



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Regulation of arteriogenesis: Mechanistic studies and options for therapeutic intervention**

Bastiaansen, A.J.N.M.

### **Citation**

Bastiaansen, A. J. N. M. (2017, February 9). *Regulation of arteriogenesis: Mechanistic studies and options for therapeutic intervention*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45817>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45817>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45817> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Bastiaansen, A.J.N.M.

**Title:** Regulation of arteriogenesis: Mechanistic studies and options for therapeutic intervention

**Issue Date:** 2017-02-09

---

Nederlandse samenvatting



De huidige invasieve therapeutische mogelijkheden om perifeer arterieel vaatlijden (PAV) te behandelen bestaan uit percutane transluminale angioplastiek, thrombolysie, thrombectomie of bypass chirurgie. Patiënten met kritieke ischemie van de onderste extremiteit hebben een slechte prognose; na 5 jaar is slechts 45% in leven met twee benen. Patiënten die niet geschikt worden bevonden voor een chirurgische of endovasculaire behandeling of waarbij een chirurgische reconstructie niet is geslaagd, hebben vaak geen ander alternatief dan amputatie van het aangedane ledemaat. Voor deze patiëntenpopulatie is het noodzakelijk dat er naar alternatieve therapeutische opties wordt gezocht.

Het bevorderen van de bloeddorstrooming naar ischemische weefsels wordt gezien als een veelbelovend therapeutisch alternatief voor de huidige invasieve chirurgische ingrepen en wordt aangeduid als therapeutische neovascularisatie. Hoewel hiermee het stimuleren van zowel angiogenese als arteriogenese wordt aangeduid, bijvoorbeeld door middel van cel-, gen- of groeifactortherapie, is therapeutische arteriogenese waarschijnlijk het klinisch meest relevante mechanisme. Tijdens arteriogenese remodeleren pre-existente arteriolen zich namelijk in grotere collaterale arteriën met meer capaciteit dan de kleine capillairen die gevormd worden tijdens angiogenese. In dit proefschrift worden nieuwe therapeutische strategieën bestudeerd voor PAV patiënten zonder therapeutische opties, zowel door te zoeken naar nieuwe mogelijkheden om neovascularisatie te stimuleren als door het verkrijgen van meer mechanistisch inzicht in de complexe processen die aan neovascularisatie ten grondslag liggen. Dit proefschrift omvat verschillende preklinische studies die bijdragen aan onze kennis over therapeutische neovascularisatie en richt zich voornamelijk op arteriogenese vanwege het grotere potentieel om zuurstoftransport naar aangedane weefsels te bevorderen.

In **hoofdstuk 2** werd een aantal verschillende chirurgische mogelijkheden beschreven voor het toebrengen van achterpootischemie in een muismodel. We beschreven een praktisch en reproduceerbaar muismodel om PAV te bestuderen. Het chirurgisch doornemen van de arteria femoralis op twee niveaus is een betere vergelijking met de multilevel atherosclerotische occlusies in patiënten met PAV en maakt het mogelijk om arteriogenese in de adductoren spiergroep en angiogenese in de ischemische kuitspieren te onderzoeken. Resultaten werden verkregen door het analyseren van zowel anatomische informatie van post-mortem angiografie en CT-scans, als functionele metingen door het gebruik van laser Doppler perfusion imaging (LDPI) waarbij de bloeddorstrooming ter hoogte van de voet werd gemeten.

Eén van de belangrijkste bezwaren tegen het achterpootischemie model in de muis is het snelle herstel van de bloeddorstrooming na een enkele occlusie, waaronder wordt verstaan het doornemen van de arteria femoralis op slechts één niveau. Door het snelle herstel van de bloeddorstrooming is het technisch bijna onmogelijk om factoren te testen die, hypothetisch gezien, neovascularisatie zouden moeten bevorderen. Door

op meerdere niveaus de arteria femoralis door te nemen wordt de tijd tot volledig herstel lang genoeg om van deze stimulerende factoren een effect te kunnen meten. Het enkele occlusie model is geschikt om factoren te testen die neovascularisatie remmen of als model in muisstammen die ernstige ischemie niet tolereren.

Wij concludeerden dat, in onze handen, het op meerdere niveaus occluderen van de arteria femoralis het meest geschikte model is om therapeutische interventies in arteriogenese te bestuderen.

In **hoofdstuk 3** werd whole-genome expression profiling gebruikt om meer mechanistisch inzicht te verkrijgen in arteriogenese en om nieuwe potentiële therapeutische targets te identificeren. Het is reeds bekend dat de omvang van het pre-existente collaterale vaatbed sterk varieert tussen verschillende muisstammen en wij maakten gebruik van muizenstammen die absolute tegenhangers zijn in arteriogenese, namelijk de snel herstellende C57BL/6 en zeer langzaam herstellende BALB/c stam. Genexpressie werd gemeten op verschillende momenten na het toebrengen van achterpootischemie om nieuwe pathways te identificeren die essentieel zijn voor een adequate arteriogenese. De groep genen die in de vroege fase van arteriogenese tot expressie komt was grotendeels vergelijkbaar tussen beide stammen, maar in vergelijking tot C57BL/6 muizen was de respons in BALB/c overdreven, vertraagd en verlengd. Aangezien arteriogenese voor een belangrijk deel een inflammatoir proces is, hebben we ons voornamelijk gericht op de grote verschillen tussen C57BL/6 en BALB/c in de expressie van inflammatoire genen. Omdat het grootste deel van de bekende pro-inflammatoire en pro-arteriogene genen sterker tot expressie kwam in BALB/c, hebben wij ons geconcentreerd op dat kleine deel van de inflammatoire genen dat alleen sterker tot expressie kwam in de C57BL/6, namelijk chemokines CCL19 en CCL21. CCL19 en CCL21 zijn samen met de gemeenschappelijke receptor CCR7 betrokken bij de migratie en homing van dendritische cellen en ook van T-lymfocyten, waarvan de essentiële rol tijdens arteriogenese reeds uitgebreid bekend is. We toonden niet alleen het verschil in expressie tussen C57BL/6 en BALB/c aan, maar identificeerden ook de CCL19/CCL21-CCR7 as als een belangrijk onderdeel van adequate arteriogenese. CCR7<sup>-/-</sup> muizen, gekruist op een C57BL/6/LDLR<sup>-/-</sup> achtergrond, toonden na het toebrengen van achterpootischemie een verminderd herstel van bloeddorstrooming en verminderde remodelering van collateralen, waarschijnlijk door de retentie van CCR7<sup>+</sup> T-lymfocyten ter plaatse van de remodelerende collateralen.

Wij concludeerden dat whole-genome expression analyse in BALB/c en C57BL/6 muizen een bruikbaar middel is om arteriogenese te bestuderen en dat de hieruit geselecteerde targets (CCL19/CCL21 – CCR7 as) essentieel zijn voor adequate arteriogenese.

In **hoofdstuk 4** onderzochten we de mogelijke therapeutische rol van RP105, een specifieke remmer van TLR4-gemedieerde inflammatoire reactie. In eerdere studies

(zie ook **hoofdstuk 3**) hebben we reeds aangetoond dat de expressie van TLR4 sterk toeneemt tijdens arteriogenese. Het was al beschreven dat arteriogenese in TLR4<sup>-/-</sup> muizen sterk verminderd is en wij bevestigden andere studies waarbij arteriogenese werd gestimuleerd door toediening van de exogene TLR4 ligand LPS. De expressie van RP105 is grotendeels beperkt tot immuuncellen en wordt in verband gebracht met verschillende inflammatoire aandoeningen, zoals cardiovasculaire ziekte. RP105 is daardoor een interessant target om te onderzoeken in relatie tot arteriogenese. Wij toonden aan dat de expressie van RP105 overeenkomt met de expressie van TLR4 en dat RP105<sup>+</sup>/MOMA-2<sup>+</sup> cellen in een vroeg stadium van arteriogenese migreren naar de perivasculaire ruimte rondom collateralen. Dit impliceert een belangrijke rol voor RP105<sup>+</sup> monocyt en/of macrofagen tijdens arteriogenese. Echter, de toegenomen pro-inflammatoire NF-κB-gemedieerde gen transcriptie in RP105<sup>-/-</sup> muizen resulteerde niet in een verbeterende bloeddorstrooming na het toebrengen van achterpootischemie. Omdat er geen verschil werd aangetoond in aantal pre-existente collateralen tussen RP105<sup>-/-</sup> en wild type muizen, werd geconcludeerd dat de verminderde bloeddorstrooming in RP105<sup>-/-</sup> muizen het gevolg was van verminderde arteriogenese. De RP105<sup>-/-</sup> stam werd bevestigd een krachtig pro-inflammatoir fenotype te bezitten, ondanks dat andere TLR4-remmers (SIGIRR en ST2) in deze stam sterker tot expressie kwamen na het toebrengen van achterpootischemie. Omdat het pro-inflammatoire Ly6C<sup>hi</sup> monocyt subtype gevoelig is voor TLR stimulatie, TNFα overwegend door dit subtype wordt geproduceerd en Ly6C<sup>hi</sup> monocyt eerder beschreven zijn als stimulator van post-ischemische vaatgroei, werd deze studie toegespitst op de activatie van deze specifieke groep monocyt. De rekrutering van de pro-inflammatoire Ly6C<sup>hi</sup> monocyt in RP105<sup>-/-</sup> muizen werd beïnvloed door een verhoogde activatie van dit subtype en resulteerde in een accumulatie in beenmerg en milt en een afname van Ly6C<sup>hi</sup> monocyt in de ischemische achterpoot. Deze gegevens suggereerden dat RP105, bij normale expressie, de rekrutering en migratie van monocyt reguleert tussen de opslagreservoirs en de aangedane weefsels. Daarnaast resulteerde *in vitro* RP105 deficiëntie in verminderde monocyt migratie en in een verminderde mRNA expressie van verschillende moleculen die betrokken zijn bij monocyt migratie.

Wij concludeerden dat de verwachte regeneratieve respons in RP105<sup>-/-</sup> muizen onverwacht verminderd was na toebrengen van achterpootischemie. De toegenomen activatie van Ly6C<sup>hi</sup> monocyt in RP105<sup>-/-</sup> muizen, voor en na achterpootischemie, is ondoelmatig en beïnvloedt de migratie van monocyt die nodig is voor een effectieve neovascularisatie op een negatieve manier. Omdat monocyt tot de eerste cellen behoren die migreren naar de perivasculaire ruimte van collateralen en de arteriële remodelering initiëren, kan het verminderde herstel van de bloeddorstrooming worden verklaard door een verminderde rekrutering van monocyt.

Behalve dat TLR4 wordt bestudeerd voor de positieve rol in arteriogenese worden TLR4-remmers ook getest om een excessieve immuunrespons, bijvoorbeeld tijdens sepsis, te temperen om vergaande weefselschade te voorkomen. Hierdoor is discussie ontstaan of TLR4-remming onverwachte bijwerkingen heeft en schadelijk zou kunnen zijn, in het bijzonder voor patiënten die lijden aan ernstig perifere arterieel vaatlijden. Tot op heden was het onduidelijk of medicamenteuze TLR4-remming dezelfde nadelige effecten heeft op arteriogenese als bijvoorbeeld een genetische TLR4 deficiëntie. In **hoofdstuk 5** onderzochten we de effecten van TAK-242, een medicamenteuze TLR4-remmer, op de *in vitro* en *in vivo* inflammatoire respons en op het herstel van de bloeddoodstroming na het toebrengen van achterpootischemie. In zowel muis als humaan *ex vivo* volbloed stimulatie remt TAK-242 de LPS-geïnduceerde TNF $\alpha$  productie. *Ex vivo* remt TAK-242 specifiek de monocyt activatie in humaan bloed en *in vivo* remt TAK-242 de LPS-geïnduceerde TNF $\alpha$  productie in muizen. Dit effect is meer uitgesproken na intramusculaire TAK-242 injectie dan na langzame subcutane toediening via osmotische mini-pumps. Ondanks dat we hebben aangetoond dat TAK-242 biologisch actief is, werd er geen verschil gevonden tussen TAK-242 en PBS in het herstel van de bloeddoodstroming na achterpootischemie in muizen. Zowel intramusculaire als continue subcutane toediening van TAK-242 resulteerde niet in een verminderd herstel na achterpootischemie.

We concludeerden dat het herstel van de bloeddoodstroming na achterpootischemie in muizen niet negatief beïnvloed wordt door de toediening van TLR4-antagonist TAK-242.

In **hoofdstuk 6** toonden we aan dat PCAF essentieel is voor een adequate arteriogenese. PCAF acetyleert histonen H3 en H4, maar reguleert ook de non-histon proteïnen, zoals hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ ) en Notch, welke essentieel is voor NF- $\kappa$ B-gemedieerde gentranscriptie en faciliteert de toename van inflammatoire genregulatie. Bovendien werd eerder aangetoond dat een variatie in de promotor regio van PCAF is geassocieerd met cardiovasculair-gerelateerde mortaliteit. Ook hebben we eerder laten zien dat PCAF betrokken is bij de vasculaire remodelering in een muis model voor reactieve stenose (nog niet gepubliceerde resultaten). Omdat inmiddels uitgebreid bekend is dat arteriogenese het resultaat is van een gecoördineerd inflammatoir en immuun-gemoduleerd proces, onderzochten we de relatie tussen PCAF en arteriogenese. We toonden aan dat PCAF een essentiële rol heeft tijdens arteriogenese door gebruik te maken van zowel PCAF<sup>-/-</sup> muizen als de natuurlijke PCAF-remmer Garcinol in wild type muizen. In beide experimenten resulteerden suppressie van PCAF in een verminderd herstel van de bloeddoodstroming na achterpootischemie. Dit effect was sterker in PCAF<sup>-/-</sup> muizen dan in de met Garcinol behandelde wild type muizen en werd deels verklaard door een verminderd pre-existent collateraal vaatbed in de PCAF knock-outs. We konden bevestigen dat PCAF<sup>-/-</sup> muizen een verminderd



inflammatoir fenotype hebben dan wild type muizen. Daarnaast resulteerde de enkele deletie van PCAF in onze knock-out muisstam in 3505 genen die verschillend werden gereguleerd. Dat bleken voor een belangrijk deel genen die betrokken zijn bij arteriogenese en pro-inflammatoire processen. Tot deze groep genen behoorde bijvoorbeeld MMPg, essentieel voor effectieve arteriogenese vanwege de rol bij de degradatie en remodelering van de extracellulaire matrix, waardoor cel migratie en outward expansion van collateralen mogelijk wordt. Daarnaast resulteerde PCAF deficiëntie ook in een verminderde rekrutering van cellen die essentieel zijn voor arteriogenese, zoals T-lymfocyten (voornamelijk geactiveerde CD4<sup>+</sup> T-lymfocyten), natural killer cellen en regulatory T-lymfocyten. Daarnaast had PCAF ook effect op cellen die nog niet zijn beschreven betrokken te zijn bij arteriogenese, zoals B-lymfocyten en dendritische cellen. Opmerkelijk was dat de populatie van bijna elk leukocyt subtype was toegenomen in het beenmerg van PCAF<sup>-/-</sup> muizen. Dit impliceerde dat PCAF deficiëntie interfereert met de rekrutering van pro-arteriogene cellen uit de leukocyten reservoirs. Tevens kwamen genen die coderen voor belangrijke leukocyten-chemoattractants verminderd tot expressie in PCAF<sup>-/-</sup> muizen, zoals CXCL12 en CCLg. *In vivo* resulteerde PCAF deficiëntie inderdaad in een verminderd aantal monocyten in de perivasculaire ruimte van collateralen.

Wij concludeerden dat PCAF verregaande effecten heeft op inflammatoire processen en essentieel is voor effectieve arteriogenese.

De vorige hoofdstukken benadrukten de multifactoriële processen tijdens effectieve arteriogenese. In **hoofdstuk 7** onderzochten we het master switch potentieel van microRNA (miRs), kleine niet-coderende endogene enkelstrengs RNA moleculen. MiRs verminderen de expressie van target genen en beïnvloeden theoretisch de expressie van honderden genen tegelijk. Hierdoor kan de regulatie van een enkele miR multifactoriële fysiologische processen, zoals arteriogenese, veranderen. Om nieuwe miRs te identificeren hebben we gebruik gemaakt van innovatieve methoden. Ten eerste gebruikten we "reverse target prediction" (RTP) om miRs te identificeren die meerdere genen reguleren tijdens neovascularisatie. Vervolgens hebben we een tweede RTP uitgevoerd op genen waarvan de expressie is toegenomen in de eerste fase van neovascularisatie. Deze groep genen werd eerder geïdentificeerd in de whole-genome mRNA expression analyse zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Ten derde brachten we de miR regulatie tijdens neovascularisatie in kaart door een micro-array miR expressie analyse te verrichten op exact diezelfde weefsels. In de RTPs vonden we een verrijking van "predicted binding sites" van miRs uit een specifiek miR gencluster (14q32). Dit waren tevens miRs waarvan de expressie was toegenomen tijdens effectieve arteriogenese. Uit dit cluster hebben we verschillende miRs geselecteerd, afhankelijk van het expressieprofiel tijdens arteriogenese, namelijk miR-494 (vroeg responder), miR-329 (late responder) en miR-495 (non-responder). Alhoewel mir-487b in geen van beide RTPs

werd geïdentificeerd werd deze toch geselecteerd voor verder onderzoek, omdat miR-487b tot de meest gereguleerde miRs van dit cluster behoorde en al eerder was beschreven als een belangrijke regulator van outward remodelering van de aorta. Alle vier miRs kwamen sterk tot expressie in spier van vasculair weefsel van gezonde C57BL/6 muizen. Voor onze studies gebruiken we nieuwe miR-remmers, namelijk "gene silencing oligonucleotides" (GSOs). GSOs bleken even efficiënt in de remming van target miRs, maar met significant minder cytotoxiciteit in vergelijking tot de vaker gebruikte antagomirs. Daarnaast konden we een effectieve en verlengde biodistributie van de GSOs aantonen in de weefsels. Na het toebrengen van achterpootischemie resulteerde alle vier GSOs in een drastische toename van de bloeddorstrooming in de achterpoot, van het aantal en grootte van de collateralen in de adductoren spiergroep en van het aantal CD31<sup>+</sup> vaten in de kuitspier. We konden bevestigen dat er na toediening van de GSOs een upregulatie plaats vond van veronderstelde target genen, behalve voor miR-495. Aorta ring assays toonden een toename van vaatnieuwvorming na remming van de geselecteerde miRs en alle GSOs stimuleerden endotheelcelproliferatie, behalve GSO-494. Opvallend was dat alleen remming van miR-494 resulteerde in een toegenomen celproliferatie van myofibroblasten en muizen waarbij GSO-494 werd toegediend toonden het grootste aantal macrofagen rond de remodelerende collateralen. Geen van de GSOs induceerde de proliferatie van gladde spiercellen.

We concludeerden dat het 14q32 microRNA cluster zeer nauw betrokken is bij neovascularisatie en dat het remmen van specifieke leden van de dit cluster (miR-329, miR-487b, miR-494 en miR-495) een interessante nieuwe strategie kan zijn om therapeutische neovascularisatie te stimuleren.

Concluderend, de studies in dit proefschrift omvatten een preklinisch muismodel om neovascularisatie *in vivo* te kunnen bestuderen en een aantal potentiële nieuwe targets om therapeutische neovascularisatie te stimuleren. Dit proefschrift draagt bij aan een beter inzicht in de processen die ten grondslag liggen aan post-ischemische neovascularisatie en biedt nieuwe therapeutische perspectieven voor de huidige behandelstrategie van patiënten met kritieke ischemie van een extremitet. Of beperkte bloeddorstrooming na een arteriële occlusie het gevolg is van een beperkt pre-existent collateraal vaatbed of van een verminderde collaterale remodelering, we zijn nu dichterbij een patiënt specifieke behandeling voor perifeer arterieel vaatlijden.



