

Modulation of vascular inflammation: cell type specific effects by ADAMs and HDL

Citation for published version (APA):

van der Vorst, E. P. C. (2015). *Modulation of vascular inflammation: cell type specific effects by ADAMs and HDL*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20150521ev>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150521ev](https://doi.org/10.26481/dis.20150521ev)

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

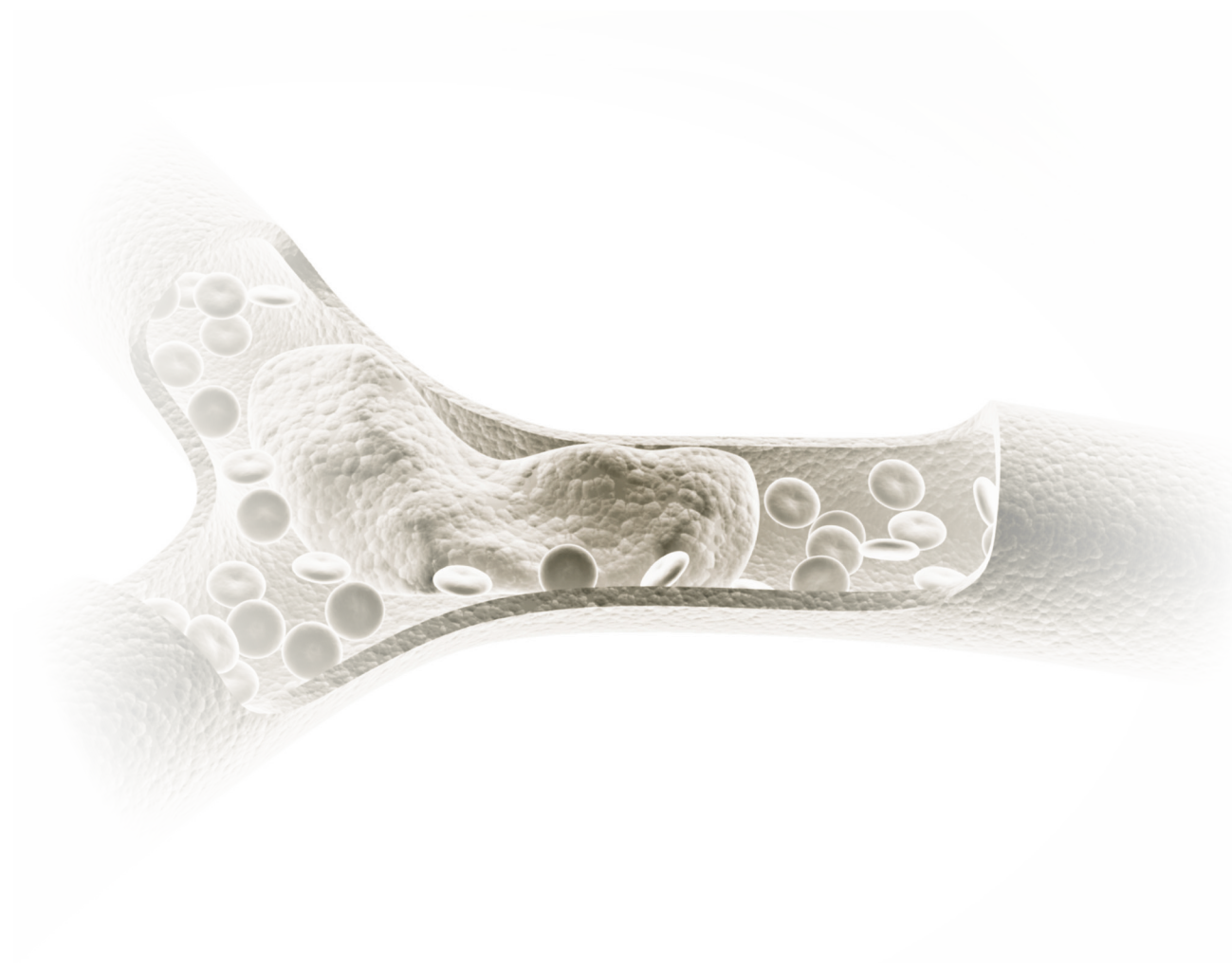
Take down policy

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 diseases (CVDs), mostly cerebrovascular (e.g. stroke) and coronary artery disease (i.e. myocardial infarction) are the leading cause of death worldwide. The main underlying cause of CVD is atherosclerosis, a chronic inflammatory disease of mostly medium and large-sized arteries. Atherosclerotic lesions form by the accumulation of lipids, immune cells and cell debris in the vessel wall. These lesions can grow over time and eventually obstruct the blood flow, or more often these lesions rupture leading to thrombus formation that can form an occlusion. This obstruction will result in ischemic areas in downstream tissues, most commonly resulting in myocardial infarction or stroke. Although in recent decades a lot of research has been performed in this area, there is still no available therapy to fully cure or reverse atherosclerosis. This thesis focussed on the regulation of inflammation, a crucial driver of atherosclerosis, by the modulation of plasma lipid profiles, more specifically high density lipoproteins (HDL), and protein post-translational modifications mediated by members of the A Disintegrin And Metalloprotease (ADAMs) family.

In **chapter 2**, the role of ADAMs in angiogenesis, inflammation and atherosclerosis was reviewed. ADAMs are membrane bound proteins that can shed or cleave, among others, various inflammatory molecules like cytokines, chemokines and adhesion molecules. Some regulatory mechanisms, like lipid raft disruption, have already been described for ADAMs. However, further elucidation of this regulation, substrate specificity, redundancy and distinct functions of ADAM proteases is still warranted. For many of the ADAM proteins, associations have already been shown between ADAM expression and atherosclerotic plaque progression, mainly in humans. However, the exact causal role of ADAMs in atherosclerosis development remained elusive.

In **chapter 3**, we investigated the causal role of ADAM8 in atherogenesis, more specifically the role of hematopoietic ADAM8. It was already shown that polymorphisms in the ADAM8 gene in humans resulted in a significantly greater risk of myocardial infarction, associating ADAM8 to atherosclerosis. We confirmed this association by showing increased ADAM8 expression upon human lesion progression, especially in foamy macrophages. To study the specific effects of hematopoietic ADAM8 in atherosclerosis, we transferred bone marrow from ADAM8 deficient or wildtype mice into atherogenic LDLr^{-/-} mice. Surprisingly, after Western type diet feeding, we could not observe any differences in atherosclerotic lesion size or composition between wildtype

and ADAM8 deficient animals. These unexpected results might be explained by the fact that we used a hematopoietic specific deficiency model, especially since ADAM8, in contrast to other ADAMs, physiologically exists in two active forms, being the classical membrane bound and a unique soluble form. Still a lot is unknown with regard to this soluble form. Conceivably, in atherosclerosis soluble ADAM8 secreted by other vascular cells, like endothelial and smooth muscle cells, could have compensated for the loss of ADAM8 on hematopoietic cells. Therefore, further research using total body ADAM8 deficient mice is necessary to fully unravel the potential causal role of ADAM8 in atherogenesis.

For ADAM10, we previously also showed an association of ADAM10 expression with human atherosclerotic plaque development. In **chapter 4**, we determined the causal role of myeloid ADAM10 in atherosclerosis using atherogenic LDLr^{-/-} mice transplanted with bone marrow from conditional knockout mice lacking ADAM10 in the myeloid lineage. After Western type diet feeding, no differences in plaque size could be observed between ADAM10 wildtype or deficient mice. However, plaque collagen content was increased in mice lacking myeloid ADAM10. Collagen is crucial for fibrous cap strength and thereby the stability of atherosclerosis lesions and can be degraded by matrix metalloproteases (MMPs), among others. In ADAM10-deficient bone marrow derived macrophages, MMP-9, -13 expression and MMP-2 gelatinase activity were significantly reduced, suggesting that myeloid ADAM10 may play a causal role in modulating plaque stability. *In vitro* transmigration experiments showed that ADAM10-deficient macrophages have reduced migration capacity toward monocyte chemoattractant protein-1 and transmigration through collagen. Together, these results suggest that myeloid ADAM10 is crucial in inflammatory processes, like leukocyte recruitment and extracellular matrix degradation in atherosclerotic lesion, thereby possibly modulating lesion stability.

Besides myeloid cells, also endothelial cells play a crucial role in atherosclerosis. Endothelial cells form the barrier between the lumen and vessel wall, secrete many chemokines capable of attracting immune cells and express adhesion molecules, which can then bind these cells. These characteristics make endothelial cells a central player in atherogenesis. In **chapter 5**, we performed a proteomic analysis of conditioned medium from endothelial cells with or without ADAM10 inhibition, indicating a role for ADAM10 in transmembrane protein shedding, like chemokines and adhesion molecules. To establish the causal role of endothelial ADAM10

in atherosclerosis, we injected endothelial cell specific ADAM10 deficient mice with an adeno-associated virus overexpressing human proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), leading to degradation of LDL receptors, rendering these mice prone for atherosclerosis development when fed a Western type diet. Contrary to our expectation, endothelial ADAM10 deficiency resulted in a marked increase in atherosclerotic lesion area, while no differences were observed in plasma cholesterol or circulating leukocyte populations. Lesions from ADAM10 deficient mice additionally showed a more advanced phenotype, characterized by more plaque necrosis and relatively less macrophages. *In vivo* multiphoton laser scanning microscopy imaging indicated an increase in leukocyte adhesion and transmigration in endothelial ADAM10 deficient mice. Interestingly, in line with our proteomic data, we also observed a significant reduction of plasma Annexin A5 in endothelial deficient ADAM10 mice. It has recently already been shown that Annexin A5 administration in mice resulted in a reduced lesion size and plaque macrophage content, accompanied by reduced leukocyte recruitment. This makes it very conceivable that the marked reduction in plasma Annexin A5 in our study plays a role in the observed effects on atherogenesis. However, further research will be needed to confirm this interaction and mechanism.

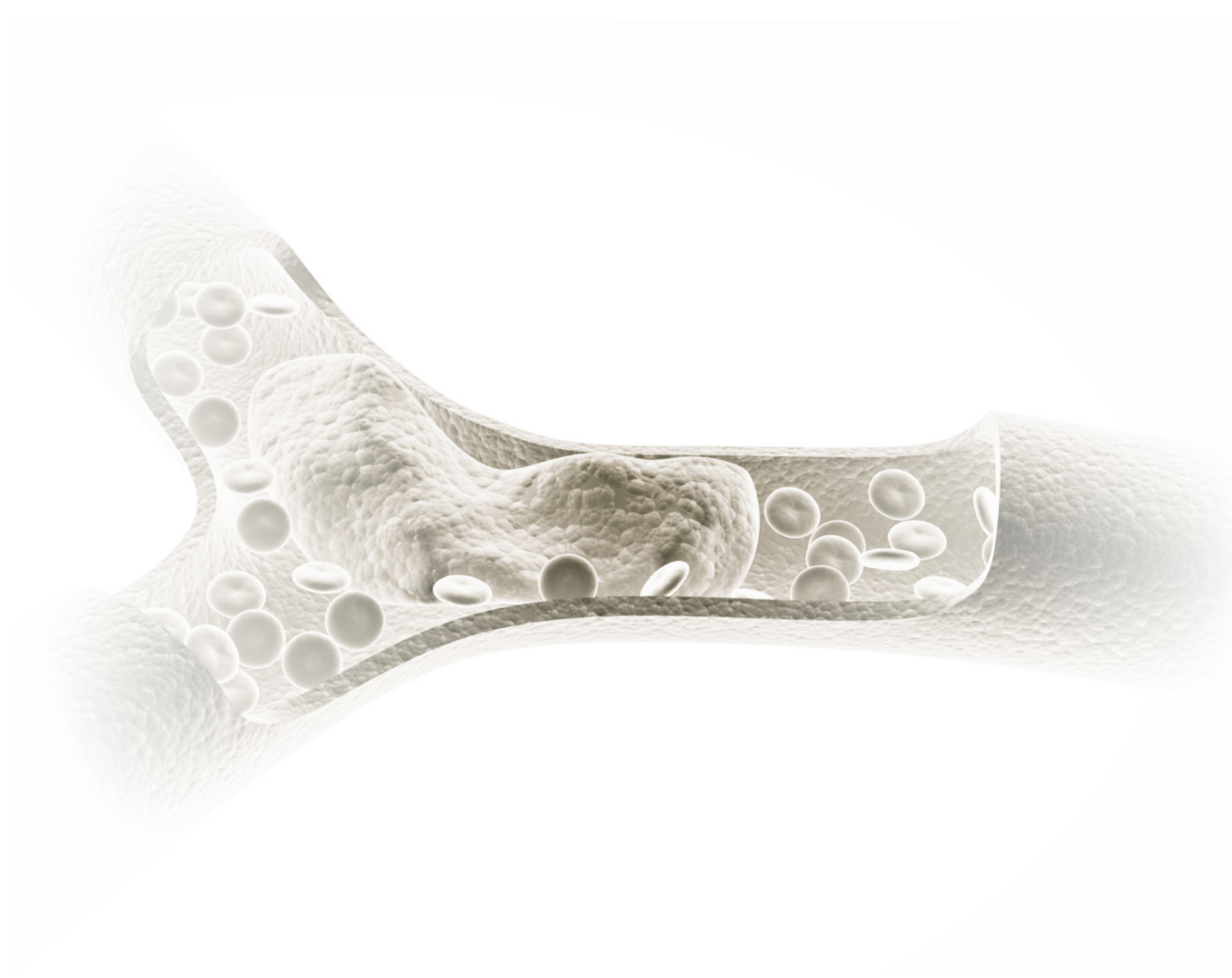
Besides the post-translational modifications mediated by ADAMs, we also investigated the regulation of inflammation by HDL. Various *in vitro* studies already showed that HDL is anti-inflammatory in endothelial cells, but did not investigate the effects of HDL on other vascular cells like smooth muscle cells (SMCs) and macrophages. In **chapter 6**, we investigated the effects of HDL on SMCs. Pre-incubation of SMCs with HDL, prior to TNF- α stimulation, significantly inhibited the secretion of CCL2, CCL5 and CX₃CL1 chemokines and expression of the chemokine receptors CCR2 and CX₃CR1. This decreased chemokine secretion was mediated via the PI3K – Akt – NF- κ B pathway, as HDL pre-incubation inhibited phosphorylation and thus activation of all these signaling molecules. Besides these anti-inflammatory effects on chemokine secretion, we also observed that HDL strikingly reduced SMC proliferation, which appeared to be mediated via ERK signaling. Finally, we identified the scavenger receptor SR-B1 as essential membrane molecule, necessary for mediating the effects of HDL on chemokine secretion and SMC proliferation. These results are of great importance with respect to current atherosclerosis therapy, as percutaneous coronary interventions, like stent implantation, are common interventions for atherosclerosis patients but often result in excessive neointimal hyperplasia causing restenosis and early stent

failure. Inhibiting SMC inflammation and in particular proliferation might be beneficial in this respect.

Chapter 7 focuses on the effects of HDL on macrophages. In contrast to the expected anti-inflammatory effects, we surprisingly observed major pro-inflammatory effects of HDL on mouse as well as human macrophages *in vitro*, leading to increased TNF- α and IL-12 secretion, while reducing IL-10 release. *In vivo* pre-incubation of macrophages with high levels of HDL, in ApoA-I transgenic mice, also resulted in a more pro-inflammatory phenotype of macrophages from these mice, compared to wildtype mice. Using macrophages from specific cholesterol transporter (ABCA1 and ABCG1) and scavenger receptor (SR-B1 and CD36) knockout mice, we showed that none of these classical transporters were mediating these inflammatory effects. However, HDL appeared to extract membrane cholesterol via a passive manner from macrophages. Cholesterol depletion, resulting in lipid raft disruption can have major influences on intracellular signaling. Therefore, we determined the effect of HDL on various signaling pathways. We showed that NF- κ B, in particular p65, is activated upon HDL incubation, although none of the described upstream activation pathways seemed to be involved in this process. This indicates that HDL results in direct phosphorylation and thus activation of p65. This direct phosphorylation may be mediated by protein kinase C, which was also essential for the observed inflammatory effects. Additionally we showed a role for STAT1 signaling in mediating IL-12 and IL-10 release and for ADAM proteases in mediating TNF- α release. These results underline the importance of a better understanding of cell-type specific effects of HDL, especially in light of to the disappointing outcome of recent clinical trials.

Finally, in **chapter 8** the most important results of this thesis were discussed. The cell-type specific effects described in this thesis are of particular interest for the development of targeted therapeutic approaches, thereby modulating the clinical outcome in a disease-related and personalized manner. However, for ADAM targeting, future research must first further elucidate the precise regulation, specificity and redundancy of ADAMs *in vivo*. Concerning HDL-based therapies, it will be very important to focus future research on the effects of specific HDL subtypes and HDL constituents. Taken together, this thesis showed various cell-type specific effects of ADAMs and HDL on vascular inflammation.

Samenvatting



Hart- en vaatziekten, waaronder cerebrovasculaire (bijvoorbeeld beroerte) en kransslagader aandoeningen (hartinfarct) zijn wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaken. De belangrijkste oorzaak van hart- en vaatziekten is atherosclerose oftewel aderverkalking, een chronische ontstekingsziekte van met name de middelgrote en grote slagaders. Atherosclerotische laesies worden gevormd door de opeenstapeling van lipiden, immuun cellen en cel resten in de vaatwand. Deze laesies kunnen gedurende de tijd groeien en uiteindelijk de bloedstroom belemmeren. Het gebeurt echter vaker dat deze laesies scheuren waardoor een bloedstolsel gevormd wordt dat het bloedvat (geheel of gedeeltelijk) afsluit. Deze obstructie leidt in stroomafwaarts gelegen weefsels tot een zuurstof tekort, meestal resulterend in een hartinfarct of beroerte. Hoewel de laatste decennia veel onderzoek is uitgevoerd naar atherosclerose, is er nog steeds geen therapie beschikbaar om het volledig te genezen. Dit proefschrift richt zich op de regulatie van ontsteking, een cruciale motor van atherosclerose, door het moduleren van plasma lipidenprofielen, meer in het bijzonder high density lipoproteïnes (HDL, ook wel bekend als het goede cholesterol) en eiwit modificaties gemedieerd door A Disintegrin And Metalloprotease (ADAMs) enzymen.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de rol van ADAMs in de vorming van nieuwe vaten, ontsteking en atherosclerose. ADAMs zijn membraangebonden eiwitten die onder andere diverse ontstekingsmoleculen zoals cytokinen, chemokinen en adhesiemoleculen van het membraan af kunnen knippen. Enkele regulerende mechanismen, zoals verstoring van cholesterol rijke gebieden in het membraan, zijn reeds beschreven voor ADAMs. Echter meer onderzoek naar deze regulatie, maar ook naar substraat specificiteit, compensatie door andere ADAMs en verschillende functies van ADAM proteasen is noodzakelijk. Voor veel van de ADAM eiwitten zijn reeds associaties aangetoond tussen hun aanwezigheid en humane atherosclerotische laesie progressie. Echter, de exacte causale rol van ADAMs in atherosclerose ontwikkeling was tot dusverre onbekend.

Hoofdstuk 3 beschrijft de causale rol van ADAM8 in atherosclerose, meer in het bijzonder de rol van ADAM8 aanwezig op bloedcellen. Er werd reeds aangetoond dat afwijkingen in het ADAM8-gen bij de mens tot een significant groter risico op een hartinfarct leiden, wat ADAM8 associeert met atherosclerose ontwikkeling. Wij bevestigden deze associatie door aan te tonen dat ADAM8 verhoogd aanwezig is tijdens humane atherosclerotische laesie progressie, voornamelijk in vet geladen ontstekingscellen, de

schuimcellen. Om de specifieke gevolgen van bloedcel ADAM8 in atherosclerose te bestuderen, hebben we beenmerg van ADAM8 deficiënte of controle muizen overgebracht naar LDLr deficiënte muizen, die gevoelig zijn voor het ontwikkelen van atherosclerose. Na het geven van een vetrijk dieet konden wij geen verschil in atherosclerotische laesie grootte of samenstelling tussen controle en ADAM8 deficiënte dieren observeren. Deze onverwachte resultaten kunnen mogelijk verklaard worden doordat we gebruik gemaakt hebben van een specifiek bloedcel deficiëntie model, met name omdat ADAM8, in tegenstelling tot andere ADAMs, voorkomt in twee actieve vormen, de klassieke membraangebonden vorm en een unieke uitgescheiden vorm, waarvan nog steeds veel onbekend is. Het kan daarom zijn dat de ADAM8 uitgescheiden door andere vaatwandcellen zoals endotheelcellen en gladde spiercellen, het verlies van ADAM8 op bloedcellen heeft gecompenseerd. Daarom is verder onderzoek met behulp van volledig ADAM8 deficiënte muizen nodig om de mogelijke causale rol van ADAM8 in atherosclerose volledig te ontrafelen.

Voor ADAM10 hebben we in een eerdere studie ook een associatie van ADAM10 aanwezigheid met humane atherosclerotische plaque ontwikkeling aangetoond. In **hoofdstuk 4** hebben we de causale rol van ADAM10 in bepaalde ontstekingscellen (myeloïde cellen) bij atherosclerose bepaald door gebruik te maken van LDLr deficiënte muizen welke getransplanteerd zijn met beenmerg van muizen waarbij ADAM10 specifiek in deze ontstekingscellen ontbreekt. Na het geven van een vetrijk dieet, kon geen verschil in laesie grootte worden waargenomen tussen ADAM10 deficiënte of controle muizen. Echter, bij de muizen zonder myeloïde ADAM10 was meer collageen aanwezig in de laesies. Collageen is essentieel voor de sterkte van de fibreuze kap en daarmee ook de stabiliteit van atherosclerotische laesies. Collageen kan onder andere afgebroken worden door matrix metalloproteasen (MMPs). In ADAM10-deficiënte beenmerg macrofagen was de MMP-9, -13 expressie en MMP-2 activiteit aanzienlijk verminderd, erop wijzend dat myeloïde ADAM10 een causale rol kan spelen bij het moduleren van de stabiliteit van laesies. *In vitro* transmigratie experimenten hebben aangetoond dat ADAM10-deficiënte macrofagen een verminderde migratie richting monocyte chemoattractant protein 1 en transmigratie door collageen vertonen. Samen wijzen deze resultaten erop dat myeloïde ADAM10 cruciaal is bij ontstekingsprocessen waaronder de aantrekking van ontstekingscellen en extracellulaire matrix afbraak in atherosclerotische laesies en daarmee mogelijk de stabiliteit van deze laesies beïnvloedt.

Naast myeloïde cellen spelen ook endotheelcellen een cruciale rol bij atherosclerose. Endotheelcellen vormen de barrière tussen het lumen en de vaatwand. Eigenschappen zoals chemokine productie die immuun cellen aantrekken en de expressie van adhesiemoleculen die vervolgens deze cellen kunnen binden, maken endotheelcellen een belangrijke speler in atherosclerose. In **hoofdstuk 5** hebben we een eiwit analyse, oftewel proteomics, van geconditioneerd medium van endotheelcellen met of zonder ADAM10 inhibitie uitgevoerd. De resultaten suggereren dat endotheelcel ADAM10 een belangrijke rol speelt in het knippen van membraaneiwitten, zoals chemokines en adhesiemoleculen. Om de causale rol van endotheelcel ADAM10 in atherosclerose te bepalen hebben wij endotheelcel specifieke ADAM10 deficiënte muizen geïnjecteerd met een adeno-geassocieerd virus dat humaan proproteïne convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) tot overexpressie brengt, hetgeen leidt tot afbraak van LDL receptoren waardoor deze muizen gevoelig worden voor de ontwikkeling van atherosclerose bij het geven van een vetrijk dieet. In tegenstelling tot onze verwachting resulteerde endotheelcel ADAM10 deficiëntie in een duidelijke toename van atherosclerose, terwijl er geen verschillen waargenomen werden in plasma cholesterol of circulerende leukocyt populaties. Laesies van ADAM10 deficiënte muizen waren bovendien verder gevorderd, gekenmerkt door meer necrose en relatief minder macrofagen. *In vivo* multi-foton laser scanning microscopische beeldvorming liet een verhoging van ontstekingscel adhesie en transmigratie zien in endotheelcel ADAM10 deficiënte muizen. Opvallend is dat we in lijn met onze proteomics resultaten, ook een significante reductie van plasma Annexine A5 in endotheelcel deficiënte ADAM10 muizen zagen. Onlangs is reeds aangetoond dat Annexine A5 toediening in muizen resulteerde in een verminderde omvang van de laesie en minder macrofagen in deze laesie, gepaard gaande met een verlaging van het aantal aangetrokken ontstekingscellen. Dit maakt het aannemelijk dat de duidelijke vermindering in plasma Annexine A5 in onze studie een rol speelt bij de waargenomen effecten op atherosclerose ontwikkeling. Verder onderzoek is echter nodig om deze interactie en mechanisme te bevestigen.

Naast de eiwit modificaties gemedieerd door ADAMs, onderzochten wij ook de regulatie van ontsteking door HDL. Verschillende *in vitro* studies hebben reeds aangetoond dat HDL ontstekingsremmend werkt in endotheelcellen, maar de effecten van HDL op andere vasculaire cellen zoals de gladde spiercellen en macrofagen waren nog niet onderzocht.

In **hoofdstuk 6** onderzochten wij de effecten van HDL op gladde spiercellen. Pre-incubatie van gladde spiercellen met HDL alvorens TNF- α stimulatie remde de uitscheiding van de chemokines CCL2, CCL5 en CX₃CL1 en de aanwezigheid van de chemokine receptoren CCR2 en CX₃CR1. Deze verminderde chemokine uitscheiding was bewerkstelligd door de PI3K - Akt - NF- κ B route, omdat HDL pre-incubatie de fosforylering en derhalve activatie van deze signaalmoleculen remde. Naast deze anti-inflammatoire effecten op chemokine uitscheiding observeerden wij ook dat HDL de celdeling van gladde spiercellen verminderde. Dit opmerkelijke effect bleek gemedieerd te zijn door ERK signalering. Tenslotte identificeerden wij de scavenger receptor SR-B1 als essentieel membraanmolecuul, noodzakelijk voor het bewerkstelligen van de effecten van HDL op chemokine uitscheiding en celdeling van gladde spiercellen. Deze bevindingen zijn van grote waarde met betrekking tot de huidige atherosclerose therapie. Momenteel worden kransslagader interventies, zoals stentimplantaties, veel gebruikt bij atherosclerose patiënten. Echter resulteren deze interventies vaak in overmatige neointima hyperplasie (gladde spiercel groei) waardoor restenose en vroeg stent falen veroorzaakt wordt. Het remmen van gladde spiercel ontsteking en in het bijzonder de celdeling kan in dit opzicht gunstig werken.

Hoofdstuk 7 richt zich op de effecten van HDL op macrofagen. In tegenstelling tot het verwachte anti-inflammatoire effect, hebben we verrassenderwijs *in vitro* pro-inflammatoire effecten van HDL op zowel muizen als humane macrofagen waargenomen, resulterende in verhoogde TNF- α en IL-12 uitscheiding, terwijl IL-10 uitscheiding verminderd was. *In vivo* pre-incubatie van macrofagen met hoge niveaus van HDL in ApoA-I transgene muizen resulteerde ook in een meer pro-inflammatoir fenotype van macrofagen uit deze muizen vergeleken met controle muizen. Met behulp van macrofagen uit specifieke cholesterol transporter (ABCA1 en ABCG1) en scavenger receptor (SR-B1 en CD36) deficiënte muizen, toonden we aan dat geen van deze klassieke transporters betrokken waren bij deze inflammatoire effecten. Echter bleek HDL membraancholesterol via een passieve wijze te extraheren uit macrofagen. De verstoring van cholesterolrijke gebieden in het membraan door cholesterol onttrekking kan grote invloed hebben op intracellulaire signaaloverdracht. Derhalve hebben we het effect van HDL op verschillende signaalroutes bepaald. NF- κ B, in het bijzonder p65, werd geactiveerd door HDL incubatie, hoewel geen van de beschreven activeringsroutes stroomopwaarts betrokken leken bij dit proces, wat aangeeft dat HDL leidt tot directe fosforylering en derhalve activering van p65. Deze fosforylering

kan worden gemedieerd door proteïne kinase C, die ook essentieel bleek te zijn voor de waargenomen inflammatoire effecten. Daarnaast toonden wij een rol aan voor STAT1 signalering bij het mediëren van IL-12 en IL-10 secretie en ADAM proteasen bij het mediëren van TNF- α secretie. Deze resultaten accentueren de urgentie van het verkrijgen van meer inzicht in de cel specifieke effecten van HDL.

Tenslotte werden in **hoofdstuk 8** de belangrijkste resultaten van dit proefschrift besproken en in perspectief tot andere literatuur geplaatst. De cel specifieke effecten beschreven in dit proefschrift zijn in het bijzonder van belang voor de ontwikkeling van doelgerichte therapieën, waardoor de klinische resultaten in een ziektegerelateerde en patiënt specifieke manier gemoduleerd kunnen worden. Voor therapie gericht op ADAMs is toekomstig onderzoek, waar de precieze regulatie, specificiteit en compensatie door andere ADAMs wordt ontrafeld *in vivo*, een vereiste. Voor HDL gebaseerde therapieën zal het zeer belangrijk zijn om toekomstig onderzoek te richten op de effecten van specifieke subtypen HDL en HDL bestanddelen. Tezamen laten de resultaten in dit proefschrift diverse cel specifieke effecten van ADAMs en HDL op vasculaire ontsteking zien.