



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Intraplaque angiogenesis and therapeutic targeting of angiogenesis

Parma, L.

Citation

Parma, L. (2020, October 15). *Intraplaque angiogenesis and therapeutic targeting of angiogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137747>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/137747>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137747> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Parma, L.

Title: Intraplaque angiogenesis and therapeutic targeting of angiogenesis

Issue date: 2020-10-15

Appendices

Nederlandse samenvatting

Riassunto in Italiano

List of publications

Curriculum Vitae

Acknowledgements

Nederlandse Samenvatting

Atherosclerose is een progressieve ziekte die wordt gekenmerkt door de vorming van plaques in de intima van grote slagaders met ophoping van lipiden, ontstekingscellen, fibrose, en verkalking. De stabiliteit van atherosclerotische plaques, eerder dan de grootte, is de belangrijkste determinant voor acute klinische implicaties. Wanneer een plaque onstabiel wordt, is de kans groter dat deze scheurt, wat leidt tot een myocardinfarct of een beroerte en een plotselinge dood. Kenmerken van onstabiele plaques zijn intraplaque angiogenese en bloeding, een grote lipidenkern, een hoog macrofaaggehalte en een dunne afdekkende kap. In de loop der jaren zijn de levensduur en het welzijn van patiënten door cholesterolverlagende middelen aanzienlijk verbeterd. Een grote groep patiënten heeft echter niet ten volle profijt van de huidige lipidenverlagende strategieën en de plaqueruptuur blijft de belangrijkste oorzaak van acute cardiovasculaire aandoeningen. Daarom is er behoefte aan nieuwe therapeutische doelwitten om atherosclerotische plaques te stabiliseren en plaqueruptuur te voorkomen.

Intraplaque angiogenese is een complex proces dat afhankelijk is van het evenwicht tussen verschillende pro- en anti-angiogenese factoren. Bronnen van pro-angiogenese signalen zijn hypoxie en ontsteking. Aan de ene kant is hypoxie verantwoordelijk voor de transcriptie van factoren die angiogenese bevorderen, zoals VEGF-A, in een poging om nieuwe vaten te creëren om de zuurstofniveaus in de plaque te herstellen. Aan de andere kant is ontsteking ook een sterke oorzaak van angiogenese, omdat het de synthese van verschillende angiogenese factoren bevordert. Naast het uitlokken van angiogenese kunnen verschillende pro-angiogenese moleculen ook vaatpermeabiliteit induceren, wat bijdraagt aan de infiltratie van leukocyten in de ontstekingskern en zo een chronische ontsteking veroorzaakt. Deze factoren dragen bij aan de instabiliteit van de plaque en de daaropvolgende breuk.

Omdat intraplaque neovascularisatie een belangrijk oorzakelijk effect bleek te hebben op atherosclerose en plaque destabilisatie bij de mens, was het doel van het eerste deel van dit proefschrift om te onderzoeken of remming van intraplaque neovascularisatie een veelbelovende nieuwe therapeutische benadering zou kunnen zijn voor atherosclerotische plaquestabilisatie. In het tweede deel van dit proefschrift hebben we ons gericht op een nieuwe strategie om de *in vitro* angiogenese te verhogen.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de pathologische processen die gepaard gaan met angiogenese in atherosclerotische plaques en illustreren we hoe intraplaque angiogenese en intraplaque bloeding sterk gecorreleerd zijn met atherosclerotische plaque progressie, instabiliteit en breuk. We beschrijven ook in detail de cellulaire en moleculaire mechanismen achter intraplaque angiogenese. We rapporteren dat intraplaque hypoxie de belangrijkste drijvende kracht is achter intraplaque angiogenese die de transcriptie van pro-angiogenese genen bevordert en de ontsteking bemiddelt door het bevorderen van pro-inflammatoire cytokine productie en bijgevolg het aanwerven van inflammatoire cellen. Als belangrijke spelers in de intraplaque angiogenese beschrijven we de structuur van nieuw gevormde vaten als onvoltooid en lek als gevolg van onvolledige endotheelcel tight-junction vorming en onvoldoende en ongeorganiseerde bedekking met pericyten. Bovendien schetsen we het fenomeen van de intraplaque bloeding, bestaande uit extravasatie van rode bloedcellen en ontstekingscellen uit de lekkende nieuw gevormde vaten en de relatie met ontstekingsmediatoren, en de daaropvolgende effecten van intraplaque bloeding op de instabiliteit van de plaque, zowel in experimentele modellen als bij de mens. Bovendien worden opties besproken om de angiogenese van de plaque aan te pakken voor beeldvorming en therapeutische doeleinden.

Vanwege de rol van hypoxie als de belangrijkste trigger voor intraplaque angiogenese, hebben we in **hoofdstuk 3** de hypothese geformuleerd dat reoxygenatie van de plaque zou resulteren in verminderde intraplaque vorming van neovaten en dus minder intraplaque bloedingen en ontstekingen die leiden tot een grotere stabiliteit van de plaque. Om dit te bereiken, gebruikten we carbogen gas, een gas dat voor 95% uit O₂ en 5% uit CO₂ bestaat. Hiervoor gebruikten we hypercholesterolemische ApoE3*Leiden muizen die een adertransplantatieoperatie ondergingen en bestudeerden we het effect van plaque reoxygenatie en het resultaat daarvan op vaatwandherstructurering, intraplaque neovascularisatie, ontsteking en vaat permeabiliteit. Bovendien, aangezien langdurige blootstelling aan hoge niveaus van zuurstof (hyperoxie) risico geeft tot het genereren van reactieve zuurstofsoorten in een hoeveelheid die hoger is dan wat kan worden verwijderd door anti-oxidanten, hebben we het effect van reactieve zuurstofsoorten op de plaque omgeving *in vivo* en op gekweekte macrofagen *in vitro* onderzocht. Toediening van carbogen gas in een acute kortdurende setting resulteerde in een diepgaande reductie van

intraplaque hypoxie in murine versnelde atherosclerotische laesies *in vivo*. Langdurige behandeling met carbogen gas resulteerde in een verhoogde doorgankelijkheid van de getransplanteerde venen bij ApoE3*Leiden muizen, maar had verrassend genoeg geen effect op intraplaque hypoxie en intraplaque angiogenese en bloeding. Tegelijkertijd leidde de behandeling met carbogene gassen op lange termijn tot hyperoxie-geïnduceerde ROS-ophoping met daaropvolgend geïnduceerde productie van het HIF1a-gen en verhoogde HIF1a mRNA-niveaus en macrofaagapoptose, waarschijnlijk als gevolg van hun hoge zuurstofconsumptie. Om het bovengenoemde ROS-effect op macrofagen te bestuderen hebben we de inductie van ROS *in vitro* nagebootst door gebruik te maken van de ROS-mimische t-BHP in van muizenbotmerg afgeleide macrofagen en hebben we een sterke toename in DNA-schade en apoptose waargenomen. Over het geheel genomen heeft de behandeling, ondanks het gunstige effect van de behandeling met hyperoxygenatie op de doorgankelijkheid van de getransplanteerde venen, ook ROS-ophoping en apoptose geïnduceerd. Zowel ROS-ophoping als apoptose zullen in dit model onder de huidige omstandigheden mogelijk schadelijk zijn voor het plaque-milieu. Dit geeft aan dat om de potentiële therapeutische voordelen van hyperoxygenatietherapie te definiëren, verder onderzoek nodig is om de optimale condities voor de behandeling van atherosclerose te definiëren.

In de signaalcascade na hypoxie en Hif1a stabilisatie speelt de rekrutering van VEGF-A een cruciale rol in het bevorderen van angiogenese via binding aan de receptor VEGFR2 en het initiëren van een pro-angiogenese signaalcascade. Daarom hebben we in **hoofdstuk 4** de resultaten van VEGFR2-blokkade onderzocht met behulp van DC101, een VEGFR2-blokkerend antilichaam, op intraplaque angiogenese en ontwikkeling van de capillairen, atherosclerotische laesiegrootte en -samenstelling in versnelde atherosclerotische veneuze transplantaties in ApoE3*Leiden-muizen. Bij VEGFR2-blokkade zagen we een vermindering van de laesiegrootte in de behandelde dieren in vergelijking met de controlegroep. Tegelijkertijd werd het gehalte aan collageen en gladde spiercellen (SMC) verhoogd en het gehalte aan macrofagen verlaagd, wat wijst op een verhoogde stabiliteit van de plaque. Verrassend genoeg resulteerde de behandeling niet in een afname van CD31+ neovaatjes. Echter, als we kijken naar de ontwikkeling van de vaatjes konden we zien dat de behandelde groep een afname van de intraplaque bloeding

vertoonde in vergelijking met de controlegroep. Om dit aspect verder te onderzoeken, keken we naar de expressie van de genen die betrokken zijn bij de vaatontwikkeling en vonden we dat Ang-2, een vaatdestabiliserende factor, was afgenomen bij de DC101-behandeling. Bovendien zagen we een toename in het Cx40 mRNA niveau, betrokken bij inter-endotheelcel verbindingen, als gevolg van VEGFR2 blokkade. We gebruikten een aorta-ring assay om het effect van VEGFR2-blokkade op de vaatontwikkeling op cellulair niveau te bestuderen en vonden dat de DC101-behandeling de dekking met percyten rond de endotheelcellaag van de gevormde neovaten verhoogde. Deze studie geeft aan dat de vasculaire ontwikkeling een aantrekkelijk therapeutisch doelwit kan zijn om atherosclerotische laesies te stabiliseren. In het bijzonder VEGFR2 vertegenwoordigt een potentieel doelwit om atherosclerotische plaquestabilisatie te induceren.

Een andere belangrijke groeifactor die intraplaque angiogenese bij atherosclerose bevordert, is bFGF. In **hoofdstuk 5** bestudeerden we het effect van bFGF-blokkade op intraplaque angiogenese, SMC-gehalte en ontsteking bij versnelde atherosclerotische laesies in ApoE3* Leiden muizen die een veneuze transplantatieoperatie ondergingen. Om dit te bereiken hebben we K5 gesynthetiseerd, een klein molecuul dat bindt aan bFGF en resulteert in een bFGF-siginaalblokkade. We vonden dat K5 gemedieerde remming van bFGF de plaquestabiliteit verhoogt via een sterke vermindering van de intraplaque angiogenese en intraplaque bloeding. Ook verminderde K5 behandeling het aantal circulerende monocytten en verminderde de expressie van het adhesiemolecuul VCAM-1 en het chemoattractant eiwit Ccl2, wat samen resulteerde in een verminderd macrofaaggehalte in de atherosclerotische laesies. Eerder werd aangetoond dat bFGF-blokkade invloed heeft op SMC-proliferatie en -migratie. Verrassend genoeg konden we geen effect op SMC waarnemen in het versnelde atherosclerose veneuze transplantaatmodel of in het femorale slagader-manchetmodel, dat gebruikt wordt om het geïsoleerde effect van K5 op SMC-migratie en -proliferatie te bestuderen. We hebben ook het effect van K5 op de angiogenese nader onderzocht en we vonden dat K5 de *in vivo* angiogenese sterk verminderde in een Matrigel plug model. We hebben ook aangetoond dat K5 in staat is om de endotheel cel migratie, proliferatie en buisvorming te verminderen door een verminderde FGFR1 activering *in vitro*. K5 was in staat om de plaquestabiliteit te verbeteren via verminderde intraplaque angiogenese en verminderde intraplaque bloeding. Bovendien verminderde het de

systemische circulerende monocyten en verminderde het de infiltratie van macrofagen in de plaque en dus ook de ontsteking in de laesies. Onze resultaten tonen aan dat een K5 gemedieerde bFGF signaalblokkade een veelbelovende therapeutische kandidaat is voor de behandeling van onstabiele atherosclerotische plaques.

Het metabolisme van endotheelcellen is voornamelijk onderzocht in kanker en andere ziekten die worden gekenmerkt door een verhoogde angiogenese, zoals maculadegeneratie en inflammatoire darmziekten. Het normaliseren van de activiteit van endotheelcellen, door zich te richten op enzymen die betrokken zijn bij het metabolisme van de cel zou hun proliferatie kunnen vertragen, de endotheelverbindingen kunnen stabiliseren en de expressie van cellulaire adhesiemoleculen kunnen verminderen. Daarom bestuderen we in **hoofdstuk 6** hoe de remming van transketolase (TKT), een belangrijk metabool enzym dat betrokken is bij de pentose-fosfaatroute (PPP), de endotheel cel - en macrofaagfuncties beïnvloedt. TKT is een thiamine-afhankelijk enzym in de niet-oxidatieve tak van de PPP dat de biosynthese van nucleotiden en de energieproductie controleert. Zowel endotheel cellen als macrofagen zijn afhankelijk van deze metabole route voor cel proliferatie. Vanwege het nauwe verband tussen angiogenese en ontsteking bij atherosclerose hebben we het *in vitro* effect van TKT blokkade, met behulp van een thiamine agonist oxythiamine, op endotheel cellen en macrofagen bestudeerd. We vonden dat TKT overvloedig aanwezig is in menselijke atherosclerotische laesies, specifiek in endotheel cellen en macrofagen. TKT-blokkade resulteerde in een verminderde endotheel cel proliferatie en migratie van HUVEC *in vitro*. Interessanter is dat TKT in macrofagen met een pro-inflammatoir fenotype (M1-macrofagen) sterker geïnduceerd wordt in vergelijking tot rustende M0-macrofagen. Bij TKT blokkade werd de mRNA expressie van pro-inflammatoire en pro-angiogenese cytokinen in M1-macrofagen gereduceerd in vergelijking met onbehandelde M1-macrofagen. Verrassend genoeg vonden we dat deze reductie van pro-angiogenese moleculen een functioneel effect had. HUVEC gestimuleerd met supernatant van oxythiamine-behandelde M1-macrofagen vertoonden een verminderd migratievermogen in vergelijking met cellen gestimuleerd met supernatant van onbehandelde M1-macrofagen. Deze *in vitro* resultaten tonen aan dat ook TKT-blokkade een interessant doelwit kan zijn om angiogenese en ontsteking in atherosclerose te verminderen.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we het effect van bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) op *in vitro* angiogenese onderzocht. VEGF-A binding aan VEGFR2, induceert de activering van de receptor en de fosforylering ervan op verschillende tyrosine residuen die de initiatie van de signaalcascade activeert wat vervolgens leidt tot de bevordering van angiogenese. Elke tyrosine residuen bevordert verschillende cellulaire reacties waaronder celpermeabiliteit, proliferatie en migratie. De fosforylering van deze residuen is streng gereguleerd. In dit aspect, eiwit tyrosine fosfatases (PTP's) defosforyleren VEGFR2 receptor of de downstream-sigtaal enzymen, wat resulteert in verminderde angiogenese. In **hoofdstuk 7** onderzochten we het effect van PTP's blokkade op VEGFR2 geïnduceerde angiogenese op *in vitro* gekweekte HUVEC met behulp van BMOV, een niet-selectieve tyrosine fosfataseremmer. Op basis van onze bevinding dat HUVEC een basale hoeveelheid endogene VEGF-A produceren en dit resulteert in activering van VEGFR2 en vervolgens een lage hoeveelheid angiogenese, hebben we in dit hoofdstuk de hypothese geformuleerd dat bij endogene VEGF-A receptor activering, BMOV *in vitro* angiogenese zou verbeteren. Bovendien veronderstellen we dat exogene VEGF-A toevoeging het effect van BMOV zou versterken, wat zou resulteren in een verhoogde VEGFR2 activering en de daaropvolgende angiogenese. We vonden dat BMOV alleen de endotheelcel migratie, -proliferatie en -buisvorming sterk verhoogt. Bovendien stimuleert het de vorming van functionele neovaatjes, bekleed met endotheel cellen en bedekt met pericyten, in een ex vivo aorta-ringproef. Bovendien verhoogt het aantal van deze nieuw gevormde vaten in vergelijking met onbehandelde controlekweken. Om de moleculaire signalisatie die betrokken is bij het waargenomen effect op de angiogenese te ontrafelen, hebben we de BMOV-geïnduceerde activering van VEGFR2 in HUVEC bestudeerd. Bij BMOV-behandeling werd de fosforylering van het tyrosine residue Y951 verhoogd in vergelijking met de controlegroep en de fosforylering van het downstream-enzym p38MAPK. Interessant is dat het ERK1/2-traject niet werd geactiveerd door de BMOV-behandeling, wat aangeeft dat het fosforyleringsresidu tyrosine Y1175 niet werd gewijzigd. In de uitgevoerde *in vitro* testen vonden we dat BMOV en VEGF-A niet op een synergetische manier werken in het verhogen van de angiogenese. In feite, in de celgroei, buisvorming en aorta-ringtest resulteerde het pro-angiogeen effect van BMOV in een hoger effect dan het effect bij gelijktijdige toediening van exogene VEGF-A. Onze resultaten tonen aan

dat BMOV-gemedieerde remming van PTP's daarom een nieuwe veelbelovende strategie is om angiogenese te induceren en te stimuleren.

Conclusie

Concluderend geeft dit proefschrift meer inzicht in de rol van intraplaque angiogenese en bloeding bij atherosclerose. Bovendien identificeerden de onderzoeken in dit proefschrift nieuwe potentiële angiogene therapeutische doelen. Nader onderzoek zal uitwijzen of deze therapeutische doelen met succes kunnen worden gebruikt bij patiënten met hart- en vaatziekten.

