

Annexin A1 and annexin A5 in cardiovascular disease

Citation for published version (APA):

Kusters, D. H. M. (2015). *Annexin A1 and annexin A5 in cardiovascular disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20150206dk>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150206dk](https://doi.org/10.26481/dis.20150206dk)

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

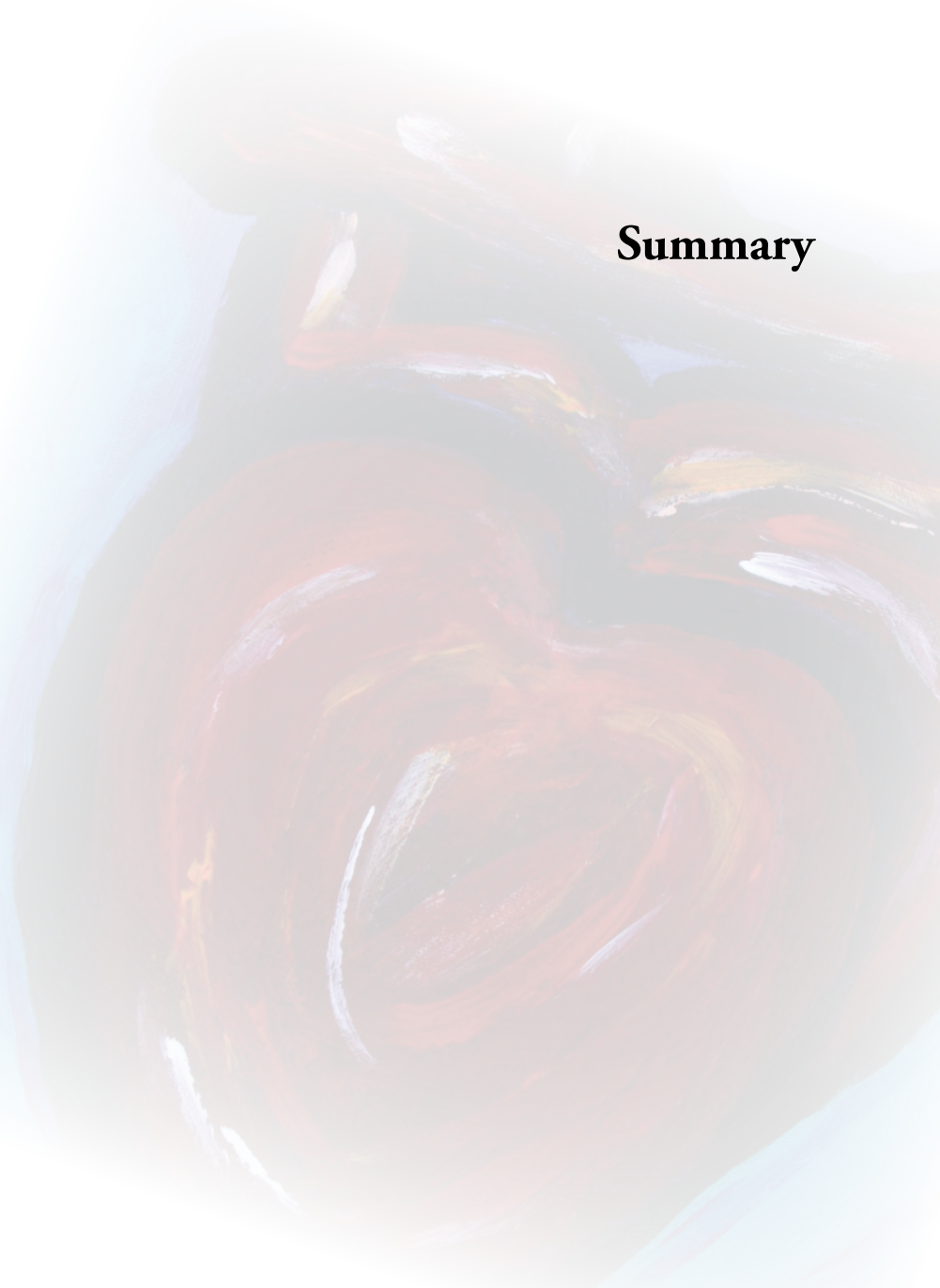
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Addendum I

Summary



Summary

In this thesis main focus was on the role of annexin A1 (anxA1) and annexin A5 (anxA5) in cardiovascular disease with emphasis on atherosclerosis and ischemia-reperfusion injury. **Chapter 1** highlights the importance of cardiovascular disease and potential roles that anxA1 and anxA5 may have herein. Atherosclerosis is initiated by dysfunctional endothelial cells and consequent leakage of plasma low density lipoprotein (LDL cholesterol) into the *tunica intima* of arteries. Oxidation of LDL activates endothelial cells and subsequently leads to the recruitment of inflammatory cells in an attempt to remove the cholesterol. Migration of monocytes into the *tunica intima* and subsequent differentiation into macrophages initializes the inflammatory response. Excessive uptake and accumulation of cholesterol in combination with ineffective secretion will lead to the formation of 'foamy' cells that lose the ability to egress from the plaque and eventually will die. The build-up of apoptotic/necrotic cells in combination with the inflammatory status of the plaque is a very good predictor of plaque vulnerability and can therefore form a target for molecular imaging as discussed in **chapter 2**.

Viable cells retain a phospholipid asymmetry in which they confine their phosphatidylserine (PS) predominantly to the inner leaflet of the plasma membrane. Externalization of PS is one of the first hallmarks of stressed and dying cells. The two most important ways that cells can die are apoptosis and necrosis. Apoptosis is programmed and anti-inflammatory while necrosis is accidental and proinflammatory. Both during apoptosis and necrosis PS exposure serves as the most pronounced pro-phagocytotic 'eat-me' signal. AnxA5 binds with high affinity to PS thereby inhibiting phagocytosis, either simply by shielding PS from the phagocyte or even complete internalization of PS. In **chapter 3** we report the impact of anxA5 depletion on atherosclerotic plaque development and progression. We found that anxA5 deficient macrophages display increased phagocytotic activity and in this way decrease plaque formation. Moreover, plaques of the anxA5 mice had less apoptotic cells and no significant necrotic core development. This finding was not caused by a difference in cell viability, but rather a difference in cell clearance. The decrease in plaque development was more pronounced in the aortic arch than in the brachiocephalic artery, possibly due to a difference in developmental speed and/or different developmental origin of the vascular cells.

The previous chapter underlines the importance of proper efferocytosis in atherosclerotic

plaque development, so we decided to use this property in the next chapter. AnxA1 is known to be an opsonin of apoptotic cells and to facilitate phagocytosis thereby inducing an anti-inflammatory response. In addition to the opsonization, anxA1 can directly affect leukocytes by outside-in signaling through the receptor for formylated peptides (FPR). Treatment of atherosclerosis prone mice with anxA1 is the main focus of **chapter 4**. We found that administration of anxA1 inhibits plaque growth and improves plaque stability. Treatment with anxA1 decreased necrotic core growth by inhibiting recruitment of neutrophils towards the plaque and/or by increasing phagocytosis of dying and dead cells.

Eventually, vulnerable plaques may rupture and release their prothrombotic content leading to thrombus formation. Occlusion of an artery by this thrombus causes ischemia and subsequent cell death. Surrounding tissue senses the ischemic damage and activates the immune system. Like in normal wound healing, neutrophils are the first cells to respond and migrate towards the infarcted area. In a complex cascade of events, neutrophils release reactive oxygen species (ROS), proinflammatory cytokines and chemokines and neutrophil extracellular traps (NETs). This results in reperfusion injury and causes enhanced cell death. The potential to intervene with neutrophil recruitment and activity using anxA1 and antithrombin affinity depleted heparin (AADH) is investigated in **Chapter 5**. AnxA1 and AADH were successful to reduce the infarct size and attain a trend towards increased functionality. This result may be neutrophil independent, since the amount of infiltrated neutrophils was unaffected after 24 hours of reperfusion.

In order to further increase the anti-inflammatory potential of anxA1, more knowledge about the exact *modus operandi* is needed. Structural studies using nuclear magnetic resonance (NMR) analysis with isotopically labeled proteins provides information about the orientation and behavioral properties of the protein in several (sub)physiological conditions. **Chapter 6** describes different conformations of anxA1 in the presence or absence of calcium and a phospholipid surface. While anxA1 has three ‘closed’ conformations in the absence of calcium, the addition of calcium changes the conformation towards a single stable ‘open’ conformation. This knowledge may lead to the design of augmented forms of anxA1 that possess increased functionality.

Finally, **chapter 7** discusses the key findings of this thesis and highlights the possible clinical significance in relation to current literature, **Addendum I and II** summarize the thesis in english and dutch and **Addendum III** reports a short valorization.

Addendum II

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

In dit proefschrift ligt de focus op de rol van annexine A1 (anxA1) en annexine A5 (anxA5) in hart- en vaatziekten en met nadruk op atherosclerose en ischemie-reperfusie schade. **Hoofdstuk 1** toont het belang aan van het onderzoek en geeft algemene uitleg over hart- en vaatziekten en speculeert over de mogelijke bijdrage die deze annexines hierin hebben. Atherosclerose wordt geïnitieerd door slecht functionerende endotheelcellen, wat als gevolg heeft dat er lekkage optreedt van plasma 'lage dichtheid lipoproteïne cholesterol' (LDL cholesterol) in de *tunica intima* van de slagaders. Een oxidatie reactie van dit LDL activeert endotheelcellen, die er vervolgens voor zorgen dat ontstekingscellen worden aangetrokken in een poging om het geoxideerd LDL te verwijderen. Migratie van monocyt en de daaropvolgende specialisatie tot macrofagen is het begin van de ontstekingsreactie. Overmatige opname van cholesterol in combinatie met ineffectief uitscheiden leidt tot intracellulaire accumulatie en de vorming van zogenaamde 'schuim' cellen. Deze cellen verliezen het vermogen om uit de plaque te migreren en zullen hier uiteindelijk doodgaan. De opstapeling van deze dode cellen in combinatie met de ontstekingsreactie in de plaque is een zeer goede voorspeller van de kwetsbaarheid van een plaque en vormt daardoor een perfect doel voor moleculaire beeldvorming, zoals besproken wordt in **hoofdstuk 2**.

Levende cellen zorgen voor een asymmetrie van de membraan fosfolipiden, met het fosfolipide fosfatidylserine (PS) voornamelijk gelokaliseerd aan de binnenzijde. Het naar buiten transporteren van PS is een van de eerste kenmerken van cellen die stress ervaren en van cellen die doodgaan. De twee belangrijkste manieren van celdood zijn apoptose en necrose. Hierbij is het verschil dat apoptose geprogrammeerd en ontstekingsremmend is, terwijl necrose ongepland is en ontsteking opwekt. Zowel bij apoptose als necrose is PS beschikbaar en vormt daarmee het meest bekende 'eet-mij' signaal voor fagocyten. Het eiwit anxA5 bindt met hoge affiniteit aan PS en remt hiermee de opruiming van deze cellen. Enerzijds door simpelweg PS af te schermen voor de fagocyt, anderzijds door de PS terug naar de binnenkant van de cel te transporteren. In **hoofdstuk 3** beschrijven we de functie van anxA5-depletie op het ontstaan en de ontwikkeling van atherosclerotische plaques in een muismodel voor atherosclerose. We laten zien dat anxA5 deficiënte macrofagen een verhoogde fagocytose vertonen en op die manier atherosclerose afremmen. Bovendien hadden de plaques van de anxA5 deficiënte muizen minder apoptotische cellen en geen grote necrotische kern ontwikkeld. We hebben aangetoond dat dit resultaat niet werd

veroorzaakt door een verschil in verminderde gevoeligheid voor apoptose, maar door een verschil in verbeterde opruiming van apoptotische cellen door de fagocyten. De afname van plaque ontwikkeling was meer uitgesproken in de aortaboog in vergelijking met de eerste aftakking (de truncus brachiocephalicus), wat mogelijk een gevolg is van een verschillende snelheid van ontwikkeling en/of een verschillende embryonale oorsprong van de vasculaire cellen.

In het vorige hoofdstuk is het belang van goede efferocytosis met betrekking tot atherosclerotische plaque ontwikkeling benadrukt. We hebben besloten om deze eigenschap te gebruiken in het volgende hoofdstuk. AnxA1 speelt een belangrijke stimulerende rol bij het opruimen van apoptotische cellen en wekt daarbij een ontstekingsremmende respons op. Hiernaast kan anxA1 ook direct invloed uitoefenen op witte bloedcellen door zogenaamde “outside-in” signalering via de receptor voor geformyleerde peptiden (FPR). De behandeling met anxA1 van muizen die vatbaar zijn voor atherosclerose is het onderwerp van **hoofdstuk 4**. We laten zien dat toediening van anxA1 de plaque groei remt en de stabiliteit verbetert. Behandeling met anxA1 resulteert bovendien in verminderde groei van de necrotische kern. Enerzijds komt dit door directe remming van neutrofiel infiltratie in de plaque en anderzijds door het verbeteren van de fagocytose van apoptotische en necrotische cellen.

Uiteindelijk kunnen plaques scheuren waarbij de stollingsgevoelige inhoud vrij komt en tot de vorming van een trombus leidt. Verstopping van een bloedvat door dit stolsel zorgt voor zuurstoftekort in het onderliggende weefsel met uiteindelijk celdood tot gevolg. Omliggend weefsel neemt deze celdood waar en activeert het immuunsysteem. Evenals bij normale wondgenezing zijn de neutrofielen de eerste cellen die reageren en migreren naar het infarctgebied. Door middel van een complexe cascade zorgen neutrofielen voor de uitstoot van reactieve zuurstofradicalen (ROS), pro-inflammatoire cytokines en chemokines en neutrofiel extracellulaire vallen (NETs). De combinatie van voorgaande factoren zorgt voor de zogenaamde reperfusie schade en verergert de initiële schade veroorzaakt door het zuurstoftekort. Behandeling met anxA1 en een aangepaste vorm van heparine (AADH) is onderzocht in **hoofdstuk 5**. Deze behandelingen zijn gericht om de neutrofiel infiltratie en toxiciteit te verminderen. AnxA1 en AADH zorgen voor vermindering van infarctgrootte en neigen beide de functionaliteit van het hart te verbeteren. Dit resultaat is waarschijnlijk neutrofiel onafhankelijk, aangezien de hoeveelheid geïnfiltreerde neutrofielen na 24 uur reperfusie overanderd is.

Om de ontstekingsremmende activiteit van anxA1 te verhogen is meer kennis nodig over de *modus operandi*. Structurele studies door middel van nucleaire magnetische resonantie (NMR) geven informatie over de oriëntatie/conformatie en fysische eigenschappen van eiwitten in verschillende (sub)fysiologische condities. **Hoofdstuk 6** beschrijft de verschillende conformaties van anxA1 in aan- en afwezigheid van calcium en een oppervlak van fosfolipiden. Hoewel anxA1 drie verschillende “gesloten” conformaties heeft in afwezigheid van calcium, zorgt toevoeging van calcium ervoor dat deze verandert naar één enkele stabiele ‘open’ conformatie. Deze kennis kan leiden tot het ontwerp van aangepaste vormen van anxA1 die ervoor zorgen dat de ontstekingsremmende functionaliteit van het eiwit toeneemt.

Tot slot bediscussieert **hoofdstuk 7** de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift en wijst op mogelijke klinische relevantie in relatie tot de huidige literatuur. **Addendum I en II** geven een Engelse en Nederlandse samenvatting en **Addendum III** vermeldt kort een valorisatie van het onderzoek.