vonden we dat er zes de endotheliale barrière negatief reguleren (ArhGAP45, SYDE1, RHOB, DEF6, PLXNB2 en DIAPH1) en vier positief (TIAM2, Cdc42, TEM4 en FARP1). Van alle 22 RhoGTPases was RhoB de enige die de top drie van significante hits bereikte. RhoB is van belang voor bloedvat functie, voor TNF- α -gemedieerde ontsteking en voor de expressie van het VE-cadherine, het membraan-eiwit dat cel-cel contact tussen endotheelcellen verzorgt. Omdat RhoB, net als RhoA, een negatieve regulator van de barrière is, wordt in endotheelcellen het niveau van het RhoB eiwit relatief laag gehouden. Interessant genoeg bleek een plexine (PLXNB2), een receptor op het celoppervlak met een RhoGAP-domein, ook een belangrijke negatieve regulator van de basale endotheliale barrière te zijn. We denken dat als verlies van de functie van PLXNB2 resulteert in een verhoogde barrièrefunctie, barrière-versterkers zoals Rac1 en CDC42 het doelwit zijn. Naast het identificeren van de GEF TIAM2 als een nieuwe regulator van endotheliale integriteit door de activering van Rac1, hebben we gevonden dat het gerelateerde Cdc42 en een aantal regulerende eiwitten (SYDE1-GAP, FARP1-GEF en PAK7-effector) een prominente rol spelen in het behoud van de endotheliale barrière. In overeenstemming hiermee hebben dierstudies aangetoond dat Cdc42 de RhoA-activiteit tegengaat en een cruciale rol speelt in de barrière-integriteit. Concluderend hebben we nieuw en aanvullend bewijs geleverd voor de cruciale rol van Cdc42 regulatie bij het mediëren van barrière-integriteit en remmen van ontsteking.

Onze resultaten hebben verder laten zien dat ArhGAP45, ook bekend als human minor histocompatibility antigen 1 (HMHA-1), een belangrijke negatieve regulator is van de barrière in niet-gestimuleerde endotheliale monolagen (**hoofdstuk 4**). Tot voor kort werd gedacht dat expressie van dit eiwit beperkt was tot hematopoëtische cellen en tumoren. Later werd echter waargenomen dat endotheelcellen en de placenta ArhGAP45 ook tot expressie brengen. In endotheelcellen resulteerde een vermindering van ArhGAP45 in een verbetering van de barrière en van de migratie van verschillende typen endotheelcellen. Onze gegevens geven aan dat het GAP-domein van ArhGAP45 Rac1 inactiveert, zoals ook eerder al in Jurkat T-cellen is gezien (de Kreuk et al. 2013). Immunokleuring van endotheelcellen zonder ArhGAP45 lieten een toename zien in cel-spreiding en reticulair junctions (honingraatachtige structuren) die VE-cadherine bevatten, in overeenstemming met een toegenomen barrièrefunctie. Onze gegevens toonden aan dat in rustende endotheelcellen er een continue, negatieve regulatie van Rac1-signalering door ArhGAP45 is.

Eenmaal actief, stimuleren de RhoGTPases zgn. 'effector-eiwitten'. Het formine 1 (mDIA1) is een bekende RhoA-effector en een krachtige activator van actine- en tubuline

polymerisatie. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat het verwijderen van mDIA1 uit primaire endotheelcellen de barrièrefunctie verbetert. mDIA1 en Rho-Kinase (ROCK) zijn de twee belangrijkste effectoren van RhoA die samenwerken bij vorming en stabilisatie van actine-filamenten. Beide effectoreiwitten zijn dus betrokken bij de reorganisatie van het cytoskelet en het genereren van intracellulaire spanning die uiteindelijk ook weer de barrièrefunctie beïnvloedt. Onlangs is aangetoond dat mDIA1 hyperpermeabiliteit in reactie op geavanceerde glycatie-eindproducten regelt, waarvan bekend is dat zij bijdragen aan diabetes-geassocieerde vaat-problemen. Onze bevindingen zijn hiermee in overeenstemming en geven aan dat mDia1 een belangrijke, negatieve regulator is van endotheliale integriteit en migratie.

II - Regulatie van de endotheliale barrière onder inflammatoire omstandigheden

Naast het analyseren van de bijdrage van RhoGTPases en geassocieerde genen in niet-geactiveerde endotheelcellen, hebben we ook gekeken naar hun rol in agonist-geïnduceerd verlies en herstel van endotheelcel-cel contacten (**hoofdstuk 6**). We hebben hiervoor het serine-protease trombine gebruikt dat een snelle contractie van de cellen en verlies van cel-cel contact veroorzaakt, gevolgd door een herstelfase. Het was al bekend dat trombine het RhoA GTPase activeert en zo, via het myosine-eiwit en contractie, de barrièrefunctie van endotheel remt.

Onze analyse identificeerde 15 verschillende eiwitten die een rol spelen in de trombine-geïnduceerde respons van endotheelcellen (RTKN, TIAM2, MLC1, ARPCB1, SEPT2, SLC9A3R1, RACGAP1, RAPGEF2, RHOD, PREX1, ARHGEF7, PLXNB2, ARHGAP45, SRGAP2, ARHGEF5). Verlies van deze 15 genen resulteerde in een verhoogde contractie of een vertraagd/verzwakt herstel na stimulatie met trombine. Interessant is dat, op basis van de literatuur, de meeste geïdentificeerde hits gerelateerd zijn aan Rac1. Verlies van de 4 bovengenoemde RacGEFs (ArhGEF5, P-REX1, ArhGEF7 and TIAM2) wijst op de cruciale rol die Rac1 heeft bij het tegengaan van permeabiliteits-verhogende effecten van RhoA.

Verrassend genoeg lijkt de atypische RhoGTPase RhoD een barrière-beschermende rol te spelen. Studies in fibroblasten hebben aangetoond dat RhoD-depletie de organisatie van het cytoskelet en de getroffen migratiesnelheden veranderde (Blom et al. 2017). Onze bevindingen tonen aan dat het verminderen van de RhoD-expressie de basale barrière-functie vermindert en de door trombine geïnduceerde contractie versterkt en het daaropvolgende herstel nadelig beïnvloedt. Deze waarnemingen suggereren een nieuw concept met betrekking tot RhoGTPases en de regulatie van de endotheliale barrière: RhoD, zelfs sterker dan Rac1, speelt een essentiële rol bij het behoud en de bescherming van de endotheliale barrière onder inflammatoire omstandigheden.

In overeenstemming met eerder onderzoek benadrukken onze bevindingen dat RhoGTPases sleutelrolspelers zijn in de regulatie van de bloedvatfunctie. Een nieuw aspect dat door onze waarnemingen wordt aangetoond, is dat RhoGTPases op differentiële wijze barrièrefunctie reguleren onder basale omstandigheden vs. tijdens ontsteking. De eiwitten die betrokken zijn bij basale regulatie zijn niet altijd dezelfde die de ontstekingsreactie reguleren. Rac1 en Cdc42 zijn essentieel voor onderhoud van barrière-integriteit in niet-gestimuleerde cellen met RhoB als negatieve regulator. Bij ontsteking lijken Rac1 en RhoD essentieel voor het beperken van RhoA-gemedieerde contractie en zijn Rac1 en RhoD betrokken bij het herstel van barrière-verlies. Deze resultaten kunnen mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor de behandeling van vasculaire lekkage en oedeem. Om in één afbeelding de belangrijkste bevindingen van ons onderzoek samen te vatten, hebben we de twee omstandigheden die we hebben geanalyseerd gegroepeerd en de belangrijkste bevindingen benadrukt: regulatie van basale barrière-integriteit en endotheliale respons op een inflammatoire mediator (Hoofdstuk 7, Fig.1, pag. 185)