

# Molecular regulation of vascular calcification

Citation for published version (APA):

Dhore, C. R. (2005). *Molecular regulation of vascular calcification*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20050603cd>

## Document status and date:

Published: 01/01/2005

## DOI:

[10.26481/dis.20050603cd](https://doi.org/10.26481/dis.20050603cd)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that affects the inner layer (intima) of mainly large arteries. It is a disease characterized by several stages, starting at the first decade of life and progressing with age. As the primary cause of myocardial infarction, stroke and ischemia of the extremities, atherosclerosis is responsible for about 50% of all deaths in the western society. The etiology of atherosclerotic disease is multifactorial, and both hereditary and environmental factors accelerate atherosclerosis. Atherosclerotic plaques can lead to clinical manifestations by blocking the blood flow in the vessel or by thrombus formation. The different stages of atherosclerosis are morphologically well described; plaques responsible for blockade of the blood flow are mainly large and stable, while the thrombus forming plaques are ruptured, eroded or show calcified nodules. Vascular calcification in the intima is invariably associated with, and is a prominent feature of atherosclerosis. Disturbances in lipid metabolism, male sex, and hypertension aggravate atherosclerotic calcification. Calcification in plaques decreases vessel elasticity, and augments plaque brittleness. Atherosclerotic calcification is not restricted to large arteries, and can also occur in leaflets of aortic valves. Aortic valve calcification is associated with increased risk of cardiovascular events including stroke and cardiac death.

In the field of vascular calcification two main questions have been raised. The first question is whether atherosclerotic calcification stabilizes or destabilizes the plaque. The second question is whether vascular calcification is a passive, or active regulated process. Although the association of vascular calcification with atherosclerosis has been noted for centuries, its regulation has been largely ignored, because of the prevailing view that calcification was merely a degenerative, passive process of calcium phosphate precipitation that only occurs in end-stage atherosclerosis and simply signifies dying cells. By the discovery that bone-associated genes can be expressed in the vessel wall, it has become clear that vascular calcification may not be a passive process, but may be actively regulated. In this thesis we focus on the question whether vascular calcification is a passive or active regulated process and how vascular calcification is regulated.

Calcified atherosclerotic plaques can contain osteogenic elements such as bone cells, cartilage, calcium mineral, lamellar bone, nucleation sites (matrix vesicles) and bone regulatory proteins. The presence of these elements and the discovery that two bone matrix regulatory proteins, OPN and BMP-2 were present in human atherosclerotic plaques, demonstrate that atherosclerotic calcification has high similarity with bone calcification. Since bone calcification is regulated by more bone matrix proteins than only OPN and BMP-2, we hypothesized that other bone matrix proteins are also present in human atherosclerotic calcification, both in the vessel wall and aortic valve leaflets. In the second part of this thesis interventions with BMP-2, a highly osteo-inductive protein and one of the first bone matrix proteins described in atherosclerotic plaques, and bisphosphonates, drugs used in the treatment of

osteoporosis were performed in mouse models of atherosclerotic calcification. We hypothesized that enhanced BMP-2 gene expression accelerates atherosclerotic calcification and ossification and that bisphosphonates reduce vascular calcification.

In *chapter 2* we examined the protein expression of 7 bone matrix regulatory proteins and 2 modulators of osteoclastogenesis in all stages of human atherosclerosis. We observed that all these bone matrix proteins are expressed in the arterial wall. One set of proteins, known to belong to inhibitors of calcification, was present in all stages of human atherosclerosis. This suggests a continuous inhibition of calcification in the atherosclerotic vessel wall. The expression of a second set of proteins, known to belong to the activators of calcification, was restricted to advanced and calcified lesions. From this study we conclude that vascular calcification is actively regulated by both, inhibitors and activators of calcification.

Recent evidence indicates that aortic valve calcification is a well-regulated process that involves inflammation and lipid accumulation similar to those seen in human atherosclerosis. Vascular calcification is considered to be a risk factor for valvular calcification and recently published data indicate that aortic valve calcification is indeed associated with increased risk of cardiovascular events. Moreover, valvular and vascular calcifications are both considered to share similarities with skeletal bone formation. We therefore examined and described in *chapter 3* the protein expression of 7 bone matrix regulatory proteins and 2 modulators of osteoclastogenesis in both non-calcified and calcified aortic valves. Our data showed that the expression profile of bone matrix proteins in human aortic valves is comparable to the in *chapter 2* described profiles in human atherosclerotic plaques.

According to our data described in *chapter 2 and 3*, inhibitory proteins continuously prevent calcification, whereas the restricted presence of activators provide an imbalance, finally resulting in vascular and/or valvular calcification.

One of the activators of vascular calcification is BMP-2. BMP-2 is a member of the TGF $\beta$  super family, and is a potent inducer of bone formation and the first osteo-inductive protein found in atherosclerotic plaques. Since BMP-2 is highly osteo inductive, enhances proliferation and differentiation of osteogenic cells, and is present in atherosclerotic plaques we examined the intervention of BMP-2 gene expression on the atherosclerotic calcification process in *chapter 4*. Our data revealed not only that enhanced BMP-2 gene expression accelerated calcification and ossification in atherosclerotic plaques, but that enhanced BMP-2 gene expression also caused an altered bone matrix regulatory protein expression profile.

Another intervention we performed with bisphosphonates, a drug used for the treatment of osteoporosis, and is described in *chapter 5*. Therefore we used the N-containing bisphosphonate, risedronate in an atherosclerotic mouse model. Our data showed that risedronate enhanced bone mineral density of skeletal bones, but had no influence on the initiation and regression of atherosclerotic calcification in mice.

In *chapter 6* we summarize and discuss the data presented in the experimental chapters and provide some novel thoughts on the regulation of vascular calcification and on possibilities to intervene in this process.

The main conclusions derived from the studies described in this thesis are that both atherosclerotic and aortic valve calcifications are indeed actively regulated processes involving bone matrix regulatory proteins. This regulation involves both activators and inhibitors of calcification and bone formation. Furthermore, we conclude that BMP-2 is one of the major active regulators of vascular calcification, and that in an atherosclerotic mouse model bisphosphonates have no influence on vascular calcification when given in a dose that enhanced bone density.

## Samenvatting

Atherosclerose (aderverkalking) is een chronische systemische aandoening die de binnenste laag (intima) van voornamelijk de grote slagaders aantast. Kenmerkend voor deze ziekte zijn de verschillende stadia, beginnend in het eerste decennium van ons leven en verergerend naarmate men ouder wordt. Atherosclerose is de belangrijkste oorzaak van een hartinfarct, herseninfarct en beperkte bloedvoorziening in de extremiteiten en is hierdoor verantwoordelijk voor ongeveer 50% van alle sterfgevallen in de Westerse samenleving. De oorzaak van atherosclerose is multi-factorieel. Zowel erfelijke als omgevingsfactoren versnellen de vorming van atherosclerose. Atherosclerotische plaques kunnen leiden tot klinische verschijnselen doordat de bloedstroom in een bloedvat door de plaque geblokkeerd wordt of omdat er een bloedstolsel ontstaat. De verschillende stadia van atherosclerose zijn morfologisch goed beschreven; plaques verantwoordelijk voor de blokkade van de bloedstroom zijn voornamelijk groot en stabiel, terwijl de bloedstolsel vormende plaques geruptureerd (gescheurd) of geërodeerd zijn, of gecalcificeerde (verkalkte) structuren vertonen. Vaatverkalking in de intima is niet alleen geassocieerd met atherosclerose, het is ook een belangrijk kenmerk van atherosclerose. Veranderingen in vetstofwisseling, het mannelijk geslacht en hoge bloeddruk dragen bij aan het ontstaan van atherosclerotische verkalking. Verkalking in plaques vermindert de elasticiteit van het bloedvat, verhoogt de breekbaarheid van de plaque en leidt tot een toegenomen risico voor het ruptureren van de plaques gedurende dotteren. Atherosclerotische verkalking beperkt zich niet tot de grote slagaders, het kan ook voorkomen in de aortakleppen. Aortaklepverkalking is geassocieerd met een toegenomen risico voor hart- en vaataandoeningen inclusief herseninfarcten en hartstilstand.

In het onderzoeksgebied van vaatverkalking zijn twee belangrijke vragen aan de orde. De eerste vraag is of atherosclerotische verkalking de plaque stabiliseert of destabiliseert. De tweede vraag is of vaatverkalking een passief of een actief gereguleerd proces is. Hoewel de associatie tussen vaatverkalking en atherosclerose al eeuwen geleden gemaakt is, heeft men zich nooit verdiept in de regulatie ervan, omdat men dacht dat verkalking een degeneratief, passief proces van calciumfosfaat neerslag was dat alleen voorkwam in het laatste stadium van atherosclerose als gevolg van een ophoping van dode cellen. Door de ontdekking dat bot geassocieerde genen tot expressie kunnen komen in de vaatwand, is het duidelijk geworden dat vaatverkalking niet zomaar een passief proces is, maar dat het mogelijk actief gereguleerd wordt.

Verkalkte atherosclerotische plaques kunnen bot gerelateerde elementen bevatten zoals botcellen, kraakbeen, calciummineraal, volledig uitgegroeid bot, aanhechtingsplaatsen voor botvorming en bot regulerende eiwitten. Door de aanwezigheid van deze elementen en door de ontdekking dat er twee botmatrix regulerende eiwitten, OPN en BMP-2 aanwezig zijn in humane atherosclerotische plaques weet men nu dat atherosclerotische verkalking grote overeenkomsten vertoont

met botverkalking. Doordat botverkalking gereguleerd wordt door meer botmatrix eiwitten dan alleen OPN en BMP-2, hebben wij de hypothese opgesteld dat andere botmatrix eiwitten ook aanwezig zijn in humane atherosclerotische verkalking, zowel de vaatwand als in aortakleppen. In het tweede deel van dit proefschrift worden twee interventie studies beschreven. De ene interventie is gedaan met BMP-2, een krachtig botvorming inducerend eiwit en tevens een van de eerste botmatrix eiwitten beschreven in atherosclerotische plaques. De andere interventie met bisfosfonaten, een medicijn gebruikt voor de behandeling van osteoporose (botontkalking). Beide interventies zijn uitgevoerd in een muismodel dat atherosclerotische verkalking ontwikkelt. Onze hypothese was dat een verhoogde BMP-2 genexpressie zorgt voor een versnelde atherosclerotische verkalking en botvorming en dat bisfosfonaten vaatverkalking kunnen verminderen.

In *hoofdstuk 2* hebben we gekeken naar de eiwit expressie van 7 botmatrix regulerende eiwitten en 2 modulators van osteoclastogenese (vorming van botafbraak cellen) in alle stadia van atherosclerose. We hebben geobserveerd dat al deze botmatrix eiwitten tot expressie komen in de vaatwand. Eén set eiwitten, behorend tot de remmers van verkalking, was aanwezig in alle stadia van atherosclerose. Dit suggereert een continue remming van verkalking in de atherosclerotische vaatwand. De expressie van een tweede set van eiwitten, behorend tot de activatoren van verkalking, was beperkt tot de vergevorderde en verkalkte plaques. Uit de resultaten van deze studie concluderen wij dat vaatverkalking actief gereguleerd wordt door zowel remmers als activatoren van verkalking.

Recent bewijs geeft aanwijzingen dat aortaklepverkalking een goed gereguleerd proces is met aanwezigheid van ontsteking en vetophoping in overeenstemming met humane atherosclerose. Vaatverkalking wordt beschouwd als een risicofactor voor klepverkalking en recentelijk gepubliceerde data wijzen in de richting dat aortaklepverkalking weldegelijk geassocieerd is met een verhoogd risico op hart- en vaataandoeningen. Bovendien vertonen zowel klep- als vaatverkalkingen grote overeenkomsten met skeletale botvorming. Daarom hebben we in *hoofdstuk 3* de eiwit expressie van 7 botmatrix regulerende eiwitten en 2 modulators van osteoclastogenese onderzocht en beschreven in zowel niet verkalkte als verkalkte aortakleppen. Onze data laten zien dat het eiwit expressiepatroon in de humane aortakleppen vergelijkbaar is met het in *hoofdstuk 2* beschreven eiwitpatroon in humane atherosclerotische plaques.

Volgens onze data beschreven in *hoofdstuk 2 en 3*, zijn het de remmende eiwitten die continu voorkomen dat er verkalking plaats vindt, terwijl de beperkte aanwezigheid van de activatoren zorgen voor een disbalans, die uiteindelijk resulteert in vaat- en/ of klepverkalking.

Eén van de activatoren van vaatverkalking is BMP-2. BMP-2 behoort tot de TGF $\beta$  superfamilie, en is een krachtige aandrijver van botvorming en het eerst botinducerende eiwit dat gevonden is in atherosclerotische plaques. Omdat BMP-2 zo sterk osteo-inductief is, zorgt voor versnelde deling en differentiatie van osteogene (bot) cellen, en omdat BMP-2 aanwezig is in atherosclerotische plaques hebben we in *hoofdstuk 4* de effecten van een toegenomen BMP-2 genexpressie op het atherosclerotische verkalkingproces beschreven. Onze data tonen aan dat een verhoogde BMP-2 genexpressie niet alleen maar leidt tot versnelde verkalking en botvorming in atherosclerotische plaques, maar ook een veranderd botmatrix regulerend eiwit expressiepatroon veroorzaakt.

De effecten van de interventie met bisfosfonaten, een medicijn dat gebruikt wordt bij de behandeling van osteoporose (botontkalking) wordt beschreven in *hoofdstuk 5*. We hebben hiervoor het N-bevattende bisfosfonaat risedronate gebruikt in een atherosclerotisch muismodel. Uit de resultaten van deze studie blijkt dat risedronate wel zorgt voor een verhoogde botdichtheid van skeletbeenderen, maar geen invloed heeft op zowel het ontstaan van als het terugdringen van verkalkte atherosclerotische plaques in muizen.

In *hoofdstuk 6* worden de bevindingen die beschreven worden in de experimentele hoofdstukken samengevat en bediscussieerd. Dit laatste hoofdstuk verschaft ook een aantal nieuwe gedachten over de regulatie van vaatverkalking en over de mogelijkheden om in dit proces in te grijpen.

De hoofdconclusies van de studies die in dit proefschrift worden beschreven zijn dat zowel atherosclerotische verkalking als ook aortaklepverkalking wel degelijk actief gereguleerde processen zijn waarbij botmatrix regulerende eiwitten betrokken zijn. Bij deze regulatie zijn zowel de activatoren als ook de remmers van verkalking en botvorming betrokken. Bovendien concluderen we dat BMP-2 één van de belangrijkste actieve regulatoren is van vaatverkalking, en dat behandeling met bisfosfonaten in een atherosclerotisch muismodel géén invloed heeft op vaatverkalking, hoewel de gegeven dosis wel zorgt voor een verhoging van de botdichtheid van de skeletbeenderen.