

# Platelets and platelet extracellular vesicles as messengers in vascular inflammation

## Citation for published version (APA):

Vajen, T. (2017). *Platelets and platelet extracellular vesicles as messengers in vascular inflammation*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20171109tv>

## Document status and date:

Published: 01/01/2017

## DOI:

[10.26481/dis.20171109tv](https://doi.org/10.26481/dis.20171109tv)

## 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

The present thesis aimed to elucidate the function, interaction and communication of platelets and platelet extracellular vesicles (platelet EV) with immune and vascular cells in the context of vascular inflammation. Particularly we aimed to investigate the role of platelets and platelet EV during vascular inflammatory processes during vascular remodeling and acute cardiovascular events such as myocardial infarction/reperfusion (I/R) and subsequent invasive interventions i.e. vascular injury following stenting.

**Chapter 1** describes the processes during vascular remodeling and the role and function of platelets or platelet EV and their mediators during the interaction to vascular and immune cells. Following the introduction, the aims and outlines of this thesis are given.

**Chapter 2** gives a literature overview on platelets and particularly platelet EV regarding release, quantification, occurrence during disease and pathophysiological relevance in cardiovascular disease. The field of (platelet) extracellular vesicles has gained increasing attention during the past decade and EV might represent a novel complex mechanism of cellular communication. However, isolation, quantification and characterization of platelet EV in biologic specimen remains challenging due to their small size and heterogeneity.

**Chapter 3** describes an *in-vitro* laminar flow-based assay to investigate molecular mechanisms of leukocyte recruitment during vascular inflammatory processes. This *in-vitro* assay was used within this thesis to study the molecular mechanisms that underlie the interactions between leukocytes and their cellular partners in different models of vascular inflammation.

**Chapter 4** investigates the pro-inflammatory role of platelet EV released from aging platelets in the functional modulation of smooth muscle cells (SMC). Under resting conditions, platelet EV firmly bound to SMC through the platelet integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$ , while binding also occurred upon cytokine stimulation in a CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1-dependent manner. Platelet EV induced a synthetic SMC morphology and decreased the expression of the contractile protein calponin. Moreover,

platelet EV induced a pro-inflammatory SMC phenotype, characterized by the increased SMC proliferation, migration, cytokine release and recruitment of monocytic cells. Platelet EV confer inflammatory signals to SMC by presenting a source of platelet factor 4 (PF4, CXCL4) and membrane-bound effectors e.g. integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , P-selectin, CD40L and CD40.

In **Chapter 5**, a peptide that inhibits the heteromerization of platelet chemo-kines RANTES (CCL5) and PF4 (CXCL4) is evaluated in a mouse model of myocardial I/R. Inhibition of the heteromerization of the chemokines CCL5 and CXCL4 by MKEY during myocardial I/R reduced infarction size and preserved heart function. MKEY treatment significantly reduced the influx of inflammatory cells following myocardial I/R, as revealed by specific staining for neutrophils and monocyte/macrophages. Moreover, MKEY treatment lead to a significant reduction of citrullinated histone 3 in the infarcted tissue, indicating that MKEY can prevent the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) *in vivo*.

**Chapter 6** characterizes the role and function of Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) in platelets in neointima formation in a mouse model of vascular injury. Platelet-specific deletion of JAM-A lead to increased platelet coverage at the site of injury and increased adhesion of monocytic cells to activated JAM-A-deficient platelets. Neointimal lesion area was increased in JAM-A-deficient mice and the lesions showed an increased macrophage accumulation and proliferating smooth muscle cells (SMC) 2 weeks, but not 4 weeks after injury. A platelet gain-of-function by deletion of JAM-A accelerates neointima formation only during earlier phases after vascular injury, through an increased recruitment of leukocytes via the GPIb $\alpha$ - $\alpha_M\beta_2$  axis and the stimulation of SMC proliferation.

Finally, the results are critically discussed and translated to a clinically relevant context in **Chapter 7**. It is concluded that platelets and platelet EV play a pivotal role during vascular inflammatory processes. Moreover, the complexity and necessity to investigate the interactions of platelets and vascular cells to improve anti-platelet therapy or to identify novel biomarkers, are emphasized.

# Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift omvat de functie, interactie en communicatie van bloedplaatjes en hun extracellulaire vesikels (plaatjes-EV) met immuun en vasculaire cellen tijdens vasculaire ontsteking. In het bijzonder werd de rol van bloedplaatjes en plaatjes-EV tijdens vasculaire ontstekingsprocessen, gedurende vasculaire remodelering en acute cardiovasculaire gebeurtenissen zoals myocardiale ischemie/reperfusie (I/R) en de daaropvolgende invasieve interventies, zoals vaatverwonding na het plaatsen van een stent onderzocht.

In **hoofdstuk 1** worden de algemene processen beschreven die plaatsvinden tijdens vasculaire remodelering. Met name de rol en functie van bloedplaatjes en plaatjes-EV en hun mediators in de interactie met vasculaire- en immuun cellen. Na de introductie worden de doelstellingen en het thema van dit proefschrift beschreven.

**Hoofdstuk 2** geeft een literatuuroverzicht over bloedplaatjes en in het bijzonder plaatjes-EV met betrekking tot secretie, kwantificering en concentratie tijdens ziekte en pathofysiologische relevantie bij hart- en vaatziekten. Het onderzoeksthema (plaatjes) extracellulaire vesicles heeft het afgelopen decennium steeds meer aandacht gekregen en EV kunnen nieuwe deelnemers van een complex mechanisme cellulaire communicatie zijn. Isolatie, kwantificering en karakterisering van plaatjes-EV in biologische monsters blijft echter uitdagend vanwege hun kleine omvang en heterogeniteit.

**Hoofdstuk 3** beschrijft een *in-vitro* op laminaire stroom-gebaseerde meetmethode om moleculaire mechanismen van de interacties tussen leukocyten en hun cellulaire partners in verschillende modellen van vasculaire ontstekingen te bestuderen.

**Hoofdstuk 4** onderzoekt de rol van plaatjes-EV die vrijkomen tijdens de veroudering van bloedplaatjes op de functies en de morfologie van gladde spiercellen. Onder normale, niet-ontstekings omstandigheden werden plaatjes-EV gebonden aan gladde spiercellen via het bloedplaatjes integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Na cytokinestimulatie van de gladde spiercellen vond binding ook plaats via het CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1

ligand-receptorpaar. Behandeling van de gladde spiercellen met plaatjes-EV induceerden een synthetische morfologie en verminderden de expressie van het contractiele eiwit calponine. Bovendien veroorzaakten plaatjes-EV een pro-inflammatoir gladde spiercel fenotype, gekenmerkt door een verhoogde celdeling, migratie, cytokine secretie, uitscheiding en het aantrekken van monocytische cellen. Plaatjes-EV geeft inflammatoire signalen af aan gladde spiercellen af via plaatjes factor 4 (PF4, CXCL4) en membraangebonden effectoren, waaronder integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , P-selectine, CD40L en CD40.

In **hoofdstuk 5** wordt een peptide, dat de heterodimerisatie van bloedplaatjes-chemokinen RANTES (CCL5) en PF4 (CXCL4) remt, in een muismodel van myocardiale ischemie-reperfusie (I/R) geëvalueerd. Remming van de heterodimerisatie van de chemokines CCL5 en CXCL4 door MKEY tijdens de myocardiale I/R leidde tot een vermindering van de infarctgrootte en tot een behoud de hartfunctie. MKEY-behandeling verminderde het aantrekken van ontstekingscellen in het beschadigde weefsel significant na myocardiale I/R, zoals blijkt uit een specifieke kleuring voor neutrofielen en monocyten/macrofagen. Bovendien leidde MKEY-behandeling tot een significante vermindering van gecitrullineerd histon 3 in het infarctweefsel, wat erop duidt dat MKEY de vorming van neutrofiële extracellulaire traps (NETs) *in vivo* kan voorkomen.

**Hoofdstuk 6** karakteriseert de rol en functie van Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) op plaatjes in de vorming van neointima in een muismodel voor vaatverwonding. Plaatjes-specifieke deletie van JAM-A leidde tot verhoogde bloedplaatjes-aggregatie op de plaats van letsel en verhoogde hechting van monocytische cellen aan geactiveerde JAM-A-deficiënte plaatjes. Het neointimaal laesiegebied werd verhoogd in muizen met JAM-A-deficiënte bloedplaatjes en de laesies vertoonden een verhoogde accumulatie van macrofagen en delende gladde spiercellen na 2 weken. Deze effecten waren 4 weken na verwonding echter weer verdwenen. Door de verwijdering van JAM-A van bloedplaatjes wordt de vorming van de neointima alleen tijdens de vroegere fasen na vaatverwonding versneld, door middel van een versterkt aantrekken van leukocyten via de GPIb $\alpha$ - $\alpha_M\beta_2$ -as en door de stimulatie van de deling van gladde spiercellen.

Tenslotte worden de resultaten kritisch besproken en vertaald naar een klinisch relevante context in **hoofdstuk 7**. Dit proefschrift toont aan dat plaatjes en plaatjes EV een belangrijke rol spelen bij vasculaire ontstekingsprocessen. Bovendien worden de complexiteit en de noodzaak om de interacties van plaatjes en vaat- en immuuncellen te onderzoeken ter verbetering van anti-plaatjes therapie of

om nieuwe biomarkers te identificeren, benadrukt.

