Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/107851

File ID	107851
Filename	Chapter 9: Summary en Nederlandse samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Functional implications of endothelial cell genomics
Author	R.D. Fontijn
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2008
Pages	196
ISBN	9789090229959

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/274054

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

9

Summary & Samenvatting

SUMMARY

Chapter one introduces endothelial cells as the inner lining of the vascular tree. At this interface between the bloodstream and surrounding tissues, endothelial cells act as main regulators of vascular homeostasis. Haemostasis, leukocyte trafficking, vascular tone and permeability of the vessel wall are among the most prominent vascular processes that are regulated by the endothelium. To this purpose, endothelial cells constantly monitor the environment for biochemical or physical signals and elicit responses to these stimuli, such that vascular function and integrity is maintained. Failure of this control may lead to an unstable situation, i.e. loss of homeostasis, and vascular disease with atherosclerosis being the most prominent example. Responses of endothelial cells may involve both long- and short-term modifications of their gene-expression repertoire. Therefore, both monitoring of changes in endothelial transcription profiles due to atherogenic- or atheroprotective stimuli and functional study of genes that are part of these profiles, provide insight in molecular mechanisms that underlie vascular homeostasis and disturbance thereof.

Chapter two describes the generation of an endothelial cell line, EC-RF24. In vitro studies of biological processes often require cultured cells, bringing with it the choice of a suited model cell. In general, primary cells often maintain a differentiated phenotype, but are difficult to obtain in large amounts, show considerable donor-dependent genetic variation and have a limited life span in culture. The latter property precludes the use of primary cells for stable genetic modifications as these often require lengthy selection procedures for resistance-markers. Cell lines usually lack certain differentiation characteristics but provide a constant genetic background and can be obtained in large amounts as they can in principle be expanded indefinitely. For highly differentiated celltypes as endothelial cells, bona fide cell lines are scarce or even absent. Using an amphotrophic, replication-deficient retrovirus, the E6/E7 genes of human papilloma virus were introduced in primary vascular endothelial cells. The resulting endothelial cell line, EC-RF24 was extensively characterized and was shown to maintain all endothelial-specific properties that were tested for.

Chapter three describes the identification of 106 differential cytokine-responsive gene fragments in endothelial cells. During formation of atherosclerotic lesions, activated monocytes and macrophages in the (neo)intima will secrete several inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), which greatly affect the function of the overlying endothelium. Differential display of gene expression was used to monitor variation in mRNA levels of cultured endothelial cells that were exposed to monocyte conditioned

medium or TNF-α during 3, 6 and 20 hours. Full-length cDNAs were isolated for five transcripts that showed more than 10-fold induction or repression and include inhibitor of apoptosis-1, rabkinesin-6, stannin, apolipoprotein-L3 and a cDNA of unknown identity. In addition, expression of four novel transcripts was examined by in situ hybridization on healthy and atherosclerotic vascular tissue. IAP-1 and stannin were found to be expressed by endothelial cells as well as foam cells of the inflamed vessel wall. Apolipoprotein-L3 was specifically expressed in endothelial cells of the normal and atherosclerotic illiac artery and aorta. The data revealed a broad and complex change in the transcriptome of endothelial cells exposed to mediators of inflammation associated with atherosclerosis.

In chapter four, Rabkinesin 6 (RB6K), one of the cytokine responsive genes that emerged in the differential display described in chapter 3, is further examined. This motorprotein was previously reported to be associated with GTP-bound forms of Rab6 and was thus thought to play a role in directional vesicular traffic. However, we observed that expression of RB6K is regulated during the cell cycle and peaks during M-phase. The RB6K promoter contains a CDE-CHR element that is typically associated with cell-cycle regulated genes, causing their transcriptional repression during G0/G1 phase. In line with its cell-cycle regulated expression, we found that RB6K localizes to the nucleus in prophase, accumulates throughout the equatorial region of the cell during anaphase and concentrates at the midbodies in telophase. Antibody microinjection indeed showed that RB6K is a motorprotein essential for cytokinesis.

Chapter five describes a search for endothelial genes that are uniquely flow responsive and may thus contribute to the atheroprotective effects of laminar shear stress. Transcriptional profiling of endothelial cells exposed to steady laminar shear stress for 24 hours or unidirectional pulsatile shear stress during seven days was performed. Comparison with profiles derived from endothelial cells treated with various cytokines showed that many shear responsive genes also respond to cytokines, in particular TNF-α. Multiple genes showed a transient response to shear stress, including the junction protein claudin-5. Only a limited number of genes was identified, however, that are unique for prolonged flow exposure, including lung Krüppel-like factor (LKLF, KLF2). Using in situ hybridization it could be confirmed that KLF2 is indeed regulated by flow in vivo. The hypothesis was put forward that KLF2 is at the basis of a physiological healthy, flow-exposed state of the endothelium.

In chapter six, the function of one of the transient shear stress-responsive genes,

claudin-5, is assessed. Claudin-5 is an endothelial-specific member of the claudin family of tight junction proteins and was hypothesized to play a role in endothelial barrier function. As a study of endothelial barrier function requires prolonged, stable expression of ectopic genes, a novel lentiviral system for endothelial transduction was implemented, enabling stable integration of either transgenes or silencers in the endothelial genome. Effects of lentivirus-mediated claudin-5- overexpression and silencing on endothelial barrier function were tested, in presence and absence of inflammatory cells, using tracers of various sizes. In addition, effects were studied at the ultrastructural level using electron microscopy. Claudin-5 overexpression induced formation of networks of TJ strands, but barrier function showed only a modest non-size-selective improvement. The data indicated a limited contribution of claudin-5 to the barrier function of non-BBB endothelium.

Chapter seven elaborates on the observation that claudin-5 is expressed in confluent- but not in sparse cells. This indicated that some proteins involved in the endothelial barrier function are also regulated at the transcriptional level during barrier formation. Genome-wide expression profiling of sparse- versus confluent endothelial cells was performed and one of the most strongly induced genes was found to encode the transcription factor SOX-18. A role for SOX-18 in control of the endothelial barrier was suggested by other groups that reported on association of mutations in the SOX18 gene with vascular anomalies in both mice and humans. We found that overexpression of SOX-18 and a dominant negative mutant thereof, as well as SOX18 silencing, affected claudin-5 expression. Using a newly developed lentiviral promoter-reporter system we could show that SOX-18 enhances transcription from the CLDN5 promoter. Thus we identified the CLDN5 gene as an important SOX-18 target gene. Furthermore, we could show that SOX18 silencing abrogates endothelial barrier function, indicating an important role for SOX18 in endothelial barrier formation.

Chapter eight discusses some of the recurrent themes from the preceding chapters i.e. transcriptional profiling, endothelial transcriptome modulation and its underlying mechanisms, the endothelial barrier and the effects of shear stress. Finally, developments in functional genomics over the past decade and upcoming novel technologies are discussed in relation to the work presented in this thesis.

SAMENVATTING

In hoofdstuk 1 worden endotheelcellen geïntroduceerd als cellen die de binnenwand van bloedvaten bekleden. Op dit grensvlak tussen de bloedstroom en omringende weefsels functioneren endotheelcellen als de belangrijkste regulatoren van vaathomeostase. Hemostase, het bewegen van leukocyten, vaatwandspanning en doorlaatbaarheid van de vaatwand zijn de belangrijkste processen die gecontroleerd worden door het endotheel. Hiertoe nemen endotheelcellen constant hun omgeving waar en reageren dusdanig op biochemische of fysische veranderingen dat het functioneren en de integriteit van de bloedvaten wordt gewaarborgd. Wanneer deze controle tekort schiet ontstaat een onstabiele situatie, dat wil zeggen een verlies van homeostase, waarbij vasculaire ziekten, met als belangrijkste voorbeeld atherosclerose, kunnen ontstaan. De response van endotheelcellen kan bestaan uit zowel lange- als korte- termijn veranderingen in het genexpressie repertoire. Derhalve leidt het bestuderen van veranderingen in endotheliale transcriptieprofielen als gevolg van atherogene of beschermende stimuli èn het bestuderen van individuele genen die deel uitmaken van dergelijke profielen tot inzicht in de moleculaire achtergronden van homeostase en verstoringen daarvan.

Hoofdstuk 2 beschrijft het maken en karakteriseren van een endotheel cellijn, EC-RF24. Het bestuderen van biologische processen in gekweekte cellen houdt in dat een keuze gemaakt moet worden met betrekking tot het te gebruiken celtype. In het algemeen kan gesteld worden dat primaire cellen vaak nog een gedifferentieerd fenotype bezitten maar moeilijk te verkrijgen zijn in grote hoeveelheden en aanzienlijke donor-afhankelijke genetische variatie vertonen. Bovendien is de levensduur van deze cellen beperkt onder kweekcondities, wat het gebruik van primaire cellen voor het introduceren van stabiele genetische veranderingen uitsluit omdat hierbij vaak langdurig geselecteerd moet worden voor resistentie markers. Stabiele cellijnen missen vaak bepaalde differentiatie eigenschappen maar bieden een constante genetische achtergrond en kunnen in grote hoeveelheden gekweekt worden omdat ze in principe onbeperkt kunnen worden geëxpandeerd. Voor sterk gedifferentieerde cellen als endotheelcellen waren weinig of geen betrouwbare cellijnen beschikbaar. Door middel van infectie met een amphotroof, replicatie-deficient retrovirus werden de E6/E7 genen van humaan papillomavirus ingebracht in primaire vasculaire endotheelcellen. De resulterende endotheel cellijn, EC-RF24 werd uitvoerig gekarakteriseerd en bleek alle geteste endotheel-specifieke eigenschappen te hebben behouden.

Hoofdstuk drie beschrijft de identificatie van 106 differentieel tot expressie komende

cytokine-geactiveerde genfragmenten in endotheelcellen. Gedurende vorming van atherosclerotische plaques scheiden geactiveerde monocyten en macrofagen verschillende stoffen uit die ontstekingsreacties opwekken, zogenaamde cytokines, waaronder tumor necrose factor-alfa (TNF-α). Deze stoffen beïnvloeden het functioneren van het bovenliggende endotheel in hoge mate. Om veranderingen in mRNA niveaus in endotheelcellen als gevolg van blootstelling aan monocyt-geconditioneerd medium of TNF-α gedurende 3, 6 en 20 uur te bestuderen, werd gebruik gemaakt van differential display (een techniek waarbij het voorkomen van genfragmenten in geactiveerde cellen vergeleken wordt met het voorkomen van dezelfde fragmenten in niet-geactiveerde cellen). Het complete cDNA werd geïsoleerd van vijf verschillende transcripten die een inductie of repressie vertoonden in de differential display van meer dan 10 keer. Het betrof inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1), rabkinesin-6, stannin, apolipoprotein-L en een onbekend cDNA. Tevens werd de expressie van vier van deze transcripten bestudeerd met in situ hybridisatie op gezond en atherosclerotisch vaatweefsel. IAP-1 en stannin bleken tot expressie te komen in zowel endotheelcellen als in foam cells. Apolipoprotein-L kwam specifiek tot expressie in endotheelcellen in zowel de normale- als atherosclerotische iliaca en aorta. De uitkomsten van deze experimenten laten een brede en complexe verandering zien in het transcriptoom van endotheelcellen die zijn blootgesteld aan ontstekings-mediatoren die geassocieerd zijn met atherosclerose.

In hoofdstuk vier, wordt Rabkinesin 6 (RB6K), een van de cytokine-responsieve genen die gedetecteerd werden in de differential display uit hoofdstuk drie, nader bestudeerd. RB6K is een motoreiwit waarvan bekend is dat het geassocieerd is met GTP-gebonden vormen van Rab6 waardoor vermoed werd dat het een rol zou spelen in directioneel vesiculair transport. We vonden echter dat expressie van RB6K gereguleerd werd gedurende de celcyclus en maximaal was gedurende M-fase. De promoter van RB6K bevat een zogenaamd CDE-CHR element dat typerend is voor celcyclus-gereguleerde genen en dat verantwoordelijk is voor repressie van transcriptie gedurende G0/ G1 fase. Geheel in overeenstemming met deze celcyclus gereguleerde expressie, vonden we dat RB6K voorkomt in de celkern in profase, zich bevindt in het equatoriale vlak van de cel gedurende anafase en zich concentreert op de zogenaamde midbodies gedurende telofase. Micro-injectie van specifieke antistoffen bevestigde dat RB6K een motoreiwit is dat essentieel is voor cytokinese.

Het is bekend dat de mechanische kracht van laminair stromend bloed de vaatwand beschermt tegen het ontstaan van atherosclerose. Hoofdstuk vijf beschrijft een genexpressie studie waarin gezocht werd naar genen waarvan expressie uitsluitend gereguleerd wordt

door laminaire stromingskrachten zodat de moleculaire basis van het beschermende effect van laminaire stroming kan worden begrepen. Genexpressie profielen werden bepaald voor endotheelcellen die 24 uur waren blootgesteld aan niet-pulserende stroming en voor endotheelcellen die waren blootgesteld aan unidirectionele, pulserende stroming gedurende 7 dagen. Vergelijking met genexpresssie profielen van endotheelcellen die waren behandeld met verschillende cytokinen liet zien dat meerdere stromingsgereguleerde genen ook gereguleerd werden door cytokinen, in het bijzonder TNF-α. Meerdere genen, waaronder claudine-5, lieten een regulatie van expressieniveau gedurende een beperkte tijd zien. Er werd slechts een beperkt aantal genen geïdentificeerd dat uniek was voor langdurige flow, waaronder long Krüppel-like factor (KLF2). Met gebruik van in situ hybridisatie kon worden bevestigd dat KLF2 gereguleerd wordt door stroming in vivo. Dit resulteerde in de hypothese dat KLF2 de moleculaire grondslag vormt voor fysiologisch gezond, aan stroming blootgesteld endotheel.

In hoofdstuk zes wordt de functie van een gen, claudine-5, waarvan expressie tijdelijk gemoduleerd werd door laminaire stroming, nader onderzocht. Claudine-5 is een endotheel-specifiek lid van de claudine familie van tight junction eiwitten. De hypothese dat claudine-5 een rol speelt in de endotheliale barrière functie werd getoetst. Omdat functionele studie van de endotheliale barrière een langdurige stabiele expressie van ectopische genen vereist, werd een nieuw lentiviraal systeem geïmplementeerd dat stabiele integratie van transgenen of silencers in het endotheel genoom mogelijk maakt. Met behulp van “tracer” moleculen van verschillende grootte werden effecten gemeten van lentivirale claudine-5- overexpressie en silencing (uitschakelen) op de endotheliale barrièrefunctie, in aan- en afwezigheid van ontstekingscellen. Daarnaast werden effecten bestudeerd met behulp van electronenmicroscopie. Claudine-5 overexpressie leidde tot de vorming van netwerken van zogenaamde tight-junction strengen, en de endotheliale barrièrefunctie liet een kleine verbetering zien, onafhankelijk van de grootte van de tracer moleculen. Deze resultaten duidden op een beperkte bijdrage van claudine-5 aan de endotheliale barrière functie.

Uitgangspunt voor hoofdstuk zeven is de observatie, beschreven in hoofdstuk zes, dat claudine-5 pas tot expressie komt als endotheelcellen onderling contacten hebben gevormd in een gesloten (confluente) cellaag. Dit suggereert dat bepaalde eiwitten die betrokken zijn bij de barrièrefunctie gereguleerd worden op transcriptieniveau gedurende vorming van de barrière. Een genoom-brede genexpressie studie, waarin geïsoleerd liggende (sparse) endotheelcellen werden vergeleken met confluente endotheelcellen, liet zien dat één van de

sterkst geïnduceerde genen codeert voor de transcriptie factor SOX-18. Een rol voor SOX18 in de endotheliale barrière werd gesuggereerd in eerdere publicaties waarin de associatie van mutaties in het SOX18 gen met vasculaire afwijkingen in zowel muis als mens werd beschreven. We vonden dat overexpressie van SOX-18 of een SOX-18 dominant-negatieve mutant, evenals SOX18 silencing effect had op claudine-5 expressie. Gebruik makend van een nieuw-ontwikkeld lentiviraal promoter-reporter systeem konden we aantonen dat SOX-18 de transcriptieactiviteit vanaf de claudine-5 promoter verhoogt. Uit deze observaties werd de conclusie getrokken dat SOX-18 het claudine-5 gen (mede) aanstuurt. Tevens kon worden aangetoond dat het "silencen" (uitschakelen) van SOX18 een negatief effect heeft op de endotheliale barrière functie. Dit resulteerde in de hypothese dat SOX18 een belangrijke rol speelt in de vorming van de endotheliale barrière.

In hoofdstuk acht wordt ingegaan op een aantal thema's uit de voorgaande hoofdstukken, te weten genexpressie studies, modulatie van genexpressie in endotheelcellen door transcriptiefactoren, de endotheliale barrière en de effecten van shear stress. Tot slot worden de ontwikkelingen in genomics en gerelateerde, nieuwe technieken bediscussieerd in relatie tot het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd.