

---

## GENERAL SUMMARY AND DISCUSSION

---

Pericytes, the mural cells of blood microvessels, have been described for the first time in 1873 by the French scientist Charles-Marie Benjamin Rouget as a subset of contractile cells surrounding microvessels [1]. In 1923 Zimmerman introduced a new term "pericytes" to connect to their close location to the endothelial cells that form vessel tubes [2]. Pericytes cover the majority of all capillaries and over the years have emerged as important regulators of vascular morphogenesis and function. Despite extensive studies, there are remaining important unsolved questions related to the mechanobiology of pericytes [3] with one of the most intriguing parts of them – the control of the vascular blood flow [4–8].

Currently, the mechanical behaviour of pericytes, although of significant importance to their biological function, can only be inferred from (post mortem) *in vivo* imaging. The main reason for this lack of accessibility is the difficulty of generating homogeneous cell culture of primary mid-capillary pericytes, as they show differences in phenotype and expression of proteins depending on their location on the capillary tree and don't have unique markers [2, 9, 10]. Additionally, "true" or "approved" pericytes are located on mid-capillaries that show the most clear differences from smooth muscle cells [9, 11]. Pericytes located on pre- or post-capillaries have been defined as "transitional" pericytes [2]. Thus, generating a cell culture of "true", mid-capillary, primary pericytes that don't show expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and support angiogenesis is nearly impossible. As a confirmation, there are no such commercially available primary pericytes present. *In vivo* experiments lack the level of control of experimental conditions and don't support direct cell force measurements in contrast to *in vitro* studies.

In this thesis an attempt was made to push boundaries and develop approaches to study pericyte mechanobiology *in vitro*. First, by us-

## General Summary and Discussion

---

ing human induced pluripotent stem cell-derived pericytes that resemble “true” pericytes located on mid-capillaries, characterized by the lack of  $\alpha$ -smooth muscle actin and supporting angiogenesis [12, 13]. Pericytes have a complicated biochemical and spatial organization of extracellular matrix proteins around them on the capillaries, combined with changing stiffness, accompanying changes in the blood pressure. These factors generally have implications for cell behavior and pericytes are not an exception [14–16]. It is important to combine all these factors in order to accurately reproduce the cell microenvironment *in vitro*. In **chapter 2** the existing knowledge about the structure and properties of the pericyte extracellular matrix have been utilized to identify most appropriate methods to re-create the mechanical microenvironment of pericytes *in vitro* that open new opportunities to study their mechanobiology.

Pericytes are embedded within the capillary basement membrane made of the three main components – collagen IV, laminin-411/511 and fibronectin that are used for attachment of cells in the capillary wall [17–20]. Recent findings revealed that laminin and type IV collagen are not organized into one homogeneous network, but form two layers, allowing fibroblasts to interact with collagen on one side and endothelial cells to interact with laminin on the other side of the basement membrane [21]. Pericytes turned out to be located “under” the collagen layer close to endothelial cells with a thin laminin rich layer in the pericyte-endothelial cell interstitia. Moreover, by electron microscopy it was found that this laminin layer contains small deposits of fibronectin [17, 20, 22]. While endothelial cells attach mainly to laminin, for pericytes this is less well understood. The *in vitro* model of the basement membrane structure in the pericyte-endothelial cell interstitia of the mid-capillary region that I developed allowed to show in **chapter 3** that pericytes prefer fibronectin over the laminin, pointing to a potential role of these fibronectin deposits as main anchoring points for mechanical attachment of pericytes to capillaries. This role was originally proposed by Courtoy in 1983 and now I was able to confirm in an *in vitro* experiment, using the recent advances in the extracellular matrix modeling approaches.

I showed that pericytes respond to the variation in fibronectin-patterned substrate stiffness with changes in force application, spreading, and cell-matrix adhesions size in a not linear manner as, for example, human or mouse fibroblasts, where cellular traction forces together with spreading and cell matrix adhesions size gradually increase with increasing

substrate stiffness [23–25]. Pericytes show optimal spreading and cell-matrix adhesions size on intermediate substrate stiffness and suppressed on both soft and stiff substrates. The forces applied by pericytes do not follow the same trend and are vice versa lower on intermediate substrate stiffness and higher on soft and stiff. The stiffness range supporting optimal pericyte spreading appeared to be close to that for endothelial cells and smooth muscle cells determined by atomic-force microscopy [26, 27], indicating that this stiffness range represents a response in a physiologically relevant stiffness regime. Behavior of pericytes observed in this study gives an insight on the way pericytes distinguish deviations of the microvessel stiffness from the normal tissue and react by increasing contractile forces to provide a mechanical support for microvessel walls, preventing excessive dilation.

As aforementioned, depending on the location along the microvascular tree pericytes have been divided into three subgroups: pre-capillary, mid-capillary and post-capillary pericytes. Mid-capillary pericytes completely lack  $\alpha$ -smooth muscle actin, while pre- and post-capillary pericytes show a gradient in the  $\alpha$ -smooth muscle actin expression levels from low, next to mid-capillaries, to high closer to arterioles and venules where smooth muscle cells come in place [5, 9, 10]. *In vivo* and *in vitro* studies on pericytes and other cell types show that  $\alpha$ -SMA expression is largely affected by soluble factors, but also can be attenuated by mechanical stimuli like substrate stiffness and extracellular matrix. Taking into account that the change of the capillary order is accompanied by the change in its diameter, inside blood pressure, basement membrane thickness and protein composition, pericytes experience different mechanical signals on different parts of the microvascular tree and this may have an influence on  $\alpha$ -SMA protein expression that leads to contractility. Earlier findings already pointed on a special role of extracellular matrix mechanical properties in the  $\alpha$ -SMA regulation in myofibroblasts [28] as well as in mesenchymal stem cells [29]. Whether and how do these factors combine to condition  $\alpha$ -SMA expression gradient in pericytes in the resting vasculature remains unclear.

In **chapter 4** our *in vitro* approach to study pericyte mechanobiology allowed to investigate whether such parameters like vessel diameter, basement membrane composition and stiffness can have an effect on the  $\alpha$ -SMA recruitment to stress fibers in pericytes. An image analysis approach was utilized to obtain uncompromised data on the  $\alpha$ -SMA fiber

## General Summary and Discussion

---

formation with a single cell resolution. It was observed that pericytes seeded on fibronectin dots surrounded by laminin, showed a lower percentage of  $\alpha$ -SMA recruitment to stress fibers than pericytes seeded on a monolayer of fibronectin. The first pattern resembles protein organization in the mid-capillary pericyte-endothelial cell interstitia and the second is more common for arteriole and venule regions of a microvasculature tree. This data suggests an inhibitory effect from the fibronectin organized in patches in the capillary basement membrane on the  $\alpha$ -SMA recruitment to the F-actin cytoskeleton of pericytes. Likewise, pericytes showed low to no additional correlation of the  $\alpha$ -SMA recruitment with the stiffness or vessel diameter in the presence of fibronectin organized in a dotted pattern. In contrast, human smooth muscle cells maintained the ability to form  $\alpha$ -SMA fibers on such a pattern and responded to the deviating stiffness and available area for spreading with different  $\alpha$ -SMA recruitment rates, yet higher than in pericytes. This data demonstrates that after full maturation of pericytes into smooth muscle cells they lose the ability to adjust  $\alpha$ -SMA expression levels in response to the fibronectin arrangement in the basement membrane and become more dependent instead on vessel stiffness and diameter. These findings may further help to unveil processes behind maintaining  $\alpha$ -SMA expression gradient in pericytes, and can be used to keep them from obtaining contractile phenotype in cell culture.

The contractility of pericytes, despite some contradictory results, was reported to be involved in regulation of the cerebral blood flow and promote brain damage in ischemia in mice *in vivo* [4, 5, 8]. Nevertheless, there is no direct evidence in terms of direct mechanical measurements. In **chapter 5** a new approach was designed and characterized that allows to constantly monitor cellular forces during a rapid exchange of cell culture media to expose cells to different environmental conditions such as: the temperature, the composition of the cell culture medium, and the oxygen concentration. This approach permits the study of the behaviour of pericytes during hypoxia and ischemia. It also can be applied to any other cells for which the environmental conditions need to be changed, and where responses in cell force application and morphology are questioned.

Taken together, the approaches developed in this thesis to study pericyte behaviour *in vitro* and the obtained results show novel opportunities to investigate pericyte mechanobiology and provide insight, better

## General Summary and Discussion

---

understanding and proof to processes that were impossible in *in vivo* experiments.

---

## BIBLIOGRAPHY

---

- [1] Charles Rouget. « Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaires sanguins ». In: *Archives Physiol Normale Pathol* 5 (1873), pp. 603–61.
- [2] K.W. Zimmermann. « Der feinere bau der blutcapillares ». In: *Z. Anat. Entwickl.* 68 (1923), pp. 3–109.
- [3] Claire A. Dessalles, Avin Babataheri and Abdul I. Barakat. « Pericyte mechanics and mechanobiology ». In: *Journal of Cell Science* 134.6 (2021), jcs240226. ISSN: 0021-9533.
- [4] Catherine N Hall et al. « Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. » In: *Nature* 508.7494 (2014), pp. 55–60. ISSN: 0028-0836.
- [5] Robert A Hill et al. « Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. » In: *Neuron* 87.1 (2015), pp. 95–110. ISSN: 0896-6273.
- [6] Claire M Peppiatt et al. « Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. » In: *Nature* 443.7112 (2006), pp. 700–4. ISSN: 0028-0836.
- [7] Nicola B Hamilton, David Attwell and Catherine N Hall. « Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease ». In: *Frontiers in neuroenergetics* 2 (2010).
- [8] Anusha Mishra et al. « Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. » In: *Nat. Neurosci.* 19.12 (2016), pp. 1619–1627. ISSN: 1097-6256.
- [9] V Nehls and D Drenckhahn. « Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. » In: *JCB* 113.1 (1991), pp. 147–154. ISSN: 0021-9525.

- [10] Roger Grant et al. « Organizational hierarchy and structural diversity of microvascular pericytes in adult mouse cortex ». In: *J Cereb Blood Flow Metabolism* 39.3 (2017), pp. 411–425. ISSN: 0271-678X.
- [11] Annika Armulik, Guillem Genové and Christer Betsholtz. « Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. » In: *Dev. Cell* 21.2 (2011), pp. 193–215. ISSN: 1534-5807.
- [12] Akhilesh Kumar et al. « Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts ». In: *Cell Reports* 19.9 (2017), pp. 1902–1916. ISSN: 2211-1247.
- [13] Valeria V Orlova et al. « Functionality of Endothelial Cells and Pericytes From Human Pluripotent Stem Cells Demonstrated in Cultured Vascular Plexus and Zebrafish Xenografts ». In: *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Biology* 34.1 (2014), pp. 177–186. ISSN: 1079-5642.
- [14] Richard O Hynes. « The extracellular matrix: not just pretty fibrils ». In: *Science* 326.5957 (2009), pp. 1216–1219.
- [15] Fiona M Watt and Wilhelm TS Huck. « Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. » In: *Nature Reviews* 14.8 (2013), pp. 467–73. ISSN: 1471-0072.
- [16] Christian Frantz, Kathleen M Stewart and Valerie M Weaver. « The extracellular matrix at a glance. » In: *J. Cell. Sci.* 123.Pt 24 (2010), pp. 4195–200. ISSN: 0021-9533.
- [17] Annika Armulik, Alexandra Abramsson and Christer Betsholtz. « Endothelial-pericyte interactions. » In: *Circ. Res.* 97.6 (2005), pp. 512–23. ISSN: 0009-7330.
- [18] Raghu Kalluri. « Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis ». In: *Nature Reviews Cancer* 3.6 (2003), pp. 422–433. ISSN: 1474-175X.
- [19] Rupert Hallmann et al. « Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature ». In: *Physiol Rev.* 85.3 (2005), pp. 979–1000. ISSN: 0031-9333.
- [20] PJ Courtoy and J Boyles. « Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. » In: *J. Ultrastruct. Res.* 83.3 (1983), pp. 258–73. ISSN: 0022-5320.

## BIBLIOGRAPHY

---

- [21] Willi Halfter et al. « The bi-functional organization of human basement membranes. » In: *PLoS ONE* 8.7 (2013), e67660. ISSN: 1932-6203.
- [22] Ethan A Winkler, Robert D Bell and Berislav V Zlokovic. « Central nervous system pericytes in health and disease ». In: *Nature Neuroscience* 14.11 (2011), pp. 1398–1405. ISSN: 1097-6256.
- [23] Marion Ghibaudo et al. « Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions ». In: 4.9 (2008), pp. 1836–1843. ISSN: 1744-683X.
- [24] Sangyoon J Han et al. « Decoupling substrate stiffness, spread area, and micropost density: a close spatial relationship between traction forces and focal adhesions. » In: *Biophys. J.* 103.4 (2012), pp. 640–8. ISSN: 0006-3495.
- [25] Hedde van Hoorn et al. « The Nanoscale Architecture of Force-Bearing Focal Adhesions ». In: *Nano letters* 14 (2014), pp. 4257–4262.
- [26] Takayuki Okamoto et al. « Gap junction-mediated regulation of endothelial cellular stiffness ». In: *Sci Reports* 7.1 (2017), p. 6134. ISSN: 2045-2322.
- [27] Zhongkui Hong et al. « Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness and Adhesion to Collagen I Modified by Vasoactive Agonists ». In: *Plos One* 10.3 (2015), e0119533.
- [28] Jérôme M Goffin et al. « Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of  $\alpha$ -smooth muscle actin to stress fibers ». In: *JCB* 172.2 (2006). ISSN: 0021-9525.
- [29] Nilesh P Talele et al. « Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells ». In: 4.6 (2015), pp. 1016–1030. ISSN: 2213-6711.



---

## SAMENVATTING

---

Pericyten, de wandcellen van bloedmicrovaten, werden voor het eerst beschreven in 1873 door de Franse wetenschapper Charles-Marie Benjamin Rouget als een subset van contractiele cellen rondom microvaten [1]. In 1923 introduceerde Zimmerman een nieuwe term “pericyten” om aan te sluiten bij hun ligging dicht bij de endotheelcellen die vaatbuizen vormen [2]. Pericyten bedekken de meerderheid van alle haarvaten en zijn in de loop der jaren naar voren gekomen als belangrijke regulatoren van vasculaire morfogenese en functie. Ondanks uitgebreide studies zijn er nog belangrijke onopgeloste vragen in verband met de mechanobiologie van pericyten [3], waarvan één van de meest intrigerende de controle van de vasculaire bloedstroom is [4–8].

Momenteel kan het mechanische gedrag van pericyten, hoewel van groot belang voor hun biologische functie, alleen worden afgeleid uit (post mortem) beeldvorming. De belangrijkste reden voor dit gebrek aan toegankelijkheid is de moeilijkheid om homogene cellen van primaire mid-capillaire pericyten te genereren, aangezien ze verschillen in fenotype en expressie van eiwitten vertonen die afhankelijk zijn van hun locatie op de capillaire boom, en zij geen unieke markers hebben [2, 9, 10]. Daarnaast bevinden zich “echte” of “goedgekeurde” pericyten op midden-capillairen welke de meest duidelijke verschillen met gladde spiercellen vertonen [9, 11]. Pericyten op pre- of post-capillairen zijn gedefinieerd als “transitionele” pericyten [2]. Het genereren van een celcultuur van “echte”, midden-capillaire, primaire pericyten die geen expressie van  $\alpha$ -gladde spier actine ( $\alpha$ -SMA) vertonen en angiogenese ondersteunen is dus vrij-wel onmogelijk. Ter bevestiging, er zijn geen dergelijke, in de handel verkrijgbare, primaire pericyten te koop. *In vivo* experimenten missen de mate van controle over de experimentele omstandigheden en ondersteunen geen directe celkrachtmetingen, in tegenstelling tot *in vitro* studies.

## Samenvatting

---

In dit proefschrift is een poging gedaan om grenzen te verleggen en benaderingen te ontwikkelen om de mechanobiologie van pericyten *in vitro* te bestuderen. Ten eerste, door gebruik te maken van menselijke geïnduceerd pluripotente stamcellen-afgeleide pericyten die lijken op “echte” pericyten in middencapillairen. Deze zijn gekenmerkt door het ontbreken van  $\alpha$ -SMA en het ondersteunen van angiogenese [12, 13]. Pericyten hebben een ingewikkelde biochemische en ruimtelijke organisatie van extracellulaire matrix eiwitten op de haarvaten, gecombineerd met veranderende stijfheid, bij veranderingen in de bloeddruk. Deze factoren hebben over het algemeen gevolgen voor het gedrag van de cellen en pericyten vormen daarop geen uitzondering [14–16]. Het is belangrijk om al deze factoren te combineren om de celmicro-omgeving nauwkeurig *in vitro* na te bootsen. In **hoofdstuk 2** is de bestaande kennis over de structuur en eigenschappen van de extracellulaire matrix van pericyten gebruikt om de meest geschikte methoden te identificeren de mechanische micro-omgeving van pericyten *in vitro* na te bootsen. Die ontwikkeling biedt nieuwe mogelijkheden om hun mechanobiologie te bestuderen.

Pericyten zijn ingebed in het capillaire basaalmembraan dat bestaat uit de drie hoofdbestanddelen – collageen IV, laminine-411/511 en fibronectine – die door cellen kunnen worden gebruikt voor hechting in de capillaire wand [17–20]. Recente bevindingen toonden aan dat laminine en type IV collageen niet georganiseerd zijn in één homogeen netwerk, maar twee lagen vormen, waardoor fibroblasten aan de ene kant kunnen interacteren met collageen en endotheelcellen aan de andere kant van het basaalmembraan met laminine [21]. Pericyten bleken zich “onder” de collageenlaag dicht bij endotheelcellen te bevinden met een dunne lamininerijke laag in de pericyte-endotheelcel interstitia. Bovendien bleek met elektronenmicroscopie dat deze lamininelaag kleine eilanden van fibronectine bevat [17, 20, 22]. Terwijl endotheelcellen zich voornamelijk hechten aan laminine, is dit voor pericyten onbekend. Het *in vitro* model van de basaalmembraan in de pericyte-endotheliale celinterstitia van het midden-capillaire gebied dat ik heb ontwikkeld, maakte het mogelijk in **hoofdstuk 3** aan te tonen dat pericyten fibronectine prefereren boven laminine. Dit wijst op een mogelijke rol van deze fibronectine-afzettingen als voornaamste verankeringspunten voor de mechanische hechting van pericyten aan haarvaten. Deze rol werd oorspronkelijk voorgesteld door Courtoy in 1983. Ik heb deze hypothese nu met een *in vitro* experiment kunnen bevestigen, met behulp van de recente vooruitgang in de

modellering van de extracellulaire matrix.

Ik heb verder aangetoond dat pericyten reageren op een variatie in fibronectine patroonstijfheid met veranderingen in kracht, spreiding en cel-matrix adhesie. Dit gebeurt op een niet lineaire wijze zoals bijvoorbeeld in menselijke of muizenfibroblasten waar de cellulaire trekkrachten samen met de cel spreiding en de grootte van cel-matrix adhesie structuren geleidelijk toenemen met toenemende substraatstijfheid [23–25]. Pericyten vertonen optimale spreiding en cel-matrix adhesie grootte op intermediaire substraatstijfheid. De door pericyten uitgeoefende krachten zijn juist omgekeerd lager op intermediaire substraatstijfheid en hoger op heel zachte en heel stijve substraten. Het stijfheidsbereik dat optimale pericytenspreiding ondersteunt, bleek dicht bij dat voor endothelcellen en gladde spiercellen te liggen [26, 27]. Dit wijst erop dat het gevonden stijfheidsbereik een respons in een fysiologisch relevant stijfheidsregime vertegenwoordigt. Het in deze studie waargenomen gedrag van pericyten geeft inzicht in de manier waarop pericyten afwijkingen van de stijfheid van de microvaten onderscheiden van het normale weefsel, hoe zij reageren door de contractiele krachten te verhogen om een mechanische ondersteuning te bieden aan de wanden van de microvaten, waardoor overmatige dilatatie wordt voorkomen.

Zoals hierboven vermeld zijn pericyten, afhankelijk van de locatie langs de microvasculaire boom, onderverdeeld in drie subgroepen: pre-capillaire, midden-capillaire en post-capillaire pericyten. Mid-capillaire pericyten missen volledig  $\alpha$ -SMA, terwijl pre- en post-capillaire pericyten een gradiënt vertonen in de  $\alpha$ -SMA expressie van laag, naast mid-capillairen, naar hoog bij arteriolen en venulen waar gladde spiercellen aanwezig zijn [5, 9, 10]. Uit het *in vivo* en *in vitro* onderzoek aan pericyten en andere celtypes blijkt dat de expressie van  $\alpha$ -SMA grotendeels wordt beïnvloed door oplosbare factoren, maar ook door mechanische prikkels zoals de stijfheid van het substraat en de extracellulaire matrix. Aangezien de verandering van de volgorde van de capillairen gepaard gaat met veranderingen in diameter, inwendige bloeddruk, dikte van het basaalmembraan en eiwitsamenstelling, ervaren pericyten verschillende mechanische signalen op verschillende delen van de microvasculaire boom. Dit kan invloed hebben op de expressie van  $\alpha$ -SMA dat leidt tot contractiliteit. Eerdere bevindingen wezen al op een bijzondere rol van de mechanische eigenschappen van de extracellulaire matrix bij de regulering van  $\alpha$ -SMA in myofibroblasten [28] en in mesenchymale stamcellen

## Samenvatting

---

[29]. Of en hoe deze factoren bij elkaar genomen de expressiegradiënt van  $\alpha$ -SMA in pericyten in de rustende vasculatuur conditioneren blijft onduidelijk.

In **hoofdstuk 4** werd onze *in vitro* benadering van de mechanobiologie van pericyten gebruikt om te onderzoeken of parameters als vaatdiameter, basaal membraansamenstelling en stijfheid een effect kunnen hebben op de rekrutering van  $\alpha$ -SMA in spanningsvezels in pericyten. Met behulp van beeldanalyse werden gegevens verkregen over de vorming van  $\alpha$ -SMA-vezels met een resolutie van één cel. Er werd geconstateerd dat pericyten die op fibronectinestippen omgeven door laminine groeiden, een lager percentage rekrutering van  $\alpha$ -SMA aan spanningsvezels vertoonden dan pericyten die op een monolaag van fibronectine groeiden. Het eerste patroon lijkt op de eiwitorganisatie in de interstitia tussen pericyten en endotheelcellen in het midden van de haarvaten, terwijl het tweede patroon meer voorkomt in arteriole- en venulegebieden van een microvasculatuur boom. Deze gegevens suggereren een remmend effect van het fibronectine dat in patches in het capillaire basaalmembraan is georganiseerd op de rekrutering van  $\alpha$ -SMA aan het F-actine cytoskelet van pericyten. Ook vertoonden pericyten weinig tot geen correlatie tussen de rekrutering van  $\alpha$ -SMA en de stijfheid of vaatdiameter in aanwezigheid van fibronectine, georganiseerd in een stippelpatroon. Daarentegen behielden menselijke gladde spiercellen het vermogen om  $\alpha$ -SMA-vezels te vormen op een dergelijk patroon en reageerden zij op de afwijkende stijfheid en het beschikbare gebied voor verspreiding met verschillende  $\alpha$ -SMA-rekrutering snelheden, die echter hoger waren dan bij pericyten. Deze gegevens tonen aan dat na volledige rijping van pericyten tot gladde spiercellen zij het vermogen verliezen om het expressieniveau van  $\alpha$ -SMA aan te passen in reactie op de fibronectine organisatie in het basaalmembraan en in plaats daarvan meer afhankelijk worden van de stijfheid en de diameter van het bloedvat. Deze bevindingen kunnen verder helpen bij het onderzoeken van de processen achter het handhaven van de  $\alpha$ -SMA expressiegradiënt in pericyten en kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat zij in celkweek een contractiel fenotype krijgen.

De contractiliteit van pericyten is, ondanks enkele tegenstrijdige resultaten, gerapporteerd als betrokken bij de regulering van de cerebrale bloedstroom en bij hersenschade na ischemie bij muizen *in vivo* [4, 5, 8]. Toch is er geen direct bewijs in termen van directe mechanistische metingen. In **hoofdstuk 5** werd een nieuwe benadering ontworpen en

gekaracteriseerd die het mogelijk maakt om voortdurend de krachten van cellen te monitoren tijdens een snelle uitwisseling van celkweekmedia om cellen bloot te stellen aan verschillende omgevingscondities zoals: de temperatuur, de samenstelling van het celkweekmedium en de zuurstofconcentratie. Met deze aanpak kan het gedrag van pericyten tijdens hypoxie en ischemie worden bestudeerd. De techniek kan ook worden toegepast op alle andere cellen waarvoor de omgevingsomstandigheden moeten worden gewijzigd en waarbij reacties in celkrachttoepassing en morfologie worden gevolgd.

Samengevat, de in dit proefschrift ontwikkelde methodes en benaderingen om het gedrag van pericyten *in vitro* te bestuderen, en de verkregen resultaten, scheppen nieuwe mogelijkheden om de mechanobiologie van pericyten te onderzoeken en inzicht, begrip en bewijs te leveren voor processen die in *in vivo* experimenten onmogelijk waren.