

Mechanosensing in vasculaire endotheel cellen

Berg F.J. , Harmsen M.C.

Stem Cell and Tissue Engineering Research Group, Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Hanzeplein 1 9713GZ, Groningen, The Netherlands

Abstract

Endotheelcellen kunnen reageren op vele biochemische mediators zoals hormonen, cytokines en neurotransmitters. Daarnaast kunnen endotheelcellen reageren op mechanische belasting die door de bloeddruk en persfusiesnelheid in bloedvaten ontstaan. Er zijn vele mogelijke eiwitten gevonden die in staat zijn om mechanische belasting om te zetten in biochemische signalen zoals ion-kanalen, G-proteïne gekoppelde receptoren, integrines, adhesie moleculen, glycocalyx en eiwitten in caveola. De reacties op deze mechanische belasting zijn erop gericht om de endotheelcel zoveel mogelijk te beschermen en om de integriteit van de eencellige endotheelcel laag te kunnen waarborgen. De meest opvallende morfologische veranderingen die waar te nemen is de complete reorganisatie van het cytoskelet in endotheelcellen. De cel gaat hierdoor zich oriënteren in de richting van de stroming en het aantal stress fibers (SF's) en dikte van deze SF nemen toe. Ook nemen de grote van de ankerpunten van de cel linear toe met de mate van FSS. Deze reorganisatie is het gevolg van small GTP'ases zoals Rac-1 en RhoA en cdc42. Deze worden weer geactiveerd door integrines na binding aan componenten van de extracellulaire matrix. Integrines kunnen alleen geactiveerd raken door fosforilisatie van PECAM-1. Ook wordt door de mechanische belasting op endotheelcellen en de frictionele kracht die hierbij optreedt ook wel fluid shear stress genoemd de celcyclus en apoptose geremd. En leiden verstoringen in de mate van FSS op de endotheelcel tot ernstige ziektebeelden zoals atherosclerose. Een verstoorde stroming leidt tot een opregulatie van inflammatoire mediators die het gevolg zijn van verhoogde activiteit van nuclear factor κB (NF- κB). Deze toename van activiteit gaat gepaard met een verhoging in expressie van inflammatoire mediators zoals ICAM-1 en VCAM-1

1. Introductie

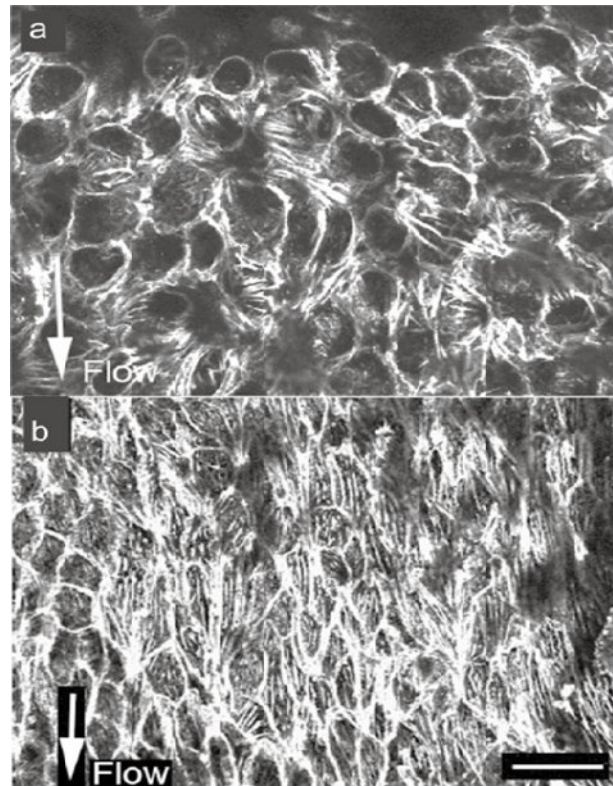
Lang werd aangenomen dat bloedvaten niet veel meer waren als statische buizen in het lichaam. Maar in de laatste 30 jaar is vastgesteld dat bloedvaten in werkelijkheid veel dynamischer zijn dan werd aangenomen. Tegenwoordig worden bloedvaten als actieve organen beschouwd met vele uiteenlopende functies met als gemeenschappelijk doel het waarborgen van de homeostase van het circulatoir systeem. Het actieve karakter van bloedvaten blijkt alleen al uit het reactievermogen op een tal van biochemische mediators zoals hormonen, cytokines en neurotransmitters. De reacties op deze stoffen kunnen uiteenlopend zijn van vasodilatatie tot permeabiliteitsveranderingen van de endotheelcellen zodat immuuncellen de vaatwand kunnen passeren. De eencellige laag van endotheelcellen die de binnenkant van bloedvaten bedekken zijn van instrumenteel belang om deze processen te reguleren en te controleren. Klassiek onderzoek naar het circulatoir systeem is voornamelijk gericht hoe biochemische mediators zoals cytokines, hormonen en

neurotransmitters het circulatoir systeem beïnvloeden. Recentelijk wordt echter veel onderzoek gedaan naar de invloed van mechanische krachten die door bloeddruk en persfusiesnelheid worden gegenereerd. De frictionele kracht die hierbij optreedt op de vasculaire endotheel cellen wordt fluid shear stress (FSS) genoemd. Observaties dat fluctuaties in stromingspatroon een direct effect hadden op de morfologie van EC [1], de mate van angiogenese[2], vasculair remodeling[3] en de formatie van atherosclerose[4] bewezen het belang van mechanische krachten op bloedvat respons. Cellen zijn in staat om fluctuaties in hun naburige omgeving waar te nemen met behulp van receptoren die na binding met hun desbetreffende ligand in staat zijn om een signaal cascade te veroorzaken en zo allerlei cellulaire processen te activeren. Het probleem in onderzoek naar mechanotransductie is dat cellen in staat moeten zijn om te reageren op deze mechanische lading zonder traditionele ligand-receptor activatie. Toch activeert fluid shear stress een groot aantal van

receptoren die normaal door hun desbetreffende ligand worden geactiveerd zoals G-protein coupled receptor (GPCR's), receptor tyrosine kinases (RTK's), ion kanalen, glycolyx, adhesie receptoren (PECAM-1, VE-Cadherine), integrines, primaire cilia en moleculen in caveolae. Nog veel is onbekend over de precieze manier hoe deze mechanische krachten vertaald worden naar biochemische signalen. Wel is bekend dat FSS veel bekende signaalroutes kunnen activeren zoals de Ras-mitogen activated protein kinases (Ras-MAPK) signaalroute die voornamelijk betrokken is bij celgroei, proliferatie, differentiatie, en cel survival. Een tweede belangrijke signaalroute waarvan bekend is dat deze geactiveerd raakt door FSS is de phosphoinositide 3-kinase – Akt (PI(3)K-AKT) signaal route welke voornamelijk cel dood en cell survival reguleert. Ook wordt de Rho signalering sterk gereguleerd door FSS en deze is betrokken bij de organisatie en reorganisatie van het cytoskelet met nadruk op actine. In dit artikel zal met behulp van recente literatuur worden besproken op welke manier cellen in staat zijn om op mechanische lading te reageren. Welke receptoren of complexen dit signaal propageren en hoe de bovengenoemde signaalroutes gebruikt worden om te reageren op FSS. Ook zal de aard van deze reacties worden besproken zoals morfologische en veranderingen in genexpressie en hoe onderzoek in dit veld kan bijdragen aan een beter besef van vasculaire aandoeningen.

2. Endotheel cellen in reactie op fluid shear stress

Hoe reageren cellen op FSS en welke mogelijke adaptieve voordelen brengen deze reacties voor de endotheelcel en het bloedvat? Leiden verstoringen in de stroming tot een positieve of negatieve verandering in de endotheelcel? Zijn er bepaalde FSS genen die geactiveerd raken of verandert de expressie van bepaalde genen door FSS? Deze vragen zijn vrij eenvoudig te beantwoorden doordat ze de directe output zijn van de gevolgen van FSS op de endotheelcellen. Hoewel de achterliggende mechanismen en signalering die ten grondslag liggen van deze reacties van de EC over het algemeen complex is zijn de directe gevolgen van FSS op de endotheelcel vrij overzichtelijk en eenvoudig te meten. Zo is bekend dat er reorganisatie van het cytoskelet plaatsvindt van EC in respons op FSS. Ook verandert

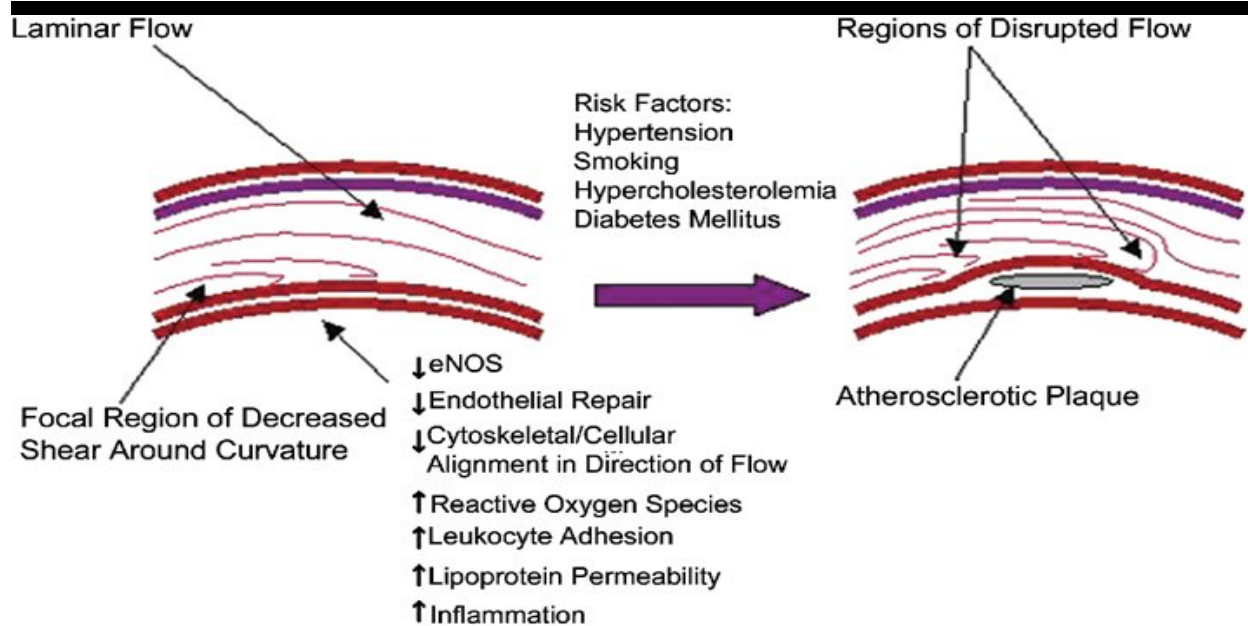


Figuur 1. Stress fiber (SF) en endotheel cel morphology in gebieden onderhevig aan een sterke FSS (fig 1B) en gebied onderhevig aan lage FSS (fig 1A). Fig. 1A SF zijn sterk gelocaliseerd in cel grensen en cel orientatie is onregelmatig. Fig 1B SF ontstaan in midden van cel orientatie van cellen is met de stroming mee en groter aantal cellen. Cellen aangekleurd met rhodamine gelabeld phalloidine voor F-actine (onderdeel SF) vergroting onbekend. (bron: {{6. Katoh, K. 2007}})

gen expressie en blijkt dat een laminaire stroming gezond kan zijn voor de EC.

2.1 Morfologische veranderingen als gevolg van FSS

Men ondervond dat cellen onderhevig aan een laminaire stroming van bloed of een vloeistof zich met de stroming mee gaan oriënteren en een lange uitgerekte morfologie hebben. Voornamelijk de stress fibers (SF's) bestaande uit onder andere filamenteus actine (f-actine) oriënteren zich met de stroming mee (Fig 1B). Echter zijn cellen die een turbulente stroming ervaren meer rond en is hun orientatie onregelmatig (Fig 1A). Deze bevindingen doen vermoeden dat FSS zowel de orientatie als de vorm van cellen bepaald met als mogelijke adaptieve functie om de mechanische belasting te doen verminderen [5]. En zo mogelijke



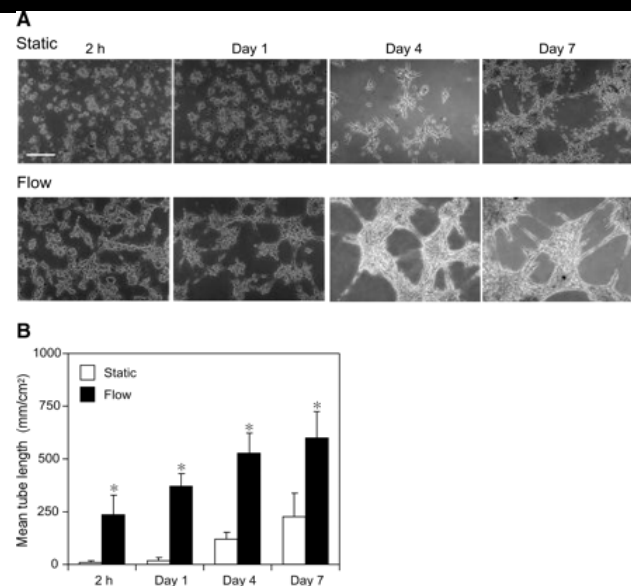
Figuur 2. Schematisch voorstelling van regioselectiviteit van artrosclerosis. Afname van FSS zorgt voor een verlaging van eNOS en vermindering in het vermogen van de endotheelcellen om zich met de stroming mee te oriënteren. Hierdoor is de permeabiliteit van de EC hoger en kunnen lipoproteïnen binnen dringen. Verder worden adhesieve moleculen zoals ICAM-1, VCAM-1 opgeregeleerd bij verminderende FSS. Wat leidt tot bevordering in leukocyte adhesie. Bron {{ [2].Cunningham,K.S. 2005}}

schade aan het bloedvatweefsel te doen voorkomen. Ook zijn de hoeveelheid SF's en dikte van SF's en de grootte van focal adhesions hoger in gebieden waar FSS betrekkelijk hoog zijn zoals rond aorta[6]. Ook zijn endotheelcellen onderhevig aan FSS betrekkelijk plat. Zodra een cel uitgeplat wordt op een matrix van extracellulaire matrix componenten zoals fibronectine, laminine en vitronectine wordt de cel langer en platter. Dit is een direct gevolg van neoformatie van focal adhesie complexen en contractie van de SF's. SF's kunnen samentrekken en dit zorgt voor het platte karakter van endotheelcellen als respons op FSS. Deze contractie van SF's wordt veroorzaakt door fosforilisatie van de myosine light chain (MLC). Deze MLC kan op twee manieren gefosforyleerd raken namelijk door de Ca^{+} afhankelijke route gemedieerd door Ca^{+} /calmoduline en de Ca^{+} onafhankelijke route via Rho kinase. Deze twee routes blijken gescheiden systemen van elkaar te zijn en de fosforilisatie van MLC blijkt instrumenteel te zijn voor de reorganisatie van het cytoskelet als gevolg van FSS[7]. Verder is de mate van orientatie en hoeveelheid van de SF's niet direct evenredig aan de mate van FSS. Zo is bij veneuze endotheelcellen die onderhevig zijn aan een laminaire stroming de SF's van de cellen met de stroming mee georiënteerd maar is de hoeveelheid SF's veel lager dan bij endotheelcellen van arteries onder dezelfde omstandigheden[8].

2.2 Laminaire stroming houdt bloedvaten gezond

Verder vond men dat een laminaire onverstoorde stroming een arteriosclerose kan voorkomen. Al lang was bekend dat arteriosclerose zich niet op willekeurige punten ontwikkelt maar meer rond vertakkingen, splitsingen en de binnenste krommingen van bloedvat bogen ontwikkelt[9]. Op al deze plekken is de stroming meer turbulente en hierdoor is dus de gemiddelde FSS laag en vond men met grote regelmaat plekken met arteriosclerose. In figuur 2 is schematisch weergegeven welke processen veranderen tijdens verstoorde FSS en kunnen leiden tot arteriosclerose. Waar de stroming laminair was en gemiddelde FSS dus hoog ontstond geen arteriosclerose en dit werd verder bevestigd door gebruik te maken van in vitro modellen [10]. Hier vond men onder andere dat in EC onderhevig aan FSS de expressie van de anti-thrombotische membraan gebonden glycoproteïne thrombomoduline werd opgeregeleerd[11]. Thrombomoduline inactieveert de procoagulante factor thrombine en activeert anticoagulante proteïne C. Ook wordt het door FSS anti-thrombotische karakter van EC verhoogd door de afname in productie van heparan sulfaat proteoglycans en weefsel afhankelijke plasminogene activators [12,13]. Recentere microarray experimenten hebben

aangetoond dat FSS vooral genen moduleert met betrekking tot de celcyclus en apoptose. Zo wordt bijvoorbeeld door FSS de transitie van EC van G1 tot S fase [14,15] onderdrukt door een verhoging in de expressie van p21 en een afname in fosforilisering van retinoblastome eiwit (Rb) en activiteit van cycline-dependente kinases (cdk's), cdk2 en cdk4 [14,15]. En wordt door FSS de celdeling naar beneden gereguleerd. Ook vermindert FSS de gevoeligheid voor apoptose door stimuli zoals tumor necrosis factor α (TNF α). TNF α mede reguleert inflammatoire genen zoals intra-celulair adhesie molecule-1 (ICAM-1) en vasculair cell adhesie molecule-1 (VCAM-1) beide sterk betrokken bij recutering van immuuncellen. Aangevoerd is dat TNF α activiteit gereguleerd wordt door inhibitie van c-Jun N-terminal kinase (Jnk's) door middel van stimulatie van extracelulair gereguleerde MAPK's zoals Erk 1/2 en Erk 5 en inhibitie van apoptose bevorderende kinases [16]. De belangrijkste manier waarop FSS vaatschade voorkomt is door regulatie van ontstekingsfactoren. Chronische inflammatie ligt ten grondslag van een tal van ziektebeelden zoals diabetes, metabool syndroom en arteriosclerose. In gebieden met verstoorde stroming wordt het proinflammatoire nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) transcriptiefactor opgeregeerd. Transcriptie doormiddel van NF- κ B reguleert expressie van ICAM-1, VCAM-1 monocyte chemoattractant protein 1 en platelet derived growth factor (PDGF) allemaal inflammatoire mediators. In een gezonde cel wordt de inactieve NF- κ B gehouden door I κ B. Dit enzym maskeert nucleaire localisation signals (NLS) van NF- κ B en houdt zo deze transcriptiefactor inactief in het cytoplasma. I κ B complex (IKK) kan vervolgens I κ B fosforileren wat weer leidt tot disassociatie van I κ B met NF- κ B waardoor NF- κ B geactiveerd wordt. [17]. IKK wordt mogelijk geactiveerd door integrines activatie en daaropvolgend focal adhesie kinase fosforilisering (FAK) hoewel de precieze aard van deze route onbekend blijft [18]. Verder wordt een anti-inflammatoir en anti-oxidatieve expressie profiel vooral gereguleerd door shear stress response elements (SSRE's) [19], antioxidant response element (ARE) [20], Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR γ) elementen [21]. Ook leidt FSS tot fosforilisatie van Ser-727 van de transcriptiefactor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) door de ERK 1/2 signaalroute. STAT3 wordt normaal geactiveerd door cytokines en groeifactoren door fosforilisatie van Tyr-705 en reguleert vele apoptose en inflammatoire

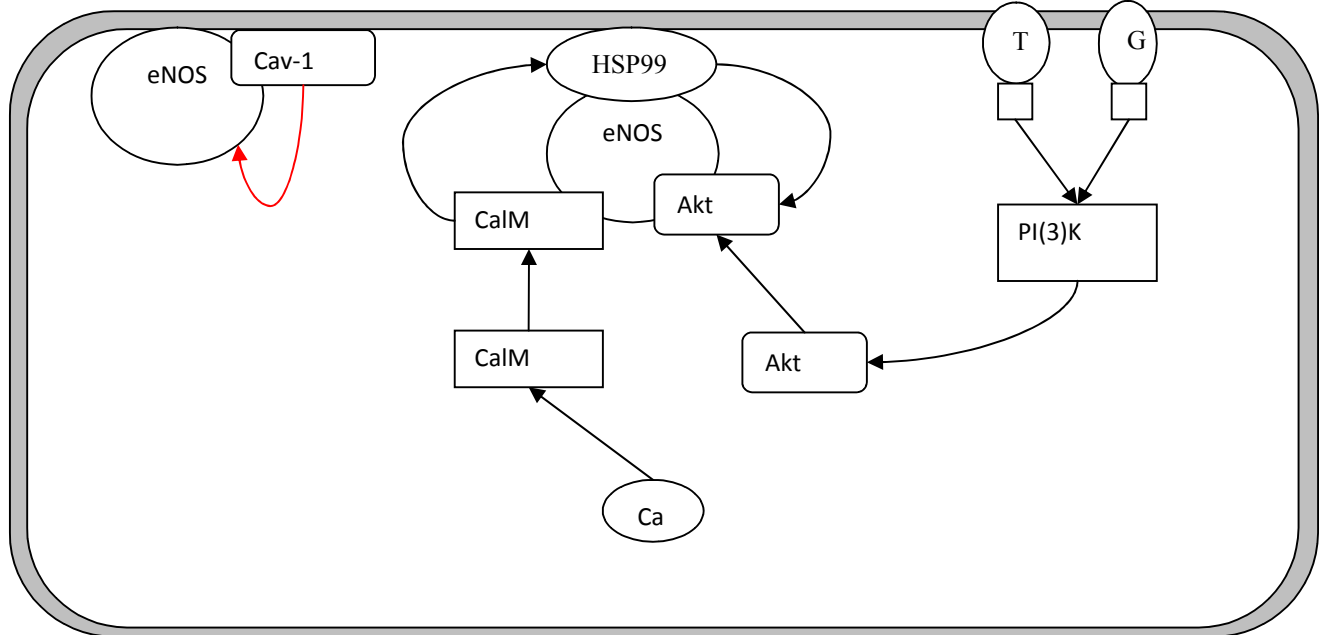


Figuur 3. Fluid shear stress bevordert de neovascularisatie door EPC's. Figuur 3A laat duidelijk zien dat onder FSS geconditioneerde EPC's een grotere mate van neovascularisatie plaatsvindt dan bij de controle. Figuur 3B is de mate gequantificeerd en laat significant verschil tussen FSS conditie en controle zien. Bron ([23] Yamamoto, K. 2003;)

processen. Doordat Ser-727 gefosforiseerd raakt wordt vermindering van gevoeligheid voor cytokines en groeifactoren waardoor inflammatoire en proliferatie wordt gehinhibeerd. [22].

2.3 Fluid shear stress reguleert differentiatie van endotheel voorloper cellen

Ook zijn door middel van experimenten met FSS met behulp van endotheel voorloper cellen (EPC) duidelijk gemaakt dat FSS een direct effect kan hebben op differentiatie. Zo versnelt FSS het proces van neovascularisatie aanzienlijk [23] en wordt door FSS ephrinB2 opgeregeerd (Fig 3). Deze is sterk betrokken is bij de differentiatie van bloedvaten van arterie of ader [24]. Verder wanneer blootgesteld aan een cyclische belasting bijvoorbeeld wat ervaren wordt door het kloppende hart tijdens embryonale ontwikkeling vindt men een hogere differentiatie van vasculaire endotheel growth factor receptor 2 (VEGFR-2) positieve cellen naar smooth muscle cellen (SMC). Wanneer men echter een gelijkmatige belasting toepast vindt men meer differentiatie van VEGFR2 positieve EC [25].



Figuur 4. Productie van eNOS in endotheelcellen. eNOS sterk gelokaliseerd in caveolea. Caveoline-1 inhibeert eNOS in rust(rode pijl) . Deze inhibitie wordt tegengegaan door overmaat calmoduline en AKT. Calmoduline bindt eNOS en recruteert Hsp99. Hsp99 fosfoliseert ser1177 en creert hierdoor een bindingsplaats voor Akt. Die eNOS verder activeert. Afkortingen: Akt protein kinase B, Ca= calcium ion, CalM=calmoduline,Cav-1=Caveoline-1, eNOS= endothelial nitric oxide synthase, G = G-protein coupled receptor, HSP99=heatshock protein 99,PI(3)K= phosphonositide 3-kinase , T= receptor tryrosine kinase

2.4 Vasodialatie, de eNOS repons

Een van de belangrijkste reacties die bloedvaten hebben om de mechanische lading per oppervlakte eenheid te verkleinen is het verwijden van bloedvaten. Deze respons wordt voornamelijk door de vasodialator nitriet oxide (NO) gemedieerd. NO wordt in endotheelcellen geproduceerd door activatie van endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Talloze experimenten hebben aangetoond dat in endotheelcellen de productie van NO door eNOS en de expressie van eNOS sterk toeneemt[15]. En dat de mate van deze toename direct gecorreleerd is aan de hoeveelheid van FSS. eNos expressie wordt gereguleerd door een toename en translocatie van NF-κB en een gevonden SSRE (GAGACC) in de eNOS promoter die het eNOS mRNA stabiliseert door een verhoging in 3'-polyadenylatie[26]. Hoewel NF-κB eNOS stimuleert leidt een verhoging in NO spiegels tot een inhibitie van NF-κB. Het wordt dan ook gepostuleerd dat er een negatieve feedbackloop bestaat waarbij een toename in FSS leidt tot een verhoging van eNOS activiteit door NF-κB wat weer leidt tot een verhoging van NO spiegels die er

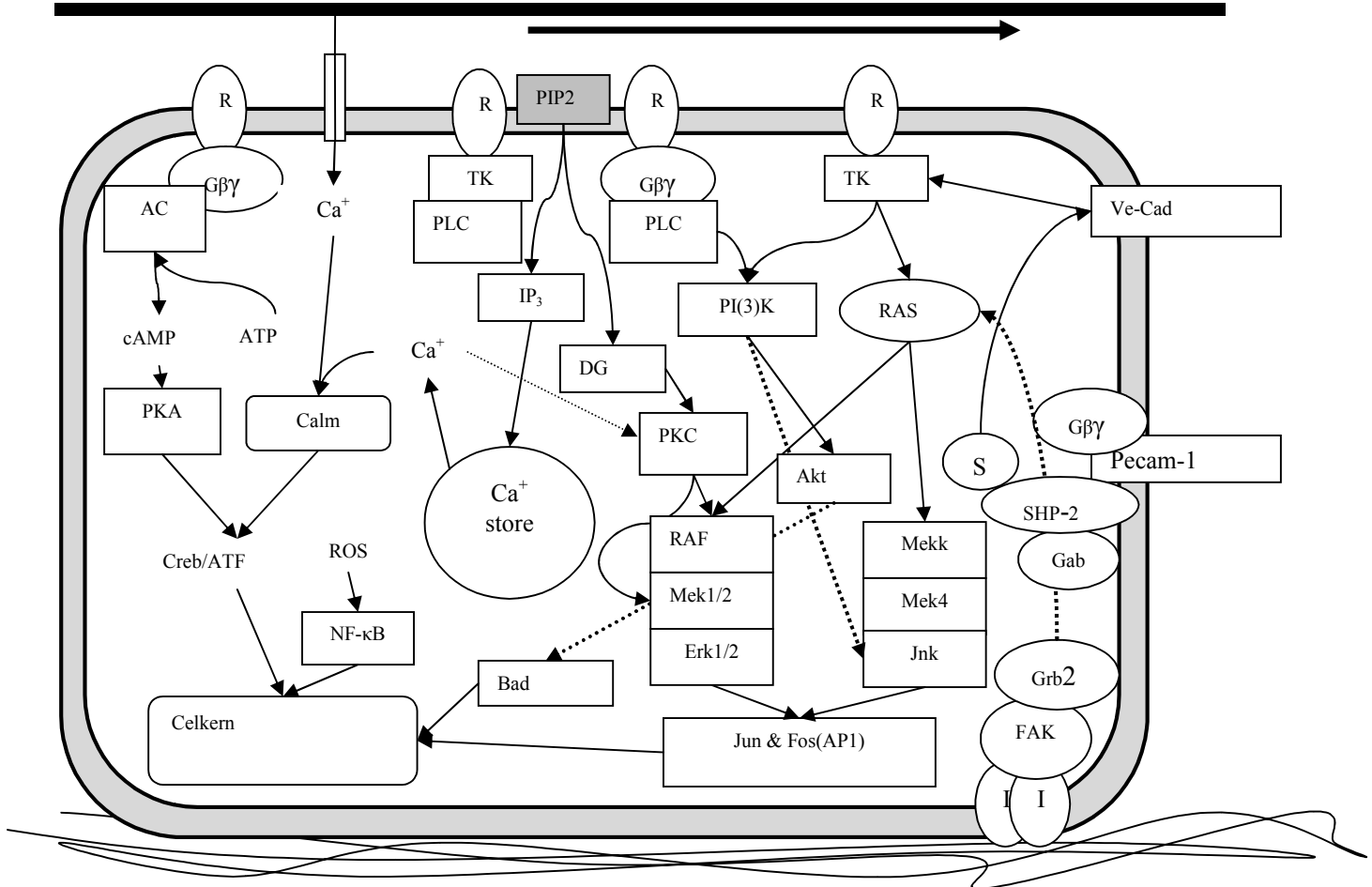
vervolgens weer toe leiden dat NF-κB activatie wordt geïnhibeerd door stabilisatie van IκB[27]. Er bestaan twee fasen met betrekking tot eNOS activatie. De Ca⁺ afhankelijke fase en een Ca⁺ onafhankelijke fase waarbij succesvolle recrutering van heatschock protein 99 (HSP99) leidt recrutering van Akt. Wat ertoe leidt dat eNOS gefosforileerd raakt op Ser1177 wat leidt tot eNOS activatie(Fig4). Hierdoor zijn endotheelcellen in staat om hun NO productie hoog te houden zonder Ca⁺ voorraden uitteputten. Verder is eNOS sterk gelokaliseerd in diverse cellulaire structuren maar nergens is eNOS zo sterk gelokaliseerd als in caveolea. Caveoline-1 is een scaffold protein dat in hoge mate voorkomt in caveolea. Dit eiwit heeft een inhiberende werking op eNOS die tegen wordt gegaan door een overmaat van Ca⁺/calmoduline en door overmaat in Akt activatie[28]. Waterstofperoxide H₂O₂ is een belangrijke indicator van oxidatieve stress. H₂O₂ is in staat om eNOS te activeren door fosforlisatie van ser-1779 onder invloed van FSS maar deze fosforlisatie is afhankelijk van PI(3)K-Akt activatie en MEP-ERK 1/2 activatie[29]. Recentelijk is echter gevonden dat H₂O₂ de cel voorbereid om NO te produceren. Men vond dat

H₂O₂ toevoeging onder invloed van FSS zorgde voor een sterke localisatie van eNOS naar de celmembraan zonder dat totale eNOS productie toenam en verhoging in caveoline-1. Oftewel H₂O₂ was in staat om de hoeveelheid eNOS te redistribueren naar de celmembraan onder invloed van caveoline-1. Caveoline-1 speelt hier een grote rol bij omdat overexpressie leidde tot verhoging van NO productie maar alleen onder invloed van H₂O₂. Terwijl depletie van caveoline-1 zorgde dat localisatie van eNOS werd tegengegaan en NO productie aanzienlijk lager lag. Oftewel caveoline-1 zorgt voor de localisatie van eNOS maar alleen onder invloed van H₂O₂[30]. Naast dat NF- κ B in staat is om eNOS tot expressie is een ander belangrijke regulator voor eNOS de transcriptiefactor kruppel-like factor 2 (KLF2). Recentelijk is de manier waarop KLF2 door FSS wordt geactiveerd ontdekt. KLF2 expressie wordt gereguleerd door myocyte enhancer factor-2 (MEF-2). Histone deacetylase-5 (HDAC5) bindt aan MEF-2 en voorkomt zo transcriptie van MEF-2. Onder invloed van FSS raakt HDAC5 gefosfoliseerd op een Ca⁺/calmoduline afhankelijke manier en wordt geëxporteerd uit de celkern. Hierdoor verliest MEF-2 zijn inhibitie en kan KLF-2 tot expressie komen. Vervolgens leidt verhoging in deze KLF-2 spiegels weer tot een verhoging in eNOS.[31] Over de verdere rol van caveola zal later worden verdergegaan. Aan de andere kant van het spectrum zorgt FSS voor een downregulatie van angiotensine-converting enzym welke de vasoconstrictor angiotensine II[32] produceert en ook wordt de productie van de vasoconstrictor endothelin gehinhibeerd[33].

2.5 De Ca⁺ influx

Een van de eerste reponsen die direct meetbaar zijn in endotheelcellen is de influx van Ca⁺. Dit ion is in de meeste ondergenoemde pathways betrokken en is misschien wel een van de belangrijkste mediator voor alle reponsen. Toch is nog veel onbekend over hoe deze influx tot stand wordt gebracht en hoe deze wordt gereguleerd. Wel is bekend dat de influx van Ca⁺ direct gecorreleerd aan de mate van FSS dat over de endotheelcel wordt aangebracht. Ook is deze influx afhankelijk van de energiedrager ATP. Tot dusver zijn de belangrijkste ontdekte cation kanalen de P2X purinoreceptors en de transient receptor potential (trp) kanalen de beste kandidaten voor de gemeten Ca⁺ influx. P2X purinoreceptors zijn ATP gedreven cation kanalen waarvan bekend is dat ze zijn te vinden zijn op

human umbilical vasculair endothelial cells (HUVEC's), en EC van longslagader en aorta[34]. In een studie van Yamamoto K. [35] werd aangetoond dat P2X4 (een subtype van P2X purinoreceptors) een belangrijke rol speelt bij Ca⁺ afgifte op respons op FSS. Het belang van de P2X4 receptor wordt aangetoond door de cellen te behandelen met antisense oligonucleotides tegen P2X4 mRNA. Deze cellen vertoonden geen influx van Ca⁺ meer op FSS. Dit subtype wordt aangedreven door endogeen ATP en behandeling met angiotatine een inhibitor voor ATP syntase de Ca⁺ influx in respons op FSS bijna perfect blokkeerde. Hoe ATP wordt genereert in respons op FSS is tot op heden onbekend. Ook zouden trp's kunnen bijdragen aan de Ca⁺ influx. Trp's bestaan uit 6 membraangebonden helices met intracellulaire N- en C-termini.. Een voorbeeld van Trp's is de TRP V4 cation kanaal deze raakt geactiveerd door epoxyeicosatrienoic acids EET's. EET's zijn weer een product van cytochroom P450 (Cyp450). Verder dragen EET's ook bij aan de translocatie van TRP V4 naar het celmembraan dit effect is namelijk tegengegaan na inhibitie van EET's. Belangrijk is wel te melden dat verschillende Trp's slechts gevoelig zijn voor enkele EET's en niet alle Trp's gevoelig blijken te zijn voor FSS. Zo is TRP V4 gevoelig voor 5,6-EET en 8,9-EET maar ongevoelig voor 11,12-EET's. Terwijl TRP V6 ongevoelig is voor FSS maar wel geactiveerd raakt door 11,12-EET's [36]. Verder zouden ook stretch activated cation channels (SAC's) een rol spelen bij de influx van Ca⁺. Onder invloeden van laminaire stroming vindt men een opregulatie van deze SAC's. Blijkbaar speelt het cytoskelet een grote rol bij activatie van deze kanalen omdat disruptie van het cytoskelet leidt tot een volledige inhibitie van Ca⁺ influx door SAC.[37] Hoewel de bovengenoemde receptoren verklaren hoe de Ca⁺ influx tot stand wordt gebracht. Verklaren ze niet het tijdelijke karakter van Ca⁺, hiermee wordt bedoeld dat de op aanbrengen van FSS een sterke piek is maar naarmate de tijd vordert neemt de influx af. Dit wijst erop dat er een mogelijk negatieve feedback loop bestaat die de Ca⁺ influx remt naarmate de tijd vordert. Deze feedback loop werd inderdaad gevonden in 2002. Men vindt dat behandeling met protein kinase G een inhiberend effect had op de Ca⁺ influx. Zoals hier boven beschreven leidt een verhoogde influx van Ca⁺ tot een verhoogde NO productie. NO productie leidt weer tot een verhoging in het cGMP producerend enzym guanylate cyclase. Welke vervolgens PKG kan activeren en PKG kan het cation kanaal fosfoliseren om zo de influx van Ca⁺ te inhiberen[38].

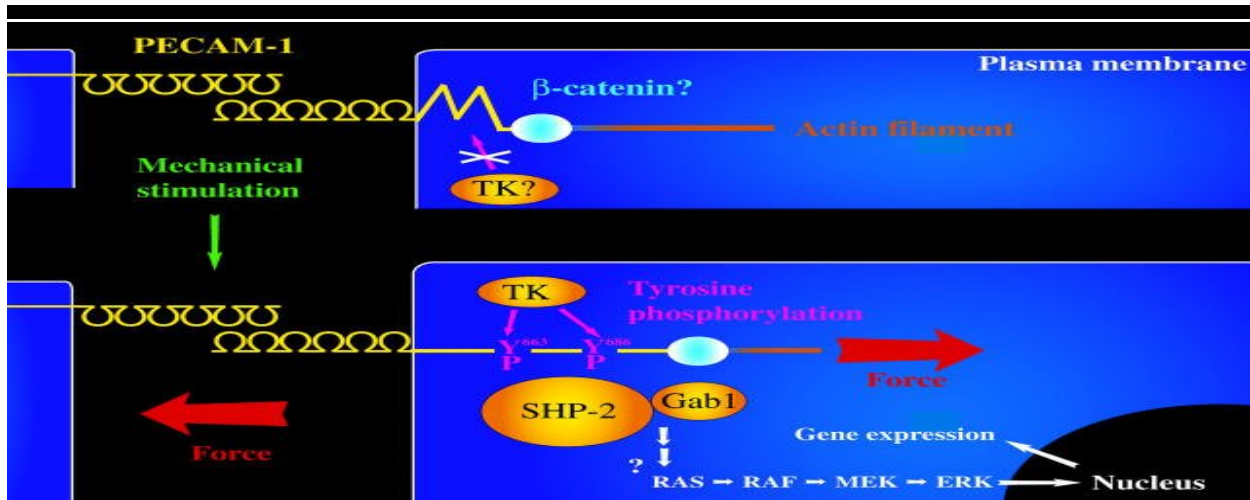


Figuur 5. Signaaltransductie routes die kunnen worden geactiveerd door FSS. Meerdere signal routes zijn betrokken en leiden tot activatie van transcriptie facoren zoals Jun en Fos familie transcriptiefactoren AP-1, BAD en NF-κB. Die leiden tot veranderingen in morphology en inhibitie van celdood en proliferatie, eNOS expressie, downregulatie van inflammatoire factoren zoals iCAM-1, VCAM-1. Afkortingen in alfabetische volgorde: AC, adenylaate cyclase; Akt, proteïne kinase B; cAMP, cyclic adenosine mono phosphate; Calm, Calmoduline; Creb/ATF, cAMP response element binding /activating transcription factor; DG, 1,2-diacylglycerol; ERK, extracellulair signal-regulated kinases; FAK, focal adhesion kinase; GAB, GRB2 associated binding proteïne 2; Grb2, Growth factor receptor bound proteïne 2; Gβγ, G-proteïne subeenheid βγ; I, integrines; IP₃, inositol; Jnk, c-jun N-terminal kinase; Mekk, MAP kinase –ERK kinase kinase; MEK, Map kinase-Erk kinase; NF-κB, nuclear factor κB; PECAM-1, platelet derived endothelial cell adhesion molecule-1; PIP₂, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI(3)K, phosphatidylinositol 3-phosphate; PKA, proteïne kinase A; PKC, proteïne kinase C; PLC, phospholipase C; RAS, RAF small GTPase's; R, receptoet; ROS, reactive oxygen species; TK, tyrosine kinase

3. Mechanotransductie

Zowel vasodilatatie van het endotheel als de morfologische veranderingen die cellen ondergaan zijn gevolgen van activatie van diverse signaalroutes. Toch moeten deze routes kunnen worden geactiveerd door FSS. Dit betekent dat er een of meerdere structuren moeten zijn die deze FSS als mechanische kracht vertalen naar een biochemisch signaal. Er zijn meerdere structuren bekend die een rol spelen bij deze mechanotransductie. Maar nog veel is onbekend hoe deze structuren met elkaar samenwerken. Recentelijk is bekend geworden dat er inderdaad complexen van

structuren bestaan die met elkaar samenwerken om de bovengenoemde reacties te kunnen waarborgen. Voornamelijk adhesie moleculen en receptortyrosine kinases en het cytoskelet werken nauw met elkaar samen. Andere voorbeelden van structuren die in staat zijn tot mechanotransductie zijn; ionkanalen, G-proteïne coupled receptors (GPCR's), glycocalyx, caveolea en ook primaire cilien (Figuur 5.). De activatie van de receptoren leidt tot een cascade waarbij expressie van eNOS en onderdelen van cytoskelet en FAK worden opgeregeerd. Ook wordt superoxide dismutase opgeregeerd. Ook wordt apoptose en celdeling geremd door de Akt pathway. Ook worden



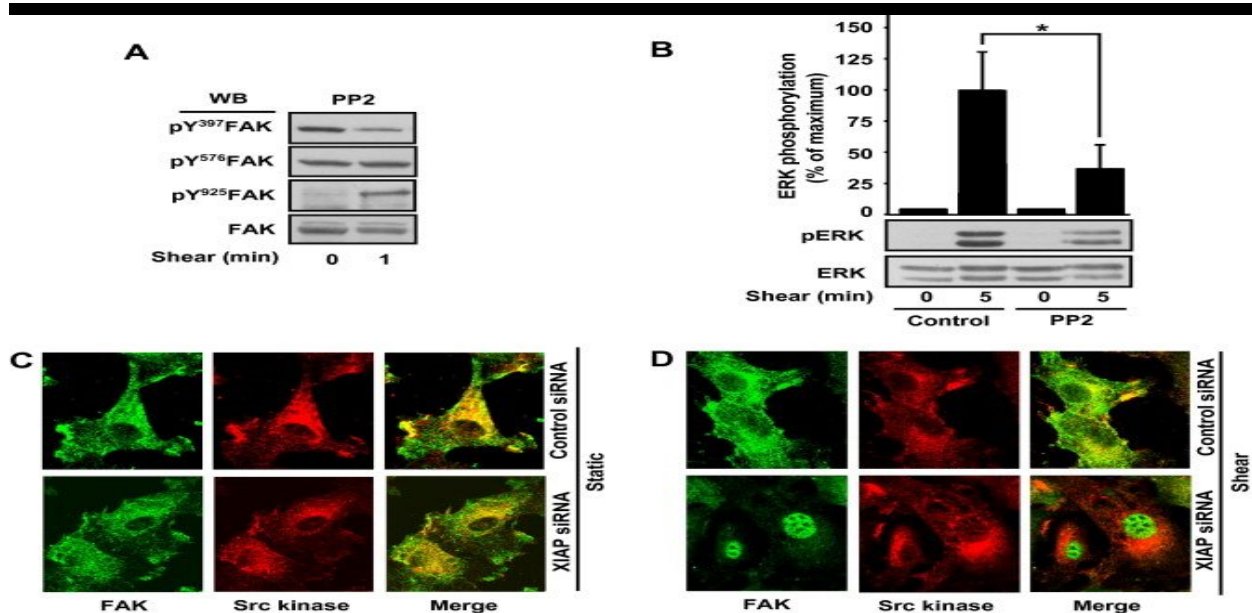
Figuur 6. Hypothetisch model over de manier waarop PECAM-1 zou kunnen worden geactiveerd. Pecam-1 is verbonden enerzijds aan een PECAM-1 molecule van een naburige cel en anderzijds verbonden met behulp van catenines aan het cytoskelt. Door de kracht van een laminaire stroming komen de FA en cel-contacts onder druk te staan. Deze kracht zou de tyrosine residuen van PECAM-1 bloot kunnen leggen waarna SHP-2 via zijn SH2 domein bindt aan de gefosforyleerde tyrosine kinase. Een ander model gaat uit van een ontbrekende kinase. Bron :{{101 Osawa,M. 2002;}}

Inflammatoire mediators zoals ICAM-1 en VCAM-1 naar beneden gereguleerd. In dit hoofdstuk zal wat dieper op de structuren en routes worden ingegaan.(Fig5). Ook worden de achterliggende mechanismen van de morfologische veranderingen(Fig 1) behandeld.

3.1 Cel-cel adhesie sites (PECAM-1,VE-cadherine)

Misschien een van de belangrijkste groep van mechanosensitieve moleculen zijn te vinden aan de laterale grenzen van de cel. Hier zijn moleculen te vinden zoals platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1), cadherines zoals vascular endothelial cadherine (VE-cadherin) maar ook gap- en tight junctions te vinden. Van vooral PECAM-1 en VE-cadherin is veel bekend over hun rol in mechanotransductie. Doordat deze de sterkte van cel-cel interacties de permeabiliteit van de monolayer van endotheel bepalen leiden verstoringen in deze interacties tot ontsteking en uiteindelijk tot ziektebeelden zoals atherosclerose en zijn daardoor veel onderzocht. PECAM-1 ook CD31 en endoCAM genoemd komt voornamelijk op endotheelcellen tot expressie wordt gebracht maar ook andere celtypen zoals bloedplaatjes, monocytten, neutrofielen, en sommige T-lymfocyten brengen PECAM-1 tot expressie.[39]. PECAM-1's ligand is een ander PECAM-1 eiwit van een naburige cel en gaat zo een homofiele interactie aan. Verder bestaat PECAM-1 uit een betrekkelijk groot extracellulair domein die bestaat uit

zes immunoglobuline lussen waarvan de eerste 2 binding aangaan met naburige PECAM-1 moleculen. Verder bestaat PECAM uit een transmembraam overbruggings eenheid om het eiwit te ankeren in de celmembraan en een kleine cytoplasmatische staart. Deze cytoplasmatische staart bevat twee tyrosine structuren (Tyr663 en Tyr686) waar na fosforilisatie signaalmoleculen aan kunnen binden. Ook bindt PECAM-1 aan β - en γ catenins en zijn zo geankerd aan het SF's[40]. PECAM-1 vormt een band rondom de cel dit in tegenstelling van VE-cadherin welke diffuus is verspreid over de laterale grenzen van de endotheelcel. Wanneer men op PECAM-1 een directe kracht door magnetische kralen te coaten met antilichamen specifiek voor het extracellulaire bindingsdomein van PECAM-1 en een magnetisch veld over de cel aan te brengen uitvoerende was een verhoging van specifieke PECAM-1 tyrosine fosforilisatie meetbaar en was ERK activiteit verhoogd. Hoe PECAM-1's tyrosine structuren gefosforyleerd raken zonder kinase is onbekend. Maar gedacht wordt dat doordat PECAM-1 enerzijds geankert is aan een naburige cel en anderzijds aan het cytoskelet er twee tegengestelde krachten op PECAM-1 werken wat een conformatie verandering tot gevolg brengt. Waarna de tyrosine residuen makkelijk gefosforyleerd kunnen raken. Na activatie van PECAM-1 bindt de proteïne tyrosine fosfatase SHP-2 aan PECAM-1. Het is SHP-2 dat na associatie met gab-1 de Ras-MAPK signaalroute activeert en ERK activeert[41]. Verder schijnt ook de PI



Figuur 7. XIAP blijkt essentieel te zijn voor translocatie van FAK onder FSS van celkern naar FA. Hierdoor komt FAK dicht bij Src te liggen waardoor ERK pathway kan worden geactiveerd. Figuur 7A western blot resultaten van diverse antilichamen. Figuur 7B laat quantificatie van gefosfoliseerd ERK zien voor controle en getransfecteerde cellen met siRNA tegen XIAP(PP2) laat duidelijk significante vermindering zijn in Erk activiteit in getransfecteerde conditie. Figuur 7C,D laten immunohistologische resultaten zien met antilichamen tegen FAK en SRC. In figuur 7C is tussen controle geen verschil te zien. In figuur 7D is duidelijk zien dat na applicatie van FSS FAK zich rond de celkern ophoopt. Terwijl in controle FAK difuus verdeeld was. Bron{{Ahn,S. 2010;}}

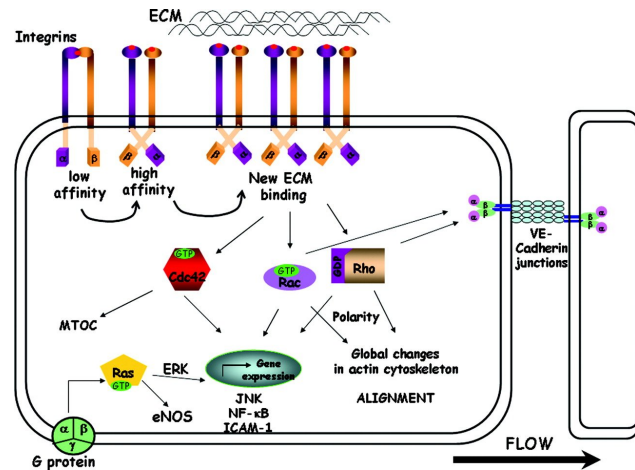
(3)K-AKT route te worden geactiveerd door onder andere PECAM-1 maar op deze route zal later worden behandeld (zie: Mechanosensitief complex PECAM-1/VE-CADHERIN/VEGFR/Integrines). Dit betekent dus dat PECAM-1 activatie leidt tot vasodilatatie maar PECAM-1 is ook belangrijk voor de regulatie van NF- κ B en expressie van VCAM-1. In PECAM -/- muizen waren namelijk NF- κ B als VCAM-1 beide verantwoordelijk voor ontstekingsreactie aanzienlijk lager dan in controle muizen[42]. VE-cadherine is een van de vele cadherines die gezamenlijk verantwoordelijk zijn voor het in stand houden van cel-cel contacten. VE-cadherine gaat net als PECAM-1 homofiele interacties aan met andere VE-cadherines van naburige cellen maar met een zwakkere affiniteit dan bijvoorbeeld PECAM-1. Ook kunnen VE-cadherines net PECAM-1 intracellulair binden aan β -catenine en γ -catenine en linken zo VE-cadherines aan het cytoskelet door middel van SF's. De morfologische reorganisatie van de SF's met de stroming mee betekent dat bij aanzet van FSS mogelijke oude verbindingen tussen adhesie moleculen en cytoskelet moeten kunnen worden afgebroken en nieuwe moeten kunnen worden gevormd. Dit gebeurt door fosfolisatie van de β -catenine die hierdoor de binding met α -catenine verliest en zo losgekoppeld raakt van het cytoskelet. β -

catenine raakt gefosfoliseerd nadat VE-cadherin associatie verliest van SHP-2 of fosforlisatie van SHP-2. Deze fosforlisatie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door c-Src[43]. Recentelijk is VE-cadherine geïdentificeerd als mogelijke adapter eiwit in een mogelijk mechanosensory complex waar ook PECAM-1, VEGFR en integrines bij betrokken zijn .

3.2 Integrines en basale focal adhesie complexen

Integrines zijn transmembrane glycoproteïnen die bestaan uit een α en β subeenheid. Elk van deze subeenheden heeft een betrekkelijk groot extracellulair domein, een transmembraan overbruggingseenheid en een betrekkelijk klein cytoplasmatisch domein. Het extracellulaire domein van integrines kan binden aan componenten van extracellulaire matrix (ECM) zoals; vitronectine, fibronectine, laminine en collageen[44]. Integrines verbinden de cel aan de ECM en het cytoskelet door middel eiwitten zoals α -actinine, vinculine, taline, tensine en paxilline. Ook kunnen aan het cytoplasmatisch domein van integrines diverse signaal moleculen binden zoals focal adhesie kinase (FAK), Src familie protein kinases, Fyn, p130^{CAS} [44]. Integrines zijn niet de meest voor de hand liggende groep kandidaten voor mechanosensitieve moleculen

domweg vanwege hun ligging binnen de cel. Integrines zijn namelijk voornamelijk te vinden aan de basale kant van de endotheelcellen en zijn dus zodoende niet direct onderhevig aan de extracellulaire krachten genereert door FSS. Hoewel integrines ook te vinden zijn in de apicale kant van de cel. Integrines vormen clusters nadat ze in ze geactiveerd raken en deze clusters worden focal adhesions (FA) genoemd. Directe activatie van FSS met behulp van met RGD peptide (Arg-Gly-Asp) gecoate magnetische kralen. RGD peptide is een onderdeel van fibronectine en zijn liganden van integrines. Binding aan deze gecoate magnetische kralen alleen was niet genoeg voor een respons maar zodra een magnetisch veld werd aangebracht werd het cytoskelet steviger[45]. Vandaag hebben we een redelijk beeld maar nog lang geen volledig beeld hoe integrines mechanische lading vertalen in biochemische signalen. Integrines kunnen geactiveerd raken door of aan hun desbetreffende ligand [44] te binden of door signalen van binnen de cel zoals PIP₂. PIP₂ wordt geneert in de PI(3)K signaalroute. Inhibitoren van deze route zoals LY294002 en wortamannine voorkomen integrine activatie en reorganisatie van het cytoskelet. Dit wijst erop dat integrine activatie door FSS afhankelijk is van activatie van andere signaalmoleculen.[46] Na activatie bevordert integrines fosforlisatie van FAK's. De mate van fosforlisatie van FAK is direct proportioneel tot de mate van mechanische belasting op integrines. FAK wordt gerecrueteerd in FA door talline en recentelijk is aangetoond FAK ook gerecrueteerd kan worden naar FA door X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). Waarneer XIAP wordt uitgeschakeld door gebruik te maken van small intervering RNA (siRNA) blijft FAK gelocaliseerd rond de celkern terwijl in controle FAK rond de FA blijft. Dit is totaal afhankelijk van FSS omdat bij cellen zonder FSS de FAK localisatie onafhankelijk is van XIAP. [47] Geactiveerde FAK's zijn vervolgens in staat om ongeactiveerde FAK's te fosfoliseren. Hierdoor ontstaan bindingsplaatsen voor c-Src en ontstaat een FAK-Src signaal complex[48]. Dit signaalcomplex geneert door fosforlisatie van diverse tyrosine en serotine residuen binnen het FAK-src complex bindingsplaatsen voor p130^{CAS} en Grb2. Grb2 bevat een guanine exchange factor (GEF) dat Son of sevenless (Sos) wordt genoemd. Deze activeert vervolgens small GTP ases zoals Ras en Rho en kan hierdoor de Ras-MAPK signaalroute activeren wat leidt tot ERK activatie.



Figuur 8. Integrine activatie kan na binding met componenten van ECM diverse small GTP'ase activeren. Waar RhoA zorgt voor contractie van SF en afbraak van bestaande FA. Kan Rac1 nieuwe SF's aanmaken en FA versterken. Cdc42 kan de FA turnover en actine polymerisatie bevorderen door WASP maar in niet noodzakelijk voor FSS morfologische veranderingen Wel noodzakelijk voor

3.2.1 Integrines activatie leidt cytoskelet reorganisatie en FA formatie

De meeste opvallendste observatie is dat endotheelcellen na applicatie van FSS zich met de stroming mee oriënteren(fig 1). Deze verandering in oriëntatie wordt verklaard door reorganisatie van de SF's door Ras GTP'ases zoals RhoA, Rac1, en cyclin dependent kinase Cdc42. Naast dat deze small GTP'ases betrokken zijn bij SF polymerisatie zijn ze ook betrokken bij het vormen van nieuwe FA en reorganisatie van microtubuli . Zoals al gezegd worden de small GTP'ases voornamelijk geactiveerd door FAK fosforlisatie daarnaast is er ook bewijs dat G-protein coupled receptors een rol spelen bij Ras activatie[49] De activatie door middel van de Gβγ is sneller dan de activatie door FAK. In een statische cel wordt het cytoskelet organisatie beheert door wisselwerking tussen RhoA en Rac. Waar RhoA activatie zorgt dat F-actine bundels samentrekken en zo FA kan afbreken zorgt Rac voor nieuwe polymerisatie van SF's en FA formatie. Er zijn twee fasen te onderscheiden qua morfologie. Zodra FSS over een cel aangebracht wordt worden de cel rond en verliezen ze polarisatie. Het rond worden van de cellen gebeurt doordat RhoA zorgt voor contractie van de SF. Dit gebeurt door fosforlisatie van MLC van myosine en kan naast RhoA ook door Ca⁺/calmoduline afhankelijke MCLK worden gefosfoliseerd. Door deze contractie breken de verbindingen tussen sommige

SF's en cel-cel-contacts en focal adhesions complexen. De tweede fase (rond 15 minuten) is de formatie van lameliopodia (uitstulpingen van celmembraan) aan de downstream kant van de cel. En valt samen wanneer RhoA activiteit het laagst is en Rac 1 activiteit het hoogst en is dus een gevolg van Rac1[50]. Hoewel deze activiteit wel betrekkelijk laag is met vergelijking tot de maximum activiteit van RhoA. Dit is waarschijnlijk een oorzaak van de sterke lokalisatie van Rac1 in de "leading edge" van de cel. De verhoging van Rac1 zorgt voor polymerisatie van actine zorgt voor nieuwe SF'formatie daarnaast verhoogd Rac1 de formatie van nieuwe FA en cel-cel-contacts. Recentelijk is aangetoond dat de grootte en dikte van de nieuwe FA en cel-celcontacts direct is van de mate van kracht op deze punten[51]. Rac1 activatie lijkt ook samen te gaan met met integrine binding aan ECM. Doordat het blokkeren van ongebonden integrines de Rac1 activiteit sterk inhibeert[52]. Cdc42 activatie hangt niet samen met polarisatie en reorganisatie van SF's doordat kunstmatige inhibitie van cdc42 geen effect heeft op deze twee verschijnselen[53]. Cdc42 speelt wel een sterke rol bij de reorganisatie van microtubulli en microtubulli organisng center (MTOC). Waargenomen is dat de MTOC zich na applicatie van FSS zich verplaatst downstream en achter de celkern [54]. Ook zou cdc42 kunnen bijdragen aan de snelheid van SF en FA formatie met behulp van WASP[55]. Ook kunnen ras, rac1, rhoA en cdc42 genexpressie veranderen. Zo is bekend dat Rac1 bedraagt aan de productie van reactieve oxygen species (ROS) welke vervolgens weer leiden tot een verhoging van ICAM-1 expressie.[55] Rho activatie draagt bij aan AP-1 activatie door Jnk's en c-fos activatie. C-fos kon ook door cdc42 worden geactiveerd en cdc42 activatie leidt tot Jnk activatie. Zowel Ras, Rac1, rhoA en cdc42 dragen allemaal bij aan activatie van NF-κB[52].

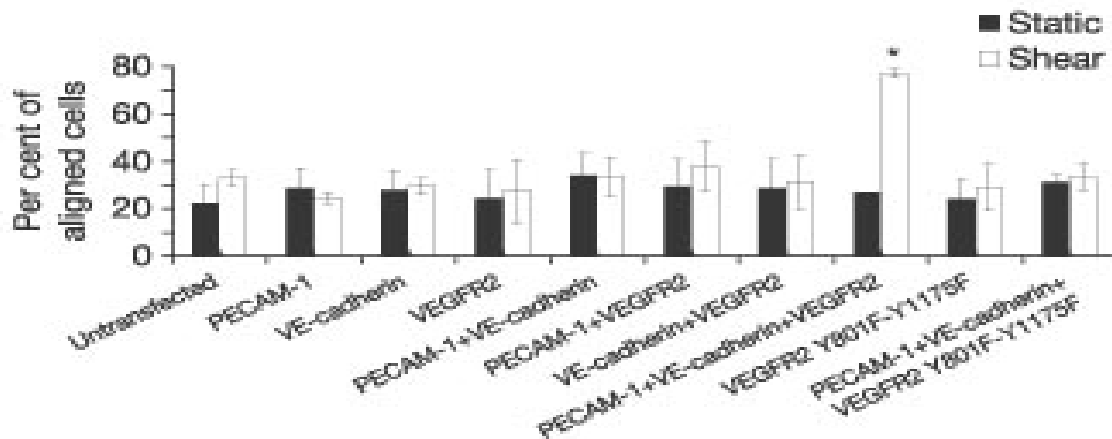
3.3 Receptor Tyrosine Kinases VEGFR-2 en Tie-2 ligand onafhankelijke activatie.

Receptor tyrossine kinases (RTK's) waaronder VEGFR-2 en TIE-2 activeren veel intracellulaire signal pathways. Normaal leidt binding met hun ligand tot dimerisatie wat vervolgens leidt tot transautofosforisatie. Vervolgens kunnen signaal eiwitten zoals PI3-kinase en phospholipase C-γ met behulp van SH2 domeinen binden aan de geactiveerde RTK's. Dit activeerd signaal pathways zoals PI3-kinase/ Akt pathway welke onder andere verantwoordelijk is voor eNOS activatie en

inhibitie van apoptose. Ook kan door middel van phospholipase C-γ leiden tot recruterings van Ca⁺ die zoals eerder beschreven mechanismen leidt tot stimulatie in EDRF/NO productie. En ook de RAS-MAP (Erk en Jnk) pathway voornamelijk verantwoordelijk voor differentiatie en celgroei. Bekend is dat deze pathways sterk geactiveerd zijn tijdens FSS. Dit leidde tot de veronderstelling dat of RTK's geactiveerd moesten kunnen worden door FSS of dat er onafhankelijk van RTK's er een manier moet zijn dat de desbetreffende pathways geactiveerd raken. Een groot aantal studies toonde vervolgens aan dat RTK zoals VEGFR en Tie-2 receptors geactiveerd werden door FSS zonder dat ligand aanwezig was[56,57]. Nog veel is onbekend over de exacte manier waarop RTK's geactiveerd raken zonder ligand gebonden dimerisatie. Wel is bekend dat dit sterk te maken heeft met integrines, tyrosine kinases en het cytoskelet. Zoals misschien al eerder beschreven gaan ankeren integrines eenzijdig direct aan de extracellulaire matrix en anderzijds met behulp van anker eiwitten taline en vinculine aan het cytoskelet en ankeren zo de cel aan de basale lamina. Over het algemeen vormen de integrines clusters en vormen zo een focal adhesion complex. Op deze plekken vindt veel tyrosine kinase fosforilisatie plaats en het voornamelijk focal adhesion kinase (FAK) wordt hier gefosforiliseerd. FAK wordt hier gerecruteerd door taline en gefosforiliseerd FAK is staat om naburige ongefosforiliseerd FAK te fosforiliseren. De conformatie vernadering van de FAK's zorgen voor docking sites voor de superfamilie Src's. Het wordt gedacht dat vervolgens deze gelokaliseerde Src's eiwitten die interacties aangaan met actine rekruteren. Deze actine vezels zouden dan weer verbonden zijn met RTK's. Waargenomen is dat spatiale distributie van RTK's verandert tijdens FSS mogelijkwerwijs door deze verbinding.[55] Clustering van RTK monomeren zou ervoor kunnen zorgen dat dimerisatie plaatsvindt en zo zouden RTK's kunnen worden geactiveerd. Om zo vervolgens als dockingsite te fungeren voor signaal eiwitten zoals Src, Cbl, Pi(3)K en phospholipase C-γ en zo de bovengenoemde signaalroutes kunnen activeren.

3.4 Mechanosensitief complex PECAM-1/VE-CADHERIN/VEGFR/Integrines.

Doordat veel van de mechanosensitieve moleculen gebruik maken van dezelfde tyrosine kinases zoals SHP-2 bij PECAM-1 en bij integrines is het mogelijk dat



Figuur 9. Zowel PECAM-1 als VE-cadherin en VEGFR2 alleen waren niet in staat om integrines te activeren en zo cytoskelet reorganisatie in gang te zetten. Alleen de combinatie van alle drie receptoren zorgde voor een significant verschil in de hoeveelheid cellen die zich met de stroom mee gingen oriënteren. Ook werd een VEGFR double mutant getest waarbij de tyrosine kinase residu n zijn uitgeschakeld wat het belang van VEGFR-2 voor integrine activatie nogmaals bevestigd. Bron: {{Tzima,E. 2005;}}

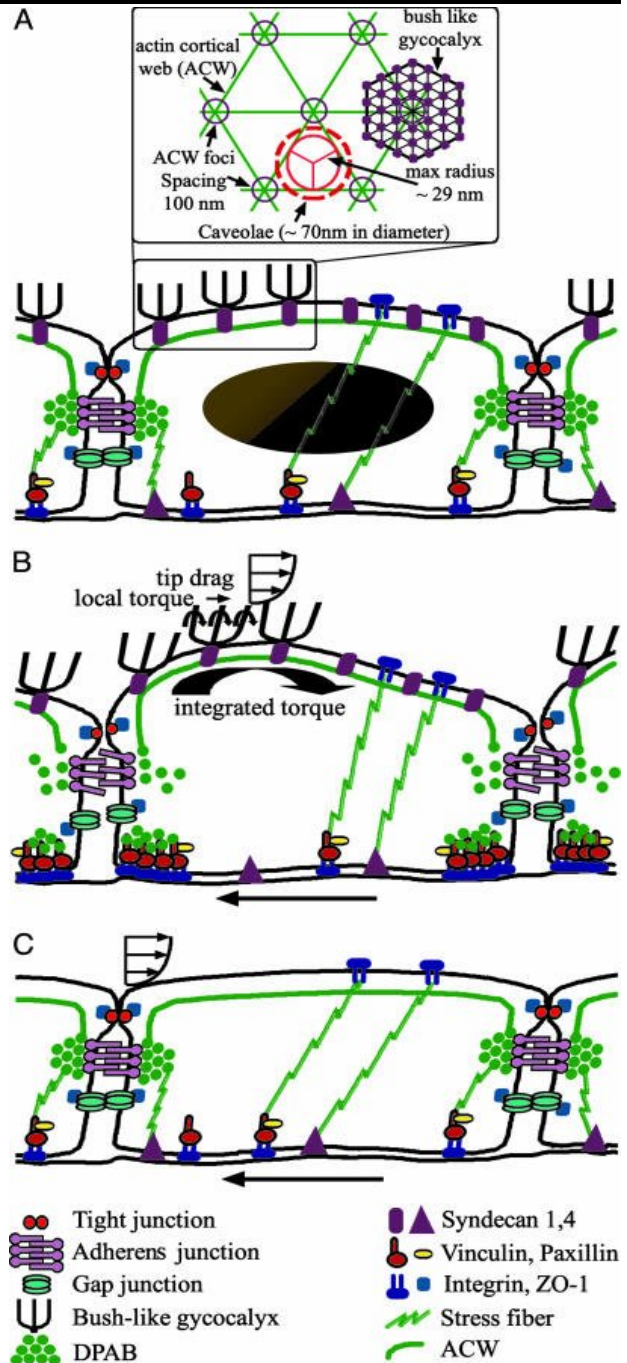
elkaar versterken en zelfs mogelijk een integraal complex vormen. Recentelijk is aangetoond dat bovengenoemde structuren mogelijk inderdaad samen een groot complex vormen. Dit wil zeggen dat integrine activatie afhankelijk is van een cascade van dat wordt geïnitieerd door PECAM-1 fosforilisatie. Zoals eerder behandeld is integrine activatie afhankelijk van PI(3)K. En PI(3)K kan vervolgens door een tal van mechanosensitieve receptoren geactiveerd worden zoals, G-protein coupled receptors en VEGFR-2[58]. Dit suggereert dat al deze complexen harmonieus samenwerken om mechanische signalen te vertalen in chemische signalen. Recentelijk werd een mogelijk complex ontdekt namelijk tussen PECAM-1/VE-cadherin/VEGFR/Integrines. In EC cellen getransfecteerd met anti-sense S-oligonuclotiden tegen PECAM-1 (PECAM-1 $-/-$) en VEGFR (VEGR $-/-$) en homozygote deletie van VE-cadherin (VE-cadherin $-/-$) en WOW-1 fab om de integrines te activeren werd de Src en Akt activiteit gemeten en het vermogen van cel om het cytoskelet te oriënteren met de stromingsrichting. Gevonden werd dat een combinatie van PECAM-1/VE-Cadherin/VEGR2 nodig was voor succesvol cytoskelet reorganisatie. Combinaties van twee van deze receptoren of cellen waar slechts een van bovengenoemde receptoren tot expressie kwamen op het celmembraam waren niet in staat hun cytoskelet met de stroming mee te oriënteren(Fig.9). Directe activatie van PECAM-1 door magnetische kralen coating leidde tot een verhoging van Akt activiteit terwijl de andere receptoren niet in staat

waren om Akt te activeren via direct stimulatie maar in VE-cadherin $-/-$ was deze Akt activatie volledig geblokkeerd. PECAM-1 heeft VE-Cadherin dus nodig om het signaal te propageren. De precieze manier waarop PECAM-1 VE-cadherin activeert is onduidelijk. Wel is gevonden dat PECAM-1 een complex kan vormen met bepaalde G-proteins subeenheden en dat deze G-proteins subeenheden geactiveert raken door dissociatie met PECAM-1 en in staat zijn om eNOS te activeren[59,60]. Al met al zijn de precieze mechanismen nog grotendeels onbekend maar bekend is dat PECAM-1 Src activeert en VE-cadherin als adapter eiwit geldt voor de activatie van VEGFR die PI(3)K activeert.

3.5 Glycocalyx

Endotheelcellen zijn bedekt met een laag membraangebonden macromoleculen die de endotheel glycocalyx vormen. Hoewel nog weinig bekend is over de exacte compositie van de endotheel glycocalyx is wel bekend dat hyaluronan, chondroitine en heparine sulfaat een belangrijke rol spelen in de vorming van de endotheel glycocalyx. Enzymatisch verwijdering van heparine sulfaat door middel van heparinase en verwijdering van hyaluronan door hyaluronidase zorgt voor een complete inhibitie van NO productie. Dit draagt eraan bij dat endotheel glycocalyx een mogelijke kandidaat is voor mechanosensing. Tot nu hebben twee modellen de voorkeur hoe glycocalyx bijdraagt aan

mechano-transductie. Het eerste en vrij nieuw model is het zogenaamde bumper-car model door Thi et al. bij dit model gaat men ervan uit dat endotheel glycocalyx gekoppeld zijn aan het actine corticale web (ACW) doormiddel van de proteoglycan syndecan. Dit is een complex van enkele filament actine (FA) vezels die gecrosslinked een web vormen rondom de cel. Het ACW is op zijn beurt gekoppelt aan dense peripheral actine band (DPAB) en vormen samen een functioneel geheel. Dit is een soort band van actine vezels rondom het midden van de cel en kan worden gezien als een soort bumper van de cel omdat het de cel beschermt tegen botsingen van naburige cellen. In een normale situatie is de DPAB is op zijn beurt zwak gekoppelt aan stress fibers (SF) en focale adhesie complexen aan basale en laterale kant van de cel. Deze focale adhesie complexen bestaan uit een tal van adhesiemoleculen zoals VE-cadherin, CD31 lateraal van de cel die rechtstreeks gekoppeld zijn aan de DPAB en aan de basale kant door middel van SF's verbonden aan DPAB de integrine complexen. Het model stelt voor dat wanneer er een kracht ontstaat op de glycocalyx deze kracht een moment doorgeeft op de ACW en DPAB. Het moment dat genereert wordt door individuele glycocalyx is miniem maar het gecombineerde moment genereert door alle glycocalyx op de oppervlakte is in staat om de zwakke binding tussen de DPAB en SF en FA te doorbreken. Dit zorgt voor een instabiele configuratie van de cel en om ervoor te zorgen dat de cel niet wegspoelt moeten nieuwe SF's en FA gevormd worden om de cel weer te ankeren aan de ECM en naburige cellen. Dit gebeurt door vinculine te recruteren aan de basale ondergrenzen van de endotheelcel. Die weer nieuwe FA complexen vormen waar de DPAB door middel van SF's aan kunnen binden. Dit model ondersteunt de bevindingen van de experimenten waarbij men enzymatisch onderdelen van de glycocalyx verwijdert. Immers wanneer er geen glycocalyx op het membraan vormen kan er geen moment worden doorgegeven en dit zorgt ervoor dat er geen reorganisatie van het cytoskelet plaatsvindt[61]. Het tweede model gaat ervan uit dat glycocalyx onder normale condities een opgevouwen karakter heeft. Zodra er een de glycocalyx een stroming ondervindt ontvouwt deze en gaat als een vaandel in de wind met de stroming mee bewegen. Deze verandering in conformatie zorgt ervoor dat er meer bindingsplekken vrijkomen voor Na^+ ionen. Doormiddel van counterion migratie ontstaat een toename van Na^+ influx. Dit zorgt ervoor



Figuur 10. Hypothetisch bumper car model over de manier hoe glycocalyx kunnen bijdragen tot mechanotransductie. In figuur 10 A is een intact DBAB te zien die als basis geldt voor de ACW. Na applicatie van FSS ontstaan er momenten op de glycocalyx en daardoor een moment op de DBAB die vastzit aan de glycocalyx met behulp van het ACW. Hier breekt de DBAB wat leidt tot formative van nieuwe FA en cel-cel contacts en uiteindelijk tot een rust situatie. Figuur 7c Dit verklaart dat wanneer glycocalyx worden verwijderd geen reorganisatie van het cytoskelet plaatsvindt. Bron {{121 Thi,M.M. 2004;}}

dat het membraam gedepolariseerd wordt door een Ca^+ influx. En deze influx van Ca^+ ionen zorgt voor een stimulatie in EDRF/NO productie. Dit model voorspelt ook dat wanneer stroming afneemt de glycocalyx het aantal vrije Na^+ bindingsplekken afneemt [62].

3.7 G-proteins coupled receptors

De G protein coupled receptors (GPCR's) zijn in staat om op een groot aantal prikkels te reageren zoals; fotonen, geur- en smaakmoleculen, nucleotiden, peptiden en ionen. Nadat binding aan wordt gegaan met een van deze liganden bevordert dit de α -subeenheid om GDP te ontbinden. Vervolgens bindt GTP op deze plaats en zorgt voor een grote verandering in de conformatie van GPCR's waardoor eerder verborgen bindingsplekken bloot komen te liggen. Hier kunnen vervolgens eiwitten aan kunnen binden en zo een signaaltransductie op gang kunnen brengen. Echter zijn er ook vele gevallen bekend dat zonder bovengenoemde liganden de GPCR's geactiveerd kunnen raken. Recent onderzoek heeft aangetoond dat veranderingen in membraan dikte in staat zijn om GPCR's te activeren zonder dat ligand aanwezig is. In een FSS experiment met de bradykin B2 GPCR werd een conformatie verandering waargenomen waardoor de GPCR geactiveerd raakte [63]. In ander experiment werd aangetoond dat FSS in staat was om gepurifieerde G-eiwitten in liposomen te activeren zonder receptor eiwitten wat bewees dat G-eiwitten als mechanotransducer kunnen reageren [64]. Ook blijken zoals als eerder genoemd G-proteins subeenheden complexen te vormen met PECAM-1. GPCR activatie door FSS kan leiden tot Ras activatie en dus ERK ook kunnen GPCR's leiden tot activatie van de PI(3)K-Akt signaalroute.

3.8 Caveolae

Caveolae zijn kleine ronde invaginaties van de celmembraam van rond de 50-100 nm lang en worden ook wel "lipid rafts" genoemd. De caveolae bewegen vrij over de celmembraam en bevatten vergeleken met andere domeinen in het celmembraam verhoogde aantal receptoren RTK's maar ook bepaalde specifieke integrines en signaal moleculen zoals Src family kinase, eNOS, Ras, G-proteins en is de precieze samenstelling van deze eiwitten heterogeen verdeeld tussen caveolae[65]. Zoals al eerder besproken zijn caveolae sterk betrokken bij eNOS activatie na FSS en is eNOS

hier sterk gelocaliseerd. Ook zijn caveolae sterk betrokken bij Ras-MAPK signaalroute doordat verstoring van caveolae structuur door cholesterol deze de Erk activiteit sterk inhibeert[66]. Ook wordt zowel de dichtheid als de expressie van caveoline-1 sterk verhoogd na applicatie van FSS [65]. Ook bestaat er een sterk verband tussen caveolae en intergrine activatie. Intergrine activatie is genoeg om caveolae-1 te fosfoliseren welke vervolgens kan fungeren als een dockingsite voor signaal moleculen waaronder Csk. Csk kan vervolgens integrines weer activeren die vervolgens een sterke rol spelen bij de reorganisatie van het cytoskelet[67].

4. Discussie

De manieren waarop endotheelcellen kunnen reageren op veranderingen op hun extracellulaire milieu zijn divers en vertonen veel overlap. Toch is duidelijk dat veel dezelfde signaalroutes worden gebruikt om de cel zoveel mogelijk te beschermen tegen de frictionele krachten die optreden in bloedvaten. Endotheelcellen zijn zeer gespecialiseerd geraakt om deze frictionele kracht per oppervlakte eenheid zo klein mogelijk te houden. Dit gebeurt enerzijds door een totale oppervlakte vergroting van de totale monolayer van endotheelcellen door vasodilatatie. Maar misschien interessanter door een complete reorganisatie van inwendige structuren door reorganisatie van het cytoskelet. Ook worden adhesiemoleculen zoals VCAM-1 en ICAM-1 sterk verlaagd en wordt zo de adhesie van circulerende cellen verminderd wat ook zorgt voor vermindering van de frictionele kracht. De adhesie in FA en cel-cel contact sites worden juist versterkt door clustering van bijvoorbeeld integrines. Deze punten moet ook wel worden versterkt omdat deze punten de permeabiliteit en integriteit van de monolayer waarborgen. Waarneer deze integriteit wordt faalt, kunnen bloedingen en ontstekingsreacties optreden in onderliggend weefsel lagen. De endotheelcel hebben manieren geëvolueerd om bestaande receptoren die oorspronkelijk bedoeld waren om te reageren op biochemische stimuli in een ligand onafhankelijke manier te activeren. En juist over deze manier is nog zo weinig bekend. Het voorbeeld van PECAM-1 welke als een van de eerste groep eiwitten gefosforileerd raakt is hiervan een beduidend goed voorbeeld. Voorgesteld is dat een conformatie verandering bedraagt aan activatie maar dit is nooit bewezen. In slechts twee groepen eiwitten leiden

bewezen conformatie veranderingen tot activatie namelijk GPCR's en stretch activated cation kanalen. In dit review is alleen beperkt gekeken naar een frictionele kracht die optreedt tijdens een laminaire stroming. Uiteraard is stroming in bloedvaten ver van laminair en ideaal en treedt in slagaders door de cyclische belasting van het hart hele ander krachten op de monolayer van endotheelcellen. Deze kracht is zelfs in verhouding met de kracht door laminaire stroming 10,000 keer groter en zorgt voor grote deformaties van de endotheelcellen[68]. Wel is bekend dat de productie van ROS door NADPH aanzienlijk hoger liggen in endotheelcellen onder een cyclische belasting terwijl juist in laminaire stroming superoxide dismutase (SOD) wordt verhoogd[69]. Dit wijst erop dat er een extra laag van complexiteit bestaat tussen cyclische belasting en laminaire belasting. Interessant is dat onderzoek in dit veld steeds meer multidisciplinair aan het worden is. Door nieuwe technieken waarbij men een gerichte mechanische belading op losse FA en SF's geven nieuwe inzichten in hoeverre enkele complexen in staat zijn om een signaal te propageren. Ook geeft het informatie over de heterogeniteit tussen verschillende FA complexen. De output van deze experimenten geven een schat aan mathematische informatie die door engineers die informatie geven over de grote van trekkracht op SF's. Deze informatie is van groot belang omdat de rol van het cytoskelet met standaard biologische technieken moeilijk te onderzoeken zijn. Natuurlijk leid informatie over de exacte manier hoe FSS wordt doorgegeven tot een beter besef hoe pathologische processen kunnen ontstaan en worden voorkomen. Vooral arteriosclerose staat onder veel belangstelling maar ook andere ziektes zoals diabetes kunnen voordeel hebben bij dit vakgebied. Zo leiden nieuwe inzichten in hoe FSS bijdraagt aan neovascularisatie mogelijk tot technieken waardoor men neovascularisatie kan initiëren in gebieden met slechte doorbloeding. Dezelfde inzichten kunnen ook bijdragen aan het onderzoek naar Hutchinson Gilford progeria syndrome, hypertensive, metabool syndroom en andere hart- en vaat ziekten.

5. Dankwoord

Met dank aan meneer Harmsen voor het onderwerp. Uiteraard ook voor de begeleiding en het in staat stellen om mijn scriptie te kunnen voltooien buiten de geperkte datum. Verder wil ik mijn ouders bedanken voor hun klinische in zichten

6. referenties

- [1] Fry DL. Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients. *Circ Res.* 1968 Feb;22(2):165-97.
- [2] Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol.* 1980 Jul;239(1):H14-21.
- [3] Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005 Jan;85(1):9-23.
- [4] Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, et al. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:527-49.
- [5] Kano Y, Katoh K, Fujiwara K. Lateral zone of cell-cell adhesion as the major fluid shear stress-related signal transduction site. *Circ Res.* 2000 Mar 3;86(4):425-33.
- [6] Katoh K, Kano Y, Ookawara S. Rho-kinase dependent organization of stress fibers and focal adhesions in cultured fibroblasts. *Genes Cells.* 2007 May;12(5):623-38.
- [7] Katoh K, Kano Y, Ookawara S. Morphological differences between guinea pig aortic and venous endothelial cells in situ. *Cell Biol Int.* 2007 Jun;31(6):554-64.
- [8] VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: Site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):12-22.
- [9] Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):722-6.
- [10] Takada Y, Shinkai F, Kondo S, Yamamoto S, Tsuboi H, Korenaga R, et al. Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Dec 15;205(2):1345-52.
- [11] Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science.* 1989 Mar 17;243(4897):1483-5.
- [12] Yeh CC, Chang HI, Chiang JK, Tsai WT, Chen LM, Wu CP, et al. Regulation of plasminogen activator inhibitor 1 expression in human osteoarthritic chondrocytes by fluid shear stress: Role of protein kinase alpha. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2350-61.
- [13] Akimoto S, Mitsumata M, Sasaguri T, Yoshida Y. Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circ Res.* 2000 Feb 4;86(2):185-90.
- [14] Lin K, Hsu PP, Chen BP, Yuan S, Usami S, Shyy JY, et al. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Aug 15;97(17):9385-9.
- [15] Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci.* 2005 Sep 15;118(Pt 18):4103-11.
- [16] Berk BC, Min W, Yan C, Surapisitchat J, Liu Y, Hoefen R. Atheroprotective mechanisms activated by fluid shear stress in endothelial cells. *Drug News Perspect.* 2002 Apr;15(3):133-9.
- [17] Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: Pivotal mediator or

- innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(3):255-64.
- [18] Petzold T, Orr AW, Hahn C, Jhaveri KA, Parsons JT, Schwartz MA. Focal adhesion kinase modulates activation of NF-kappaB by flow in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Oct;297(4):C814-22.
- [19] Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Jr, Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Aug;19(8):1825-34.
- [20] Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, et al. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10;278(2):703-11.
- [21] Liu Y, Zhu Y, Rannou F, Lee TS, Formentin K, Zeng L, et al. Laminar flow activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular endothelial cells. *Circulation*. 2004 Aug 31;110(9):1128-33.
- [22] Ni CW, Hsieh HJ, Chao YJ, Wang DL. Shear flow attenuates serum-induced STAT3 activation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):19702-8.
- [23] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol*. 2003 Nov;95(5):2081-8.
- [24] Obi S, Yamamoto K, Shimizu N, Kumagaya S, Masumura T, Sokabe T, et al. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol*. 2009 Jan;106(1):203-11.
- [25] Shimizu N, Yamamoto K, Obi S, Kumagaya S, Masumura T, Shimano Y, et al. Cyclic strain induces mouse embryonic stem cell differentiation into vascular smooth muscle cells by activating PDGF receptor beta. *J Appl Physiol*. 2008 Mar;104(3):766-72.
- [26] Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG, Searles CD. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res*. 2005 Jun 10;96(11):1161-8.
- [27] Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 1995 Jun 9;270(23):14214-9.
- [28] Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J. Relationships between caveolae and eNOS: Everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Jul;283(1):F1-10.
- [29] Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: Role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Sep;285(3):C499-508.
- [30] Tian J, Hou Y, Lu Q, Wiseman DA, Vasconcelos Fonseca F, Elms S, et al. A novel role for caveolin-1 in regulating endothelial nitric oxide synthase activation in response to H2O2 and shear stress. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jul 15;49(2):159-70.
- [31] Wang W, Ha CH, Jhun BS, Wong C, Jain MK, Jin ZG. Fluid shear stress stimulates phosphorylation-dependent nuclear export of HDAC5 and mediates expression of KLF2 and eNOS. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2971-9.
- [32] Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA, Jr, Greene AS. Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res*. 1997 Mar;80(3):312-9.
- [33] Sharefkin JB, Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV, Dieffenbach CW. Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J Vasc Surg*. 1991 Jul;14(1):1-9.
- [34] Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J. P2X(4) receptors mediate ATP-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jul;279(1):H285-92.
- [35] Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress activates ca(2+) influx into human endothelial cells via P2X4 purinoceptors. *Circ Res*. 2000 Sep 1;87(5):385-91.
- [36] Loot AE, Popp R, Fisslthaler B, Vriens J, Nilius B, Fleming I. Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation. *Cardiovasc Res*. 2008 Dec 1;80(3):445-52.
- [37] Yao X, Kwan HY, Chan FL, Chan NW, Huang Y. A protein kinase G-sensitive channel mediates flow-induced ca(2+) entry into vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2000 May;14(7):932-8.
- [38] Brakemeier S, Eichler I, Hopp H, Kohler R, Hoyer J. Up-regulation of endothelial stretch-activated cation channels by fluid shear stress. *Cardiovasc Res*. 2002 Jan;53(1):209-18.
- [39] Yao X, Kwan HY, Chan FL, Chan NW, Huang Y. A protein kinase G-sensitive channel mediates flow-induced ca(2+) entry into vascular endothelial cells. *FASEB J*. 2000 May;14(7):932-8.
- [40] Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*. 1990 Mar 9;247(4947):1219-22.
- [41] Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri JA. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21435-43.
- [42] Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: Is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol*. 2002 Aug 19;158(4):773-85.
- [43] Harry BL, Sanders JM, Feaver RE, Lansley M, Deem TL, Zarbock A, et al. Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Nov;28(11):2003-8.
- [44] Ukropec JA, Hollinger MK, Woolkalis MJ. Regulation of VE-cadherin linkage to the cytoskeleton in endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Exp Cell Res*. 2002 Feb 15;273(2):240-7.
- [45.] Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:463-518.
- [46] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*. 1993 May 21;260(5111):1124-7.
- [47] Tzima E, del Pozo MA, Shattil SJ, Chien S, Schwartz MA. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J*. 2001 Sep 3;20(17):4639-47.

- [48] . Ahn S, Park H. XIAP is essential for shear stress-enhanced tyr-576 phosphorylation of FAK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Aug 20;399(2):256-61.
- [49] Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jul 5;1692(2-3):77-102.
- [50] Gudi S, Huvar I, White CR, McKnight NL, Dusserre N, Boss GR, et al. Rapid activation of ras by fluid flow is mediated by galpha(q) and gbetagamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):994-1000.
- [51] Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by rho and rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol.* 2003 Apr 28;161(2):429-39.
- [52] Liu Z, Tan JL, Cohen DM, Yang MT, Sniadecki NJ, Ruiz SA, et al. Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 1;107(22):9944-9.
- [53] Tzima E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res.* 2006 Feb 3;98(2):176-85.
- [54] Li S, Chen BP, Azuma N, Hu YL, Wu SZ, Sumpio BE, et al. Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103(8):1141-50.
- [55] Tzima E, Kiosses WB, del Pozo MA, Schwartz MA. Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubuleorganizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):31020-3.
- [56] Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M, Kirschner MW. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and nck. *Nature.* 2002 Aug 15;418(6899):790-3.
- [57] Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, et al. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 9;99(14):9462-7.
- [58] Lee HJ, Koh GY. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 2;304(2):399-404.
- [59] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005 Sep 15;437(7057):426-31.
- [60] Yeh JC, Otte LA, Frangos JA. Regulation of G protein-coupled receptor activities by the platelet-endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1. *Biochemistry.* 2008 Aug 26;47(34):9029-39.
- [61] Otte LA, Bell KS, Loufrani L, Yeh JC, Melchior B, Dao DN, et al. Rapid changes in shear stress induce dissociation of a G alpha(q/11)-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 complex. *J Physiol.* 2009 May 15;587(Pt 10):2365-73.
- [62] Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: A "bumper-car" model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23;101(47):16483-8.
- [63] Siegel G, Walter A, Kauschmann A, Malmsten M, Buddecke E. Anionic biopolymers as blood flow sensors. *Biosens Bioelectron.* 1996;11(3):281-94.
- [64] Chachivvilis M, Zhang YL, Frangos JA. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 17;103(42):15463-8.
- [65] Gudi S, Nolan JP, Frangos JA. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2515-9.
- [66] . Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Oct;285(4):H1720-9.
- [67]. Rizzo V, Sung A, Oh P, Schnitzer JE. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J Biol Chem.* 1998 Oct 9;273(41):26323-9.
- [68] Haidekker MA, L'Heureux N, Frangos JA. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: A study with DCVJ fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Apr;278(4):H1401-6.
- [69] Ueki Y, Uda Y, Sakamoto N, Sato M. Measurements of strain on single stress fibers in living endothelial cells induced by fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May 7;395(3):441-6.