

Hypoxia, HIF and angiogenesis in atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Sluimer, J. C. (2008). *Hypoxia, HIF and angiogenesis in atherosclerosis*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

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

Angiogenesis is a key morphological feature of atherosclerotic lesions. The presumed microvascular leakage of lipid, leucocytes and red blood cells enhances lipid accumulation, oxidative stress, inflammation and apoptosis, pro-atherogenic processes associated with plaque growth- and instability. However, insight into the mechanisms governing *the formation* of intraplaque microvessels in atherosclerotic disease is lacking, as well as knowledge of the (*ultra*) *structural microvessel morphology* possibly explaining microvascular leakage. As angiogenesis is a major consequence of hypoxic tissue, the mere presence of intraplaque angiogenesis suggests the existence of hypoxia and its transcriptional activator, HIF, in human atherosclerosis. Hypoxia and HIF significantly augment inflammation and lipid accumulation as well as angiogenesis, suggesting that hypoxia and HF are pro-atherogenic factors. Therefore, the main hypothesis of this thesis was that hypoxia-induced, HIF-driven transcription stimulates the progression and angiogenic infestation of atherosclerosis.

Gene expression is commonly studied in human tissue obtained from living (surgery) and deceased (autopsy) donors, however the oxygen levels and subsequent gene expression may be different between plaques derived from autopsy and surgery. Therefore in chapter 2, the gene expression profiles of advanced atherosclerotic plaques from autopsy and surgery were compared to assess if expression profiles of plaques from different sources (autopsy and surgery) were comparable. Although gene expression of autopsy and surgery was largely similar, some basal cell metabolism and hypoxia genes were differentially expressed at the mRNA, but not the protein level. Therefore, expression of hypoxia-driven genes in different stages of atherosclerosis was only compared between plaques obtained from the same source.

In chapters 3 and 4, the presence of hypoxia and HIF in the human and murine atherosclerotic plaque was positively established using the hypoxia marker pimonidazole. The presence of hypoxia correlated with atherosclerotic progression, macrophages and angiogenesis, but was independent of intimal thickness. Gene and protein expression of HIF and HIF responsive genes, investigated by micorarray, qRT-PCR and immunohistochemistry, were increased with human atherosclerotic progression, inflammation and angiogenesis.

In chapter 4 the functional involvement of hypoxia and HIF in atherogenesis was investigated by exposing mice with advanced plaques four weeks to 10% O₂, while the effect of macrophage-specific HIF1 α and its regulator PHD1 was

studied using wildtype, LysMcre-HIF1 α ^{-/-} en PHD1^{-/-} bone marrow transplantations into LDLR^{-/-} mice. Neither hypoxic exposure, nor HIF1 α and PHD1 deletion changed murine atherosclerotic burden or plaque stability. Chronic exposure to hypoxia resulted in similar HIF1 α protein levels in wildtype, LysMcre-HIF1 α ^{-/-} and PHD1^{-/-} macrophages *in vitro* and *in vivo*, as 1. chronic hypoxia reversed HIF1 α protein and VEGF expression in wildtype macrophages, 2. chronic hypoxia induced HIF1 α protein and VEGF in LysMcre-HIF1 α ^{-/-} due to incomplete genetic deletion, and 3. HIF1 α protein were unchanged in hypoxic PHD1^{-/-} macrophages. Thus, similar HIF1 α protein levels in wildtype, LysMcre-HIF1 α ^{-/-} and PHD1^{-/-} macrophages after chronic hypoxia - as encountered in plaque macrophages - may explain the lack of effect of LysMcre-HIF1 α ^{-/-} and PHD1^{-/-} bone marrow transplantations on atherosclerosis. The data identify hypoxia as a strong stimulus of HIF1 α protein expression in plaque macrophages, compensating the effect of their genetic HIF1 α and PHD1.

In addition, we hypothesized that the (*ultra*) structural abnormal morphology of intraplaque microvessels may explain microvascular leakage and was associated with plaque progression. Microvascular leakage is common in immature microvessels, with incomplete or absent basement membrane and pericyte coverage, and depends on the structural integrity of the endothelium formed by intact inter-endothelial junctions. Therefore, in chapter 5 microvessel density and (*ultra*)structural morphology were determined in the adventitia, intima-media border and atherosclerotic plaques of coronary arteries using immunohistochemistry of endothelial cells, basement membrane and pericytes and electron microscopy. Microvessel density was associated with coronary plaque progression and morphology, but was not different between stable and ruptured plaques. Microvessel pericyte coverage was incomplete in normal and atherosclerotic arteries, and is thus unlikely to account for microvascular leakage. However, electron microscopy showed an abnormal morphology of microvascular endothelium, with membrane blebs, intracytoplasmic vacuoles, open inter-endothelial junctions and basement membrane detachment. Thus, the compromised structural integrity of microvascular endothelium may explain microvascular leakage in human coronary atherosclerosis.

In chapter 6 the findings of the experimental studies in chapters 2 through 5 and their implications were discussed. These studies suggest the involvement of hypoxia and HIF in progression and angiogenesis of atherosclerosis. Despite a strong association and their known *in vivo* function, we were not able to show the functional involvement of hypoxic exposure, HIF1 α or PHD1 deletion in murine atherogenesis. The studies described in this thesis did not achieve the intended manipulation of macrophage HIF1 α expression in murine

atherogenesis and future studies are warranted using models with sustained HIF1 α manipulation in chronic hypoxia were able to conclude that plaque hypoxia is independent of species, and subsequent plaque size, but depends on the high metabolic demand of the inflammatory microenvironment. Also, we discuss the potential of plaque angiogenesis and hypoxia as promising plaque imaging tools providing tailored risk assessments and to evaluate therapy efficacy after their sufficient validation.

We also observed that the compromised structural integrity of microvascular endothelium most likely explained microvascular leakage in human coronary atherosclerosis, instead of microvessel frequency. Thus, we speculated that anti-angiogenic therapy may be best aimed at normalizing aberrant microvessel morphology, instead of preventing or eradicating angiogenesis. Although a causative effect of plaque angiogenesis, hypoxia nor HIF is currently unproven, these studies significantly advance our understanding of the formation and phenotype of plaque microvessels and provide a solid base for future research and therapy of atherosclerotic plaque growth and rupture.

Samenvatting

Atherosclerose is een aandoening van de bloedvaten waarbij het aangedane bloedvat langzaam maar zeker afgesloten wordt. Dit wordt veroorzaakt door afzetting van vet, bindweefsel, cellen en weefsel debris (necrotische kern) in de vaatwand, wat samen een atherosclerotische plaque vormt. Als de plaque veel ontstekingscellen en een grote necrotische kern bevat en de bedekkende laag bindweefsel van een plaque erg dun is, is de kans groot dat de plaque openscheurt (plaque ruptuur). Hierbij ontstaat een bloedstolsel (thrombus), dat het bloedvat acuut kan afsluiten met mogelijk een hersen- of hartinfarct tot gevolg.

Ruptuur van een atherosclerotische plaque is dus de belangrijkste onderliggende oorzaak van acute hart- en vaataandoeningen. Behalve veel ontsteking, een grote necrotische kern en een dunne bindweefsel laag, is ook de aanwezigheid van heel kleine bloedvaatjes (microvaten) in de plaque bepalend voor plaque groei en ruptuur. In dit proefschrift zijn de mechanismen bestudeerd die *de groei* van microvaten in de plaque kunnen veroorzaken en daarnaast is de *ultrastructurele morfologie* van de microvaten onderzocht.

De meest voor de hand liggende verklaring voor de groei van microvaten is het gebrek aan zuurstof (hypoxie) in de plaque, omdat de belangrijkste functie van microvaten de aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen betreft. Hypoxie stabiliseert een hypoxie-induceerbare transcriptiefactor (HIF). Deze transcriptiefactor zorgt voor de overleving van de cel in hypoxie door de stimulatie van HIF-afhankelijke genen die zuurstofafhankelijk (anaëroob) metabolisme versterken en vorming van microvaten (angiogenese) stimuleren om aan de energie- en zuurstofbehoefte te voldoen. Genexpressie wordt doorgaans bestudeerd in atherosclerotische plaques verwijderd bij levende (operatie) of overleden donoren (autopsie), maar de zuurstofstatus en dus genexpressie kunnen verschillend zijn tussen plaques afkomstig van operatie of autopsie. Resultaten van microarray analyse, kwantitatieve PCR en immuunhistochemie in hoofdstuk 2 lieten zien dat de genexpressie in plaques afkomstig van autopsie and operatie grotendeels vergelijkbaar was, hoewel genexpressie gerelateerd aan hypoxie-induceerbare en basale cel processen verschillend was. Bij vervolgstudies werd de genexpressie in verschillende stadia van atherosclerose dus enkel vergeleken tussen plaques afkomstig van dezelfde bron.

De aanwezigheid van hypoxie werd vastgesteld in plaques van mens en muis met behulp van de hypoxie-specifieke merkstof pimonidazol (hoofdstuk 3 en 4). De aanwezigheid van hypoxie hing sterk samen met de expressie van HIF

en HIF-afhankelijke genen, de aanwezigheid van microvaten en ontstekingscellen (macrofagen), maar niet met plaque dikte. Ook was er een positief verband tussen gen en eiwit expressie van HIF en HIF-afhankelijke genen, bestudeerd met microarray analyse, kwantitatieve real-time PCR en -immunohistochemie, en de mate van progressie, macrofaag infiltratie en angiogenese van humane atherosclerotische plaques (hoofdstuk 3).

In hoofdstuk 4 werd een functionele rol voor hypoxie en HIF in de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd door apoE^{-/-} muizen met gevorderde atherosclerose gedurende vier weken bloot te stellen aan 10% of 21% zuurstof. Daarnaast werd een macrofaag-specifiek effect van HIF en zijn regulator prolyl hydroxylase 1 (PHD1) bestudeerd met behulp van transplantaties van wildtype, LysMcre-HIF1 α ^{-/-} en PHD1^{-/-} beenmerg naar atherosclerose-gevoelige LDLR^{-/-} muizen. Noch omgevingshypoxie, noch het ontbreken van HIF1 α en PHD1 in plaque macrofagen had een effect op plaque hypoxie, grootte en samenstelling in muizen. Na langdurige blootstelling aan hypoxie vertoonden wildtype, LysMcre-HIF1 α ^{-/-} en PHD1^{-/-} macrofagen *in vitro* vergelijkbare HIF1 α en HIF-afhankelijke gen expressie, vanwege verminderde HIF1 α expressie na langdurige hypoxie in wildtype macrofagen, herstel van HIF1 α expressie door incomplete HIF1 α deletie in LysMcre-HIF1 α ^{-/-} macrofagen, en vanwege ontbreken van een effect van PHD1 op HIF1 α expressie. Daarbij was ook de HIF1 α expressie vergelijkbaar in plaques van muizen getransplanteerd met wildtype, LysMcre-HIF1 α ^{-/-} en PHD1^{-/-} beenmerg. Dus vergelijkbare expressie van HIF1 α en HIF-afhankelijke genen in macrofagen na langdurige blootstelling aan hypoxie - zoals in plaque macrofagen - kan verklaren dat LysMcre-HIF1 α ^{-/-} en PHD1^{-/-} beenmerg transplantaties geen effect hadden op de ontwikkeling van atherosclerose in de muis.

Naast de mechanismen die *de groei* van microvaten in de plaque kunnen veroorzaken, werd ook de *ultrastructurele morfologie* van de microvaten onderzocht. Niet de aanwezigheid van plaque microvaten per se, maar lekkage uit microvaten in atherosclerotische plaque is de vermeende bron van ontstekingscellen en cholesterolrijke rode bloedcellen. Dit verhoogt vervolgens vetstapeling, ontsteking, oxidatieve stress en celdood en deze processen dragen bij aan plaque groei en -ruptuur. In hoofdstuk 5 werd onderzocht of de *ultrastructurele morfologie* van de microvaten afwijkend was en de microvasculaire lekkage zou kunnen verklaren. Het ontbreken van microvaat versteviging door pericyten en een basaal membraan, en een gebrekkig of ontbrekend contact (junctions) tussen endotheelcellen, kan een verhoogde doordringbaarheid van microvaten voor ontstekingscellen en rode bloedcellen veroorzaken (microvasculaire lekkage). Dus werd in hoofdstuk 5 de

microvaatdichtheid en ultrastructurele morfologie bestudeerd in de normale vaatwand en in de atherosclerotische plaque van coronair arteriën met behulp van immuunohistochemie en electronen microscopie. De microvaatdichtheid vertoonde een verband met progressie en samenstelling van plaques in de coronair arteriën, zoals eerder beschreven. De bekleding van microvaten door pericyten was incompleet in atherosclerotische, maar ook in normale coronair arteriën, en kan dus niet verantwoordelijk zijn voor microvaatlekkage in de atherosclerotische plaque. Daarentegen, vertoonden microvaten met electronen microscopie een abnormale morfologie, gekenmerkt door endotheelcellen met een zeer onregelmatig celmembraan oppervlak, ophoping van celblaasjes (vacuoles) in het cytoplasma, en gebrekkig/ontbrekend contact tussen endotheelcellen onderling en met het onderliggend basaal membraan. Dus de onvolledige structurele integriteit van het microvasculair endotheel kan de microvaatlekkage in humane atherosclerose in coronair arteriën verklaren.

In hoofdstuk 6 werden de resultaten uit de vier experimentele hoofdstukken besproken en in een breder theoretisch kader geplaatst. Deze studies toonden zowel hypoxie als HIF aan in atherosclerose als mogelijke oorzaak voor plaque angiogenese. Ondanks sterke aanwijzingen voor een functionele rol van hypoxie of HIF in progressie en angiogenese van de plaque, weten we nog steeds niet het exacte verband tussen deze factoren. Desondanks kan plaque hypoxie wel gebruikt worden voor non-invasieve beeldvorming van de plaque met verschillende reeds FDA-goedgekeurde hypoxie markers. Hypoxie detectie zal dus mogelijk een grote rol spelen bij de vroegtijdige opsporing van patiënten met een verhoogd risico op plaqueruptuur.

Deze resultaten vormen ook een belangrijke basis voor verder onderzoek naar de mechanismen van plaque angiogenese, zodat specifieke angiogenese therapie toegepast kan worden om plaque groei en ruptuur te verhinderen. Naast kennis essentieel voor het ontwerpen van angiogenese therapie voor de *reductie* van plaque angiogenese, is specifiek de kennis over de gebrekkige structurele integriteit noodzakelijk voor therapie gericht op *het verminderen van de microvasculaire lekkage*. Uit deze resultaten bleek dat niet het aantal microvaten of hun bekleding met pericyten maar wel hun structuur een belangrijke verklaring is voor het verband tussen plaque angiogenese en plaque ruptuur. De resultaten van dit onderzoek vormen dus een belangrijk aangrijpingspunt voor het doel van angiogenese therapie, die mogelijkerwijs de groei en ruptuur van plaques zal verhinderen.