



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting glycolysis in endothelial cells to prevent intraplaque neovascularization and atherogenesis in mice

Perrotta, P.

Citation

Perrotta, P. (2021, March 24). *Targeting glycolysis in endothelial cells to prevent intraplaque neovascularization and atherogenesis in mice*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3152433>

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/1887/3152433>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3152433> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Perrotta, P.

Title: Targeting glycolysis in endothelial cells to prevent intraplaque neovascularization and atherogenesis in mice

Issue Date: 2021-03-24

Nederlandse samenvatting

In de afgelopen jaren heeft het metabolisme van endotheelcellen (EC's) veel aandacht getrokken en een onverwachte complexiteit van de reguleringsmechanismen blootgelegd, waardoor nieuwe mogelijke doelwitten zijn ontstaan voor een overvloed aan vaatziekten. Ondanks het feit dat EC's gemakkelijk zuurstof vanuit het bloed kunnen opnemen, is het verrassend dat ze ATP vooral via glycolyse genereren in plaats van via de Krebs-cyclus. Door te vertrouwen op het anaërobe in plaats van het aërobe metabolisme zijn EC's dus in staat om te ontkiemen in zuurstofarme omstandigheden zoals het tumormilieu. Van de verschillende enzymen die betrokken zijn bij de controle van glycolytische flux is aangetoond dat PFKFB3 (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bifosfatase 3) een cruciale rol speelt bij de proliferatie en migratie van EC's. In dit proefschrift hebben we vooral aandacht besteed aan PFKFB3 als modulator van het EC metabolisme en hebben we de rol ervan bestudeerd in verschillende aspecten van atherosclerose, zoals plaquevorming en plaqueprogressie. We hebben ook onderzocht of PFKFB3 remming implicaties heeft op intraplaque (IP) neovascularisatie, hetgeen beschouwd wordt als een factor die bijdraagt aan de kwetsbaarheid van humane plaques. In deze context kan regulering van het EC metabolisme een nieuw doelwit vormen om IP angiogenese te remmen en de stabiliteit van de plaque te bevorderen.

In **hoofdstuk 2** hebben we potentiële farmacologische strategieën besproken om IP angiogenese te remmen, waaronder (1) remming van vasculaire endotheelgroefactor signalering, (2) remming van glycolytische flux en (3) remming van vetzuuroxidatie. Op de lange termijn concludeerden we dat IP neovascularisatie van toepassing zou kunnen zijn als therapeutisch doelwit om plaquestabilisatie te induceren bovenop een lipidenverlagende behandeling.

In **hoofdstuk 3** hebben we een uitgebreid overzicht gegeven van alle diermodellen van atherosclerose. Het hoofdstuk bevat ook een beschrijving van de twee belangrijkste modellen die in dit proefschrift zijn gebruikt, namelijk apolipoproteïne E-deficiënte Fibrilline-1 mutant muizen ($\text{ApoE}^{-/-}\text{Fbn1}^{\text{C1039G}+/ -}$) en adertransplantaties in $\text{ApoE}^{-/-}$ muizen. Deze twee diermodellen ontwikkelen onstabiele atherosclerotische plaques met IP angiogenese, en zijn dus geschikt om de rol van glycolyse tijdens IP neovascularisatie en plaque progressie te bestuderen.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we een farmacologische studie met de partiële glycolyse remmer 3PO [3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-één] in de context van geavanceerde atherosclerotische plaques van ApoE^{-/-}Fbn1^{C1039G+/-} muizen. We vonden dat 3PO behandeling IP angiogenese en plaquevorming reduceert. Verrassend genoeg had 3PO geen invloed op de grootte en samenstelling van de plaque. Bovendien werd een 3PO-gemedieerde vermindering van de plaquevorming waargenomen bij gewone ApoE^{-/-} muizen die plaques ontwikkelen zonder IP neovascularisatie. Over het geheel genomen suggereren deze gegevens dat het vaatwandmetabolisme een rol kan spelen in de vroege stadia van atherosclerose. We hebben ook in vitro en in vivo bewijs geleverd dat 3PO interfereert met de opregulatie van VCAM-1 en ICAM-1 in EC's. VCAM-1 en ICAM-1 zijn twee belangrijke adhesiemoleculen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van plaque in een vroeg stadium. Mechanistisch gezien vonden we dat 3PO de TNF α -NF- κ B signaalweg in EC's remt. Dit leidt tot onderdrukking van VCAM-1 expressie zowel in vitro als in vivo. Onze studie roept echter ook enkele aanvullende vragen op, zoals waarom veranderingen in VCAM-1 expressie in 3PO behandelde muizen de plaquevorming niet veranderen, maar alleen de (vroege) plaquevorming. Men kan speculeren dat wanneer vroege plaques eenmaal gevormd zijn, downregulering van VCAM-1 expressie in EC's door 3PO geen significante invloed heeft op verdere leukocytenrecrutering en plaqueprogressie. Histologische gegevens van menselijke plaques geven aan dat in vroege lesies VCAM-1 en ICAM-1 voornamelijk tot expressie komen door het endotheel, terwijl in meer gevorderde lesies de meerderheid van de VCAM-1 expressie wordt gevonden in subsets van intimale gladde spiercellen en macrofagen. Deze bevindingen kunnen verklaren waarom downregulering van adhesiemoleculen door 3PO in EC's voornamelijk de initiële fase van de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloedt, maar niet verdere stappen van plaque progressie. Interessant is dat de metabole stress veroorzaakt door 3PO de vorming van autofagosomen in EC's stimuleerde en leidde tot inductie van autofagie. Soortgelijke waarnemingen werden eerder gemeld in kankercellen. Onze resultaten geven aan dat downregulering van endotheliale VCAM-1 (en ICAM-1) expressie door 3PO afhankelijk is van autofagie-inductie. De expressie van deze adhesiemoleculen werd niet verminderd door 3PO in TNF- α -behandelde EC's waarin expressie van het essentiële autofagie gen ATG7 werd stilgelegd.

Integendeel, de expressie van VCAM-1 (en ICAM-1) werd opgereguleerd in ATG7-deficiënte EC's, wat suggereert dat autofagie de expressie van deze adhesiemoleculen onderdrukt. Onze bevindingen ondersteunen eerdere gegevens die aantonen dat endotheliale autofagie atheroprotectief is en de vorming van atherosclerotische plaque beperkt door het voorkomen van endotheliale apoptose, senescentie en ontsteking.

In **hoofdstuk 5** hebben we geprobeerd aan te geven of remming van glycolyse door 3PO gerelateerd is aan een directe remming van het PFKFB3-enzym zoals eerder gesuggereerd in de literatuur. Omdat overtuigende affiniteitstests om dit probleem aan te pakken nog steeds ontbreken, presenteerden we een studie met isotherme titratie calorimetrie die suggereert dat 3PO niet bindt aan PFKFB3, tot 750 μM , in tegenstelling tot 3 μM van AZ PFKFB3 67, dat een krachtige en specifieke PFKFB3 remmer is. We hebben echter bevestigd dat 3PO de glycolyse in de EC's remt en we hebben aangetoond dat het remmende effect van 3PO op de glycolyse berust op het vermogen om een onevenwicht in de intracellulaire pH te veroorzaken door de accumulatie van melkzuur in de cel. Dit is niet verwonderlijk omdat glycolytische enzymen, waaronder lactaatdehydrogenase en phosphofruktokinase-1 (PFK-1), zeer pH-gevoelig zijn. Een verandering van minder dan één pH-eenheid, zelfs een paar tienden, kan de activiteit van PFK-1 meer dan 10-voudig verminderen. Bovendien is aangetoond dat PFKFB3, ook wel bekend als phosphofruktokinase-2 (PFK-2), door waterstofionenconcentraties allosterisch wordt gereguleerd. Aan de andere kant is lactaat een belangrijke regulator van de pH, vandaar dat de intracellulaire toename van deze metaboliet leidt tot intracellulaire verzuring van het milieu, waardoor indirect de snelheid van de glycolyse wordt beïnvloed.

In **hoofdstuk 6** hebben we met behulp van een genetische benadering de rol van endotheliale PFKFB3 in IP-angiogenese en plaque-ontwikkeling bestudeerd. We kruisten ApoE^{-/-} muizen met PFKFB3^{fl/fl} Cdh5^{iCre} muizen (die een tamoxifen-induceerbare EC-specifieke Cre bevatten) om een ApoE^{-/-} PFKFB3^{ECKO} muizenstam te genereren. Een adertransplantaatmodel werd gebruikt om het effect van een EC-specifieke verwijdering van PFKFB3 in geavanceerde plaques met IP-neovascularisatie te bestuderen. Analyse van IP neovascularisatie in adertransplantatieletsels van ApoE^{-/-} PFKFB3^{ECKO}-muizen toonde een significante afname van het aantal microvaten, wat in lijn is met de effecten verkregen met 3PO.

Echter, in tegenstelling tot 3PO, zagen we een afname in het gebied van de adertransplantatie en het percentage vernauwingen in ApoE^{-/-} PFKFB3^{ECKO} muizen. Een mogelijke verklaring voor deze verschillen is het feit dat 3PO als therapeutisch middel werd toegediend (na 4 of 16 weken westerse voeding), terwijl bij adertransplantaties PFKFB3 werd verwijderd in de EC's vóór de ontwikkeling van de ziekte. Bovendien zou 3PO kunnen interfereren met het metabolisme van andere celtypes die betrokken zijn bij de ontwikkeling van plaque. De vermindering van de IP-angiogenese die wordt waargenomen bij adertransplantaties gaat gepaard met een vermindering van de lekkage van deze microvaatjes. Deze bevindingen zijn in lijn met in vitro waarnemingen en tumorangiogenesemodellen die aantonen dat PFKFB3-remming in EC's VE-cadherine endocytose vermindert en normalisering van de endotheliale barrière bevordert. Aanvullend onderzoek is nodig om te begrijpen of de rijping van IP-vaten wordt beïnvloed door PFKFB3-deletie. Samen met een reductie van microvaten hebben we ook minder macrofaag infiltratie in lesies van ApoE^{-/-} PFKFB3^{ECKO} muizen gedetecteerd, wat suggereert dat er een verband bestaat tussen het EC metabolisme en macrofaag infiltratie. Deze laatste bevinding is ook anders dan de farmacologische remming van glycolyse. Desalniettemin, in lijn met eerdere bevindingen, speculeren we dat het effect dat in vivo is waargenomen na EC-specifieke PFKFB3 deletie, te wijten is aan het herstel van de celverbinding met minder monocytten die de lesie binnendringen, wat plaques stabiel maakt. Interessant is dat EC-specifieke PFKFB3 deletie de ontwikkeling van plaques remt in ApoE^{-/-} muizen, een natief atherosclerose diermodel dat geen kenmerken van geavanceerde lesies zoals IP-microscopische cellen ontwikkelt. Al met al tonen deze bevindingen de potentiële waarde aan van de modulatie van EC-glycolyse, en in het bijzonder PFKFB3, als een therapeutische strategie om de ontwikkeling van plaque tegen te gaan in adertransplantaties en native atherosclerose.

In **hoofdstuk 7** presenteerden we een studie die werd uitgevoerd in samenwerking met de Universiteit van Aberdeen. Hier beschreven we de ontwikkeling van een PFKFB3-gerichte PET-radiotracer, [18F] ZCDD083 (18F-radiolabelde fenoxindazoolverbinding, ZCDD083), voor beeldvorming van de atherosclerotische plaque in vivo. ZCDD083 is een nauwe structurele nabootsing van de krachtige PFKFB3-remmer AZ68 (IC₅₀ = 4 nM), waarvan de radiofluorisatie wordt geacht

chemisch levensvatbaar te zijn en waarvan het onwaarschijnlijk is dat het de binding met PFKFB3 beïnvloedt. De specificiteit van de tracer voor atherosclerotische plaques wordt aangetoond door de combinatie van ex vivo autoradiografie met en face Oil Red O kleuring van dezelfde aortaspecimens. Inderdaad, we hebben colocalisatie van het [18F]ZCDD083 signaal met plaqueverdeling langs de aorta waargenomen. Deze kruisstudies in C57BL/6J, ApoE^{-/-} en ApoE^{-/-}Fbn1^{C1039G+/-} muizen toonden een hoge gevoeligheid van [18F]ZCDD083 aan om atherosclerotische plaques te detecteren, terwijl weinig signaal werd gedetecteerd in normale vaten of buiten atherosclerotische lesies. Deze tracer is een veelbelovend niet-invasief diagnostisch hulpmiddel om ruptuurgevoelige atherosclerotische plaques op te sporen, wat op zijn beurt kan helpen bij het verbeteren van de risicostratificatie en de evaluatie van de werkzaamheid van anti-atherosclerotische therapieën.

In **hoofdstuk 8** presenteerden we een nieuwe beeldvormingsmethode voor een driedimensionale reconstructie van het IP-vaatnetwerk in een muismodel van geavanceerde atherosclerose dat spontaan IP-angiogenese ontwikkelt. Deze methode is een nuttig instrument voor studies die erop gericht zijn te bepalen of er een causaal verband bestaat tussen de aanwezigheid van IP neovaststructuren en atherogenese of tussen angiogene stimuli en plaque angiogenese.

Recente studies hebben onthuld dat glycolyse en vetzuuroxidatie (FAO) in EC's het uitlopen van vaten parallel aan gevestigde groeifactoren zoals VEGF (vasculaire endotheliale groeifactor) of FGF (fibroblast endotheliale groeifactor) aandrijven. Met name EC's vertonen een hoge glycolytische activiteit en het is aangetoond dat het niveau van de glycolyse in actieve EC's vergelijkbaar is met dat van tumorcellen en veel hoger is dan dat van andere gezonde cellen. Bovendien is de glycolytische flux in EC's >200 maal zo hoog als glucose-oxidatie, vetzuuroxidatie en glutamine-oxidatie, waardoor >85% van het totale cellulaire ATP-gehalte wordt gegenereerd. Dit proefschrift bevat een aantal farmacologische en genetische preklinische studies die het effect van glycolyse-inhibitie in de geactiveerde vaatwand en endotheel in de context van atherosclerose beschrijven. In het algemeen vinden we dat glycolyse remming in EC's geassocieerd wordt met gunstige effecten zoals een vermindering

van de plaquevorming, plaque progressie en IP angiogenese. Gezien het sterke bewijs dat verminderde IP-vascularisatie plaques minder kwetsbaar maakt, kan glycolyse-inhibitie een nieuwe strategie zijn om het risico op plaquebreuk en de frequentie van ongunstige cardiovasculaire gebeurtenissen te verminderen.

In dit proefschrift hebben we diermodellen geanalyseerd die de kenmerken van menselijke atherosclerose en plaque progressie recapituleren. De experimentele data verkregen uit deze modellen suggereren een kritische rol van het EC metabolisme in de vorming en progressie van atherosclerose naast IP vascularisatie. Toch zijn er nog open vragen. Zo zagen we bijvoorbeeld bij adertransplantaties van ApoE^{-/-} PFKFB3^{ECKO} muizen een duidelijke afname in IP neovascularisatie geassocieerd met verminderde plaque groei, maar of deze gebeurtenissen oorzakelijk verbonden zijn blijft onduidelijk.

We hebben ons gefocuseerd op PFKFB3 als doelwit voor glycolyse-inhibitie. Het is aangetoond dat dit enzym onder atheroprone turbulente stroming en in halsslagaders van patiënten met verhoogde niveaus van lipoproteïne(a) (die verhoogde glycolyse en EC activering veroorzaken) opgereguleerd is. Onlangs werden echter andere metabolische enzymen geïdentificeerd in de controle van de EC glycolytische flux en angiogenese. Een recente studie heeft inderdaad aangetoond dat verwijdering van hexokinase 2 (HK2) in EC's leidt tot verminderde glycolyse, wat de EC proliferatie, migratie en angiogenese in vivo belemmert. Tot slot is aangetoond dat oxidatie van endotheelvetzuren (FAO) een tamelijk onverwachte rol speelt bij het uitlopen van vaten. Een recente studie heeft inderdaad aangetoond dat de EC-specifieke verwijdering van carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a), die vetzuren (FA's) invoert in mitochondriën en daardoor de FAO-flux beperkt, de EC-proliferatie vermindert en een vermindering van neoangiogenese veroorzaakt, zowel in vitro als in vivo. Al deze factoren die betrokken zijn bij de EC-metabole pathways moeten worden onderzocht in de context van atherosclerotische plaquevorming en -groei om de rol van het EC-metabolisme in de verschillende stadia van de ziekte beter te kunnen ontleden.

Statines zijn competitieve remmers van 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym A (HMG-CoA) reductase, het enzym dat de snelheidsbeperkende stap in de

cholesterolsynthese katalyseert en ze zijn een van de meest voorgeschreven medicijnen. Statines worden gebruikt om de progressie van atherosclerose te vertragen en het cardiovasculaire risico te verminderen. Naast hun cholesterolverlagende werking hebben ze ook ontstekingsremmende eigenschappen en verbeteren ze de endotheliale functie door de expressie van endotheliale progenitorcellen die betrokken zijn bij vasculair herstel en de expressie van endotheliale stikstofoxide synthase te verhogen.¹¹ Meer recentelijk heeft de klasse van PCSK9 Inhibitors (bijv. alirocumab, evolocumab) die leverproteïneconvertase subtilisine kexine 9 inactiveren een nog lager circulerend LDL-C-gehalte bereikt en is goedgekeurd als eerstelijnsmedicijn om het risico van cardiovasculaire aandoeningen bij patiënten die geen statines kunnen verdragen te verminderen.¹² Statines en PCSK9-remmers werken in op hyperlipidemie, wat een bewezen risicofactor is voor plaque progressie, ruptuur en ongunstige cardiovasculaire aandoeningen. Geneesmiddelen die specifiek gericht zijn op het EG-metabolisme kunnen een nieuwe aanpak bieden om de ontwikkeling van atherosclerotische lesies te remmen door zich te richten op de onderliggende mechanismen van endotheliale disfunctie. Bovendien kan een combinatie van manipulatie van de ECs en het lipidenmetabolisme in gevestigde atherosclerose leiden tot minder cardiovasculaire complicaties als gevolg van kwetsbare plaques en tot een algemene verbetering van de overlevingskansen.

Statines zijn competitieve remmers van 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym A (HMG-CoA) reductase, het enzym dat de snelheidsbeperkende stap in de cholesterolsynthese katalyseert en ze zijn één van de meest voorgeschreven geneesmiddelen. Statines worden gebruikt om de progressie van atherosclerose te vertragen en het cardiovasculaire risico te verminderen. Naast hun cholesterolverlagende werking hebben ze ook ontstekingsremmende eigenschappen en verbeteren ze de endotheliale functie door de expressie van endotheliale progenitorcellen die betrokken zijn bij vasculair herstel en de expressie van endotheliale stikstofoxide synthase te verhogen. Meer recentelijk heeft de klasse van PCSK9 Inhibitors (bijv. alirocumab, evolocumab) die leverproteïneconvertase subtilisine kexine 9 inactiveren een nog lager circulerend LDL-C-gehalte bereikt, en zijn ze goedgekeurd als eerstelijnsmedicijn om het risico van cardiovasculaire aandoeningen bij patiënten die geen statines kunnen verdragen te verminderen.

Statines en PCSK9-remmers werken in op hyperlipidemie, wat een bewezen risicofactor is voor plaque progressie, ruptuur en ongunstige cardiovasculaire aandoeningen. Geneesmiddelen die specifiek gericht zijn op het EC-metabolisme kunnen een nieuwe aanpak bieden om de ontwikkeling van atherosclerotische lesies te remmen door zich te richten op de onderliggende mechanismen van endotheliale disfunctie. Bovendien kan een gecombineerde manipulatie van EC's en het lipidenmetabolisme in gevestigde atherosclerose leiden tot minder cardiovasculaire complicaties als gevolg van kwetsbare plaques en tot een algemene verbetering van de overlevingskansen.

