

The effect of intra- and extracellular challenges on cellular responses in atherosclerosis

Citation for published version (APA):

van Kuijk, K. (2021). *The effect of intra- and extracellular challenges on cellular responses in atherosclerosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20210604kk>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20210604kk](https://doi.org/10.26481/dis.20210604kk)

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.

Chapter 9

Summary

Samenvatting

Summary

Cardiovascular diseases (CVD) are still the leading cause of deaths worldwide. Atherosclerosis is the main driving factor behind CVD, characterized by vascular lipid accumulation, inflammation and collagen deposition. These factors lead to the formation of an atherosclerotic plaque, which can eventually rupture and cause a blood clot. This in turn can cause obstruction of blood flow, followed by myocardial infarction or stroke. During plaque development, there is a balance between plaque stabilizing and destabilizing properties. This balance can be challenged by environmental stressors, such as lipids, and/or hypoxia. Macrophages can take up lipids and will become apoptotic, forming the necrotic core, a destabilizing characteristic. On the other hand, mesenchymal cells can produce extracellular matrix, a stabilizing characteristic. An imbalance in these characteristics could directly influence plaque phenotype and thus the risk of plaque rupture. In this dissertation we examined the influence of intra- and extracellular challenges on cellular responses of macrophages and fibroblasts, such as extracellular matrix production or cell death, in atherosclerosis.

In **chapter 2**, we investigated the role of chaperone mediated autophagy (CMA) in atherosclerosis. Here we made use of mouse models with either an overexpression or deficiency of the rate limiting enzyme for CMA, lysosome-associated membrane protein 2A (LAMP2A). Deficiency of LAMP2A led to more pro-inflammatory immune cells and dedifferentiation of smooth muscle cells, while overexpressed LAMP2A showed an opposite, atheroprotective phenotype. Interestingly, we found that low LAMP2A expression in human atherosclerotic plaques was associated with the development of a secondary cardiac event. Therefore we believe that CMA could be a novel target in treating cardiovascular disease.

As plaques are known to be hypoxic, we investigated multiple hypoxia signaling pathways in atherosclerosis (**Chapter 3 and 5**). Firstly, we discuss a potential role for hypoxia-sensor carbonic anhydrase IX (CAIX) as biomarker for cardiovascular disease in **chapter 3**. CAIX knock-out in macrophages led to an imbalance in pH and lactate, which is in line with its function as pH regulator. However, we were unable to show any additional effects of CAIX deficiency on macrophage phenotype. Detection of CAIX and its soluble form sCAIX in plaques and plasma, respectively, was only possible in a limited number of samples, but did not associate with CVD or cardiovascular events. Hence, these data suggest that (s)CAIX is not a suitable biomarker for CVD.

In **chapter 4**, we discuss a fast emerging technique in cardiovascular research: single cell sequencing (SCS). Among other subjects, we touch upon cell isolation methods, sequencing method selection, capturing cellular heterogeneity and current pitfalls in regards to SCS.

The link between hypoxia and atherosclerosis is further explored in **chapter 5**. Here we made use of myeloid prolyl hydroxylase domain proteins (PHDs) deficiency models to investigate their role on atherosclerosis development. PHD2 and PHD3, but not PHD1, knock-outs led to increased plaque size and higher susceptibility of macrophages to cell death. Moreover, we observed extensive fibrosis in plaques from PHD2 deficient mice. Cross-talk between macrophages and fibroblasts triggered the latter cell type to produce excessive amounts of collagen. These data show isoform-specific effects on myeloid cells and atherosclerosis. As PHD inhibitors are currently being prescribed to chronic kidney disease patients, more investigation would be needed to explore harmful effects on the cardiovascular system.

We further introduce fibroblasts and their role in atherosclerosis in **chapter 6**. Fibroblast heterogeneity and, as a consequence of that, the lack of specific cellular markers makes identification difficult. In this chapter we discuss their presence, plasticity, origin and cell-cell communication in healthy and atherosclerotic vasculature.

In **chapter 7**, we evaluated fibroblast heterogeneity in depth using SCS. Firstly, we could successfully distinguish fibroblasts from smooth muscle cells. This led to a fibroblast-specific signature of seven markers. Moreover, we were able to identify distinct fibroblast subsets, already present in healthy vasculature. These subsets were linked to different functions, such as vascular development, immune regulation and growth factor signaling. Each subset showed distinct correlation patterns to beneficial and detrimental plaque traits in human plaques. Therefore we think that these subsets could be of interest in the treatment of atherosclerosis.

Finally, we put all our findings in the broader perspective of atherosclerosis and cell specific responses in **chapter 8**. We discuss the numerous intra- and extracellular challenges touched upon in this dissertation and how they influence atherosclerosis development. Firstly, we discussed the potential beneficial role of CMA stimulation in atherosclerosis. Next, we evaluated whether hypoxia-sensor CAIX could serve as a potential biomarker in CVD. Then in the broader perspective of hypoxia, we discuss the differential role of each PHD isoform in atherosclerosis and more specifically, the role of PHD2 in pro-fibrotic paracrine communication. Lastly, we evaluated the role of fibroblasts in healthy and diseased vasculature and their great heterogeneity as explored by single cell sequencing.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn nog steeds de meest voorkomende doodsoorzaak wereldwijd. Aderverkalking, de drijfveer achter hart- en vaatziekten, wordt gekarakteriseerd door vasculaire vet accumulatie, inflammatie en extracellulaire matrix productie. Deze factoren leiden tot de vorming van een zogenoemde plaque in de vaatwand. De plaque kan uiteindelijk scheuren en leiden tot de formatie van een bloedpropje, wat vervolgens kan leiden tot een hart- of herseninfarct. Tijdens de ontwikkeling van een plaque is er een balans tussen stabiliserende en destabiliserende factoren. Deze balans kan worden verstoord door omgevingsfactoren, zoals lipiden of hypoxie. Macrofagen kunnen lipiden opnemen, wat celdood kan veroorzaken. Dit leidt vervolgens tot de formatie van een necrotische gebied in de plaque, een destabiliserende factor. Echter mesenchymale cellen kunnen extracellulaire matrix produceren, wat de plaque stabiliseert. Een disbalans in deze karakteristieken kan dus direct het plaque fenotype beïnvloeden en daarmee ook het risico op het scheuren van een plaque. In dit proefschrift hebben we gekeken naar de rol van intra- en extracellulaire stressors op cellulaire responses van macrofagen en fibroblasten, zoals extracellulaire matrix productie of celdood, in aderverkalking.

In **hoofdstuk 2** hebben we gekeken naar de rol van chaperon-gemedieerde autofagie (CMA) in aderverkalking. We hebben gebruik gemaakt van muis modellen die ofwel een over-expressie ofwel een deficiëntie hadden van het essentiële CMA enzym, LAMP2A. Defect LAMP2A leidde tot meer pro-inflammatoire immuun cellen en de-differentiatie van gladde spiercellen. Over-expressie van LAMP2A leidde daarentegen tot een tegenovergesteld, beschermend fenotype. Daarbij vonden we dat LAMP2A expressie in humane plaques correleerde aan de ontwikkeling van een tweede manifestatie gerelateerd aan hart- en vaatziekten. Deze bevindingen doen ons geloven dat CMA een nieuw target zou kunnen zijn voor de behandeling van hart- en vaatziekten.

Het is algemeen bekend dat plaques zuurstofarm zijn, ook wel hypoxisch genoemd. In dit proefschrift hebben we meerdere aspecten bekeken met betrekking tot hypoxie (**hoofdstuk 3 en 5**). Eerst bespreken we een mogelijke rol voor zuurstof-sensor carboanhydrase IX (CAIX) als voorspellende bio marker in hart- en vaatziekten in **hoofdstuk 3**. CAIX deficiëntie in macrofagen leidde tot een disbalans in pH en lactaat. Dit is in overeenkomst met de literatuur over de rol van CAIX in pH regulatie. Detectie van CAIX en de circulerende variant sCAIX in plaques en plasma, respectievelijk, was alleen mogelijk in een klein deel van het patiëntcohort en correleerde niet met hart- en vaatziekten of de manifestatie daarvan. Daarom concludeerden we dat (s)CAIX geen goede bio marker is in hart- en vaatziekten.

9 | Summary - Samenvatting

In **hoofdstuk 4** bespreken we een nieuwe techniek in het veld van hart- en vaatziekten, single cell sequencing (SCS). In dit hoofdstuk bediscussiëren we onder andere, cel isolatie methodes, het kiezen van de juiste sequencing methode, heterogeniteit en mogelijke valkuilen op het gebied van SCS.

De relatie tussen hypoxie en aderverkalking is nog verder onderzocht in **hoofdstuk 5**. Hier hebben we gebruik gemaakt van drie muismodellen die, enkel in myeloïde cellen, deficiënt zijn voor zuurstofsensoren prolyl hydroxylase domein eiwitten (PHD's). Vervolgens hebben we gekeken naar het effect van deze individuele deficiënties op aderverkalking. PHD2 en PHD3, maar niet PHD1, deficiëntie leidde tot grotere plaques en hogere vatbaarheid voor celdood onder macrofagen. Daarnaast zagen we grote hoeveelheden collageen in plaques van PHD2 deficiënte muizen. Communicatie tussen macrofagen en fibroblasten zorgde ervoor dat fibroblasten meer collageen produceerden. Deze data laten zien dat effecten van PHD's op aderverkalking isovorm-specifiek zijn. Inmiddels worden PHD remmers voorgeschreven aan patiënten met chronisch nierfalen en onze studie wijst uit dat er meer onderzoek gedaan moet worden om nadelige effecten op het hart- en vaatstelsel te voorkomen.

We verdiepen ons meer in de rol van fibroblasten in aderverkalking in **hoofdstuk 6**. Identificatie van fibroblasten is erg gecompliceerd: door hun heterogeniteit ontbreken goede cellulaire markers. In dit hoofdstuk bespreken we fibroblast aanwezigheid, plasticiteit, oorsprong en communicatie in gezonde en zieke vaten.

In **hoofdstuk 7**, evalueren we fibroblast heterogeniteit met behulp van SCS. Allereerst laten we zien dat het mogelijk is fibroblasten van gladde spiercellen te onderscheiden middels zeven specifieke markers. Daarnaast hebben we fibroblast subgroepen geïdentificeerd welke al aanwezig zijn in gezonde vaten. Diverse functies, zoals vaatontwikkeling, immuun regulatie en signalering van groeifactoren, konden aan deze subgroepen gelinkt worden. Ieder subgroep had verschillende correlaties met humane plaque karakteristieken, zoals plaque grootte. Dit laat zien dat deze subgroepen wellicht interessant kunnen zijn bij de behandeling van aderverkalking.

Uiteindelijk hebben we al onze bevindingen gebundeld en in een breder perspectief ten opzichte van aderverkalking gezet in **hoofdstuk 8**. We bediscussiëren hier verschillende intra- en extracellulaire stressors en hoe deze aderverkalking zouden kunnen beïnvloeden. Eerst bespreken we de mogelijk positieve rol van CMA in aderverkalking. Daarna evalueren we de capaciteit van zuurstofsensoren CAIX als bio marker in hart- en vaatziekten. Daaropvolgend bespreken we de rol van hypoxie in aderverkalking in een bredere context en de rol van elke PHD isovorm hierin. De rol van PHD2 in het veroorzaken van een fibrotisch plaque fenotype wordt hierin extra uitgelicht. Als laatste zullen we de rol van

fibroblasten in gezond en ziek vaatweefsel bespreken en hoe fibroblast heterogeniteit hierin een rol speelt.