

Plaque stabilizing and destabilizing effects in atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Tillie, R. (2024). *Plaque stabilizing and destabilizing effects in atherosclerosis: the role of microvessels, macrophage metabolism and fibroblasts*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20240202rt>

Document status and date:

Published: 01/01/2024

DOI:

[10.26481/dis.20240202rt](https://doi.org/10.26481/dis.20240202rt)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Cardiovascular disease (CVD) is a considerable global health concern, as it is a leading cause of mortality and morbidity worldwide, and thereby puts a substantial burden on healthcare systems and individuals. A key process that drives many cardiovascular diseases is atherosclerosis. This can eventually manifest itself in major clinical events such as angina pectoris, myocardial infarction and ischemic stroke. Atherosclerosis is a chronic, non-resolving inflammatory disease characterized by the progressive buildup of fatty deposits, also called plaque, in medium and large-sized arteries. It is caused by local endothelial cell dysfunction, followed by lipoprotein extravasation and retention, recruitment and accumulation of pro-inflammatory macrophages and other leukocytes, and foam cell formation in the subendothelial space. Moreover, mesenchymal cells produce extracellular matrix (ECM) components to create a stabilizing fibrous cap. At later stages, apoptosis of ECM-forming cap cells and thinning of the fibrous cap contributes to plaque destabilization and ultimately, plaque rupture. Additionally, advanced stages of atherosclerosis are characterized by neovascularization of the plaque. The resulting new microvessels are often unstable and leaky, which is also thought to contribute to plaque destabilization. The destabilized plaque may subsequently rupture (or erode), leading to thrombus formation and vessel occlusion, the immediate cause of clinical events such as myocardial infarction and ischemic stroke.

Thus, atherosclerosis involves a complex interplay of plaque stabilizing and destabilizing cell (sub)types, functions and processes. The complexity of the atherosclerotic disease process offers many leverage points to study atherosclerosis and potential interventions. Firstly, the role of intraplaque microvessel leakage in plaque destabilization remains to be confirmed. Secondly, interventions in cell types that are key for atherosclerosis initiation and progression, such as pro-inflammatory macrophages, may prevent or slow down disease progression. Pro-inflammatory macrophages are highly glycolytic, and inhibition of glycolysis has previously shown to decrease their pro-inflammatory activation *in vitro*. This offers interesting opportunities for manipulation of macrophage metabolism in inflammatory diseases. Lastly, the (functional) heterogeneity of fibroblasts, a mesenchymal cell type that was identified in atherosclerosis quite recently, remains to be explored. Thus, this thesis set out to study the role of these three potential regulators of plaque stability: microvessels, macrophage metabolism and fibroblasts in atherosclerosis. These studies may yield important opportunities for future therapeutic targets to prevent plaque progression and destabilization.

Platelet-derived growth factor B (PDGF-B) was previously shown to play an important role in recruitment of stabilizing mural cells towards sprouting microvessels, through its retention on the surface of the secreting cell and in the ECM. To investigate the potential causal role of microvascular permeability and hemorrhage in plaque destabilization, we studied the effects of removal of the PDGF-B retention motif, and thus a switch from cell-associated to soluble

PDGF-B, on atherosclerosis in **chapter 2**. We showed that integrity and density of atherosclerotic microvessels in the aortic root were independent of cell-associated PDGF-B. Instead, we showed that removal of the PDGF-B retention motif has dual effects, since it stimulated plaque stability and protected against an unfavorable diet-induced metabolic phenotype on one hand, but also stimulated leukocytosis through extramedullary hematopoiesis on the other hand. Further investigation of downstream pathways might allow us to isolate beneficial and detrimental effects of the PDGF-B isoforms for future prevention or treatment of atherosclerosis.

As mentioned above, pro-inflammatory macrophages have been shown to be highly dependent on glycolysis for their energy supply and functioning. Therefore, in **chapter 3**, we assessed the effects of myeloid-specific inhibition of PFKFB3 (3-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3), a key glycolytic enzyme, on atherosclerosis. Myeloid inhibition of PFKFB3 did not have any effects on circulating lipids, plaque size, burden or composition in *Ldlr*^{-/-} mice, neither in early nor advanced plaques of the brachiocephalic artery or aortic root, respectively.

Unexpectedly, we did observe that myeloid PFKFB3 inhibition stimulated diet-induced fatty liver disease, characterized by increased hepatic steatosis, inflammation and macrophage content, which we discussed in **chapter 4**. PFKFB3 knockout macrophages presented with an increased pro-inflammatory phenotype and proliferative capacities at basal state. The latter was likely facilitated by a shunt of glucose towards *de novo* synthesis of nucleobases. The protective effect of myeloid PFKFB3 on fatty liver disease could be a novel therapeutic target worth exploring.

Chapter 5 entails an introduction to a relatively new player in atherosclerosis, the fibroblast. We provided a detailed discussion on the current state of knowledge on fibroblast presence and heterogeneity in the healthy and atherosclerotic vasculature. We brought the validity of currently used fibroblast markers up for discussion, which complicates comprehensive fibroblast identification and research in the vasculature. Lastly, we speculated on possible cellular origins and cell transitions of fibroblasts in atherosclerosis.

In **chapter 6**, we explored fibroblast heterogeneity in healthy adventitia through single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq). We showed that platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) and dipeptidase 1 (DPEP1) are suitable markers to identify adventitial fibroblasts across healthy vascular beds on RNA and protein level. Importantly, these markers allowed proper distinction between fibroblasts and vascular smooth muscle cells (VSMCs). Moreover, we uncovered fibroblast heterogeneity and showed the existence of three fibroblast subsets. These three subsets could each be characterized by specific markers, namely cluster of

differentiation (CD)55, CXC motif chemokine ligand 14 (CXCL14) and lysyl oxidase (LOX). Moreover, they were predicted to exert divergent functions relevant to atherosclerosis, such as vascular development, antigen presentation and growth factor response, respectively. Additionally, proportions of the subsets changed in response to CVD risk factors such as ageing and mild hypercholesterolemia.

Next, we utilized scRNA-seq to explore the fibroblast transcriptomic landscape in atherosclerosis in **chapter 7**. We identified a potential new plaque (myo)fibroblast marker, which remains to be confirmed on mouse and human tissue sections. Moreover, we showed that expression of the plaque (myo)fibroblast marker was significantly correlated with vulnerable human plaques, and with detrimental human plaque traits. When looking into fibroblast subsets, we identified two myofibroblast clusters, and two fibroblast clusters. Next to overlapping and expected functions in ECM organization, fibroblast clusters were linked to different predicted functions, related to regulation of angiogenesis and the inflammatory response, respectively. We believe that the functions of these fibroblast clusters in atherosclerosis should be investigated further and could allow us to identify detrimental or protective fibroblast populations that could be of interest for therapeutic targeting.

Finally, we have put the findings of this thesis in a broader perspective in **chapter 8**. Amongst others, we have discussed the unexpected effects of PDGF-B retention motif deletion on atherosclerosis development. Moreover, we evaluated the suitability of mouse models to study intraplaque microvessels and hemorrhage. Next, we discussed the effects of myeloid PFKFB3 inhibition on atherosclerosis and fatty liver disease. We speculated on the protective effect of myeloid PFKFB3 on fatty liver disease and how it could be therapeutically targeted. We speculated about challenges associated with long-term genetic inhibition of PFKFB3. Lastly, we discussed fibroblast heterogeneity and markers in healthy and atherosclerotic vasculature and enumerated some of many outstanding questions regarding fibroblast research in atherosclerosis.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd een van de meest voorkomende oorzaken van sterfte en ziekte. Daardoor vormen hart- en vaatziekten een zware belasting voor zowel de volksgezondheid als de gezondheidszorg. Atherosclerose, ook wel aderverkalking genoemd, ligt vaak ten grondslag aan hart- en vaatziekten, en kan leiden tot een hart- of herseninfarct. Aderverkalking is een chronische ontstekingsziekte die gekenmerkt wordt door de voortschrijdende opstapeling van vetten, ontstekingscellen, kalk, en andere stoffen in middelgrote en grote slagaders. Deze opstapeling wordt ook wel plaque genoemd. Aderverkalking ontstaat vaak als gevolg van een verstoorde werking van de beschermende endotheellaag in de slagader, gevolgd door de ophoping van vetten, het aantrekken en ophopen van ontstekingsbevorderende macrofagen en andere immuuncellen, en de vorming van schuimcellen in de ruimte onder de endotheellaag. Mesenchymale cellen produceren bindweefsel, dat bijdraagt aan de vorming van een stabiliserend kapsel boven op de plaque. In latere stadia van de ziekte sterven deze bindweefsel-producerende cellen, waarbij het stabiliserend kapsel dunner wordt. Dit kan uiteindelijk leiden tot het instabiel worden en scheuren van de plaque. In vergevorderde stadia ontstaan er ook kleine bloedvaatjes in de plaque. Deze nieuw gevormde bloedvaatjes zijn vaak instabiel en lek. Er wordt gedacht dat dit verder bijdraagt aan de destabilisatie van de plaque. Klinische symptomen zoals hart- en herseninfarcten zijn het resultaat van het scheuren of afslijten van de plaque en de daaropvolgende vorming van stolsels.

Aderverkalking is dus het gevolg van een complex samenspel van cel (sub)typen, functies en processen die de plaque kunnen stabiliseren of juist destabiliseren. Het complexe karakter van aderverkalking biedt ook veel aanknopingspunten voor therapie. Ten eerste moet het oorzakelijk verband tussen lekkage van kleine bloedvaatjes in de plaque en destabilisatie nog worden bevestigd. Ten tweede bieden interventies in celtypen die essentieel zijn voor de initiatie en progressie van aderverkalking, zoals ontstekingsbevorderende macrofagen, kansen om ziekteprogressie te voorkomen of vertragen. Ontstekingsbevorderende macrofagen zijn zeer afhankelijk van de eerste stap van het suikermetabolisme, de glycolyse. Het is al eerder aangetoond dat remming van glycolyse de ontstekingsbevorderende activatie van macrofagen verlaagt *in vitro*. Dit biedt interessante mogelijkheden voor de manipulatie van macrofagen in ontstekingsziekten. Ten slotte is er nog veel onbekend over de diversiteit en functies van fibroblasten, een mesenchymaal celtype dat vrij recent werd geïdentificeerd in aderverkalking. Het doel van dit proefschrift was dan ook om de rol van kleine bloedvaatjes, het metabolisme van macrofagen, en fibroblasten in aderverkalking te bestuderen. Deze studies kunnen mogelijk belangrijke kansen bieden voor de identificatie van toekomstige therapeutische doelwitten, waarmee de verdere ontwikkeling of destabilisatie van de plaque kan worden voorkomen.

Platelet-derived growth factor B (PDGF-B) is een eiwit waarvan al eerder aangetoond is dat het een belangrijke rol speelt bij de aantrekking van stabiliserende cellen naar nieuwe bloedvaatjes. Deze aantrekking vindt plaats via binding van het eiwit aan het oppervlak van cellen die het eiwit afgeven, kortom de endotheelcellen die de nieuwe bloedvaatjes vormen, of door binding van het eiwit aan het nabijgelegen bindweefsel. Het retentiemotief is het gedeelte van het PDGF-B eiwit dat verantwoordelijk is voor deze binding aan het celoppervlak en nabijgelegen bindweefsel. In vorige studies resulteerde verwijdering van het retentiemotief in de afwezigheid van stabiliserende cellen in kleine bloedvaatjes. Dit zorgde voor instabiele en lekke bloedvaatjes. Om het mogelijk oorzakelijk verband te onderzoeken tussen lekkage van kleine bloedvaatjes in de plaque, en het instabiel worden van de plaque, bestudeerden we in **hoofdstuk 2** het effect van het verwijderen van het PDGF-B retentiemotief op aderverkalking. Dit zorgt dus voor een omschakeling van cel-geassocieerd naar vrij PDGF-B. We lieten zien dat dit onverwacht geen effect had op de integriteit en de dichtheid van de kleine bloedvaatjes in de verkalkte aorta. In plaats daarvan, toonden we aan dat het verwijderen van het PDGF-B retentiemotief enerzijds de stabiliteit van de plaque verhoogde en het metabool fenotype verbeterde, maar anderzijds ook een ontstekingsreactie stimuleerde in het bloed via verhoogde aanmaak van immuuncellen in de milt. Het verder bestuderen en identificeren van de mechanismen die gunstige en nadelige effecten van de PDGF-B isovormen teweegbrengen, zou voordelig kunnen zijn voor toekomstige preventie of behandeling van aderverkalking.

Het was al aangetoond dat ontstekingsbevorderende macrofagen voor hun energievoorziening en functioneren sterk afhankelijk zijn van de glycolyse. Daarom creëerden we in **hoofdstuk 3** muizen waarin PFKFB3 (3-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3), een belangrijk enzym in de glycolyse, specifiek geremd was in immuuncellen afkomstig uit het beenmerg, waaronder macrofagen. Vervolgens onderzochten we de effecten hiervan op aderverkalking. De remming bleek echter geen enkel effect te hebben op vetten in het bloed die aderverkalking bevorderen, zoals cholesterol, en de grootte of samenstelling van de plaque.

Onverwacht zagen we wel een effect van deze PFKFB3-remming op de muizenlever, besproken in **hoofdstuk 4**. Remming van PFKFB3 in immuuncellen uit het beenmerg stimuleerde vetstapeling, productie van ontstekingsfactoren en aanwezigheid van macrofagen in de lever. Dit zijn allemaal kenmerken van metabole leververvetting. PFKFB3-deficiënte macrofagen vertoonden daarnaast een ontstekingsbevorderend fenotype en verhoogde celgroei. Dit laatste werd waarschijnlijk mogelijk gemaakt door het verhoogde gebruik van glucose voor de aanmaak van bouwstenen van DNA. Aangezien PFKFB3 in immuuncellen uit het beenmerg dus een beschermend effect lijkt te hebben op

leververvetting, zou dit mogelijk een nieuw therapeutisch doelwit voor leververvetting kunnen vormen.

In **hoofdstuk 5** introduceerden we een relatief nieuwe speler in aderverkalking, een bindweefsel-producerende cel genaamd fibroblast. We gaven een gedetailleerd overzicht van de huidige stand van kennis over de aanwezigheid en diversiteit van fibroblasten in zowel de gezonde als verkalkte slagader. Bovendien bespraken we dat de genen die in de literatuur momenteel veel worden gebruikt voor de identificatie van fibroblasten, eigenlijk ongeschikt zijn. Dit gebrek aan goede markers bemoeilijkt het onderzoek naar fibroblasten in bloedvaten. Daarnaast speculeerden we over de mogelijke oorsprong van fibroblasten in de plaque, en de mogelijke transitie die fibroblasten kunnen ondergaan naar andere celtypen.

In **hoofdstuk 6** onderzochten we de diversiteit van fibroblasten in de buitenlaag van gezonde bloedvaten (de adventitia) middels een nieuwe analysetechniek, namelijk single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq). We lieten zien dat twee eiwitten, platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) en dipeptidase 1 (DPEP1), enkel geproduceerd worden door fibroblasten in de buitenlaag van het gezonde vaatbed. Dat maakt ze zeer geschikt als marker voor dit celtype. Deze markers bleken ook goed in staat om een onderscheid te maken tussen gladde spiercellen en fibroblasten in aders. Bovendien toonden we de diversiteit van fibroblasten aan door de identificatie van drie subpopulaties. Deze subpopulaties werden gekenmerkt door de productie van verschillende markers, namelijk cluster of differentiation 55 (CD55), CXC motif chemokine ligand 14 (CXCL14) en lysyl oxidase (LOX), en leken ook verschillende functies te hebben, gerelateerd aan vaatontwikkeling, antistofherkenning en gevoeligheid voor groeifactoren, respectievelijk. Daarnaast reageerden de subpopulaties verschillend op bekende risicofactoren van hart- en vaatziekten, zoals veroudering en mild verhoogde cholesterolniveaus in het bloed.

Vervolgens pasten we scRNA-seq toe om het transcriptomisch landschap van fibroblasten in aderverkalking te verkennen in **hoofdstuk 7**. We identificeerden een potentiële nieuwe marker voor de herkenning van fibroblasten in de plaque. De geschiktheid van deze marker moet nog verder bevestigd worden op eiwitniveau met behulp van vaatweefsel uit mens en muis, maar we hebben al aangetoond dat de genexpressie van deze marker gecorreleerd is met (mogelijk) destabiliserende eigenschappen in de menselijke plaque. Naar aanleiding van verder onderzoek naar mogelijke fibroblast subgroepen, identificeerden we twee myofibroblast clusters en twee fibroblast clusters. Naast gedeelde functies omtrent bindweefselorganisatie, leken de twee fibroblast clusters ook divergerende functies te hebben, gerelateerd aan regulatie van bloedvataanleg en de ontstekingsreactie. De functies van deze fibroblast clusters moeten verder onderzocht worden *in vivo* en *in vitro*. Uiteindelijk

zou dit ons in staat kunnen stellen om schadelijke of juist beschermende fibroblastpopulaties te identificeren, die gebruikt kunnen worden als therapeutisch doelwit in aderverkalking.

Tot slot bundelden we de bevindingen van dit proefschrift en plaatsten we deze in een breder perspectief in **hoofdstuk 8**. Onder andere bespraken we hierin de onverwachte effecten van het ontbreken van het PDGF-B retentiemotief op de ontwikkeling van aderverkalking. Daarnaast bediscussieerden we de geschiktheid van muismodellen om kleine bloedvaatjes in de plaque te bestuderen. Vervolgens bespraken we de effecten van remming van PFKFB3 in immuuncellen uit het beenmerg op aderverkalking en leververvetting. We speculeerden over het beschermende effect van PFKFB3 in immuuncellen uit het beenmerg op leververvetting en hoe deze kennis gebruikt zou kunnen worden voor therapeutische behandeling. Daarnaast bespraken we uitdagingen die mogelijk verband houden met langdurige genetische remming van PFKFB3. Ten slotte bediscussieerden we de diversiteit van fibroblasten en markers in gezonde en verkalkte slagaders, en somden we enkele openstaande vragen en adviezen op met betrekking tot onderzoek naar fibroblasten in aderverkalking.