

Painting proteins to study cardiovascular pathology

Citation for published version (APA):

Dickhout, A. (2022). *Painting proteins to study cardiovascular pathology*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken. <https://doi.org/10.26481/dis.20220224ad>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20220224ad](https://doi.org/10.26481/dis.20220224ad)

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 disease causes eminent morbidity and mortality across the globe. As the etiology is complex and diagnosis is often at a late stage of disease, deciphering molecular mechanisms underlying cardiovascular disease is vital to advance diagnosis and prevention. This thesis aims to elucidate molecular and cellular communication underlying cardiovascular pathology and is focused on the use of different imaging strategies. *Chapter one* provides a framework for this thesis by first explaining basic cellular interactions in (patho)physiological vascular biology, followed by a description of different imaging techniques to study cardiovascular pathology. Imaging vascular disease in the clinic is briefly touched upon, after which different preclinical *in vitro* and *in vivo* imaging techniques are discussed.

Every cell has the ability to secrete extracellular vesicles (EVs). *Chapter two* describes the potential of EVs as biomarkers in cardiovascular disease. The chapter is a literature review on the chances and risks of using EVs as (prognostic) biomarkers, as content, count and origin provide valuable information. EV research is complicated, most notably due to the small size of the vesicles. Isolation methods, measurement and characterization principles, and cellular origin are discussed, as well as recent examples of clinical studies, which are still mostly single-center retrospective studies.

Cells can communicate through numerous proteins. Chemokines (chemotactic cytokines) are proteins that are responsible for recruiting leukocytes to the vessel wall. *Chapter three* investigates the fate of platelet chemokines CCL5 and CXCL4 after deposition on endothelial cells *in vitro*. Endothelial cells were incubated with chemokines, and localization was studied. We found CXCL4 to be localized partly on the membrane, and partly internalized in endothelial cells, in contrast to CCL5 which was all internalized quickly, and no CCL5 was left on the cellular membrane. Intracellular, both chemokines localized partly to the nucleus. The internalization was found to be rapid and active endocytosis dependent on dynamin, clathrin, and G protein-coupled receptors (GPCRs), but not on surface proteoglycans. Intracellular calcium signals were increased by chemokine treatment, however, monocyte recruitment under flow conditions was unaltered.

Chapter four describes a versatile laminar flow-based assay to study leukocyte interactions with vascular cells or platelets. In this methodologic paper, we provide a detailed protocol that can be adjusted based on the specific interactions to be studied, for both human and murine cells.

Chapter five is a study using different high-resolution microscopy techniques to analyze the localization of CXCL4 and CCL5 in resting platelets. Both are α -granule proteins, but previous studies suggest differential release. As heterodimerization of CCL5 and CXCL4 is important in their inflammatory function, localization in resting platelets is important. In this paper, we showed that CCL5 and CXCL4 in resting platelets can be imaged with light microscopy, electron microscopy, and combined light and electron microscopy. The results suggested there is differential storage of CCL5 and CXCL4 in α -granules.

Chemokines can also form heterodimers with galectins. *Chapter six* investigates platelet stimulation by galectin-1 and CXCL4. We found that both proteins stimulate platelets in a complementary manner, as galectin-1 stimulation resulted in robust activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ without expression of P-selectin, whereas CXCL4 stimulation failed to induce an $\alpha_{IIb}\beta_3$ response but did lead to P-selectin expression. Pre-incubation of the galectin and chemokine led to additive platelet activation rather than a synergistic response. Desialylation of platelets led to a higher galectin-1 binding and response in contrast to expectation, and despite unaltered P-selectin and higher PS-exposure on desialylated platelets stimulated with CXCL4, aggregation was completely abolished.

To image thrombosis *in vivo*, molecular imaging can be used. In *chapter seven*, we studied a fibrin-targeting molecular imaging tracer. Early during thrombus formation, α_2 -antiplasmin is cross-linked to fibrin by FXIIIa, to prevent early clot lysis. Exploiting this enzymatic cross-linking activity, tracers were previously developed based on α_2 -antiplasmin. In the present study, we tested the solubility-optimized tracer A16 *in vitro* in both human and murine plasma thrombi, and next in two *in vivo* murine venous thrombosis models. We obtained specific cross-linking of the probe both in human and murine plasma thrombi, and *in vivo*, SPECT/CT revealed a hotspot at the thrombus site, as well as renal clearance and no other organ uptake of the radioactivity.

Finally, *chapter eight* discusses the main findings of the above-described studies and places them relative to current literature. The importance of the studies are commented upon and future recommendations to advance early diagnosis and prognosis of CVD are given. Finally, the use of animal models in medical research is touched upon.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten hebben een ingrijpende impact op de volksgezondheid. Alle hart- en vaatziekten samen zijn de belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd, en de gevolgen van onderliggend lijden kunnen desastreus zijn. De etiologie is complex en multifactorieel, en de aandoeningen worden vaak laat gediagnosticeerd. Hierdoor is het van essentieel belang om moleculaire mechanismen onderliggend aan hart- en vaatlijden te ontcijferen, om diagnose en preventie te optimaliseren. Het doel van dit proefschrift is om moleculaire en cellulaire communicatie tussen het bloed en de vaatwand in kaart te brengen, geconcentreerd rondom het gebruik van verschillende beeldvormingstechnieken. *Hoofdstuk één* is een theoretisch kader voor dit proefschrift, waar cellulaire interacties in (patho)fysiologische vasculaire biologie worden uitgelegd, gevolgd door een beschrijving van verschillende beeldvormende technieken die worden gebruikt om hart- en vaatziekten te bestuderen. Daarnaast wordt beeldvorming van vasculaire ziekten in de kliniek kort uitgelegd, waarna verschillende preklinische *in vitro* en *in vivo* technieken worden bediscussieerd.

Iedere cel heeft de mogelijkheid tot het uitscheiden van blaasjes, extracellulaire vesikels (EVs). *Hoofdstuk twee* beschrijft de potentie en het risico van het gebruik van deze EVs als biomarkers voor hart- en vaatziekten. De inhoud, aantallen en oorsprong van de vesikels kan prognostische waarde hebben, maar het onderzoek naar EVs is complex vanwege het kleine formaat. Isolatie- en meetmethodes, karakteriseringsprincipes en de cellulaire oorsprong worden bediscussieerd, alsmede recente voorbeelden van klinische studies, vooralsnog meest *single-center* retrospectieve onderzoeken.

Cellen communiceren met elkaar via een verscheidenheid aan eiwitten. Chemokinen (chemotactische cytokinen) zijn eiwitten die hoofdzakelijk verantwoordelijk zijn voor het rekruteren van witte bloedcellen naar de vaatwand. In *hoofdstuk drie* wordt onderzocht wat er gebeurt met de bloedplaatjes chemokinen CCL5 en CXCL4 nadat ze op endotheelcellen worden afgezet. Endotheelcellen werden geïncubeerd met de chemokinen, waarna de localisatie werd bestudeerd met microscopie en ELISA. CXCL4 lokaliseerde gedeeltelijk op het celmembraan en werd gedeeltelijk geïnternaliseerd door de endotheelcellen. CCL5 daarentegen werd niet teruggevonden op het membraan maar werd volledig geïnternaliseerd. Intracellulair lokaliseerden de chemokinen gedeeltelijk naar de celkern en nucleoli. Het internaliseringsproces was snelle en actieve endocytose, en was afhankelijk van G-eiwit gekoppelde receptoren en de klassieke endocytose eiwitten dynamine en clathrine. Enzymatische splitsing van de proteoglycanen had echter geen effect op internalisatie. Volgend op de opname van

chemokinen werd een verhoogd intracellulair calciumsignaal waargenomen, maar monocytenrekrutering onder fluïde condities veranderde niet door de opname van chemokinen in endotheelcellen.

Hoofdstuk vier beschrijft een microscopische opstelling om cellulaire communicatie tussen leukocyten en bloedplaatjes of vasculaire cellen onder fluïde condities te bestuderen. Dit hoofdstuk bevat een gedetailleerd protocol waarmee met verschillende aanpassingen een verscheidenheid aan interacties bestudeerd kan worden tussen zowel humane of murine cellen.

In *hoofdstuk vijf* wordt de lokalisatie van de chemokinen CCL5 en CXCL4 in bloedplaatjes bestudeerd. Beide chemokinen zijn α -granule eiwitten, maar eerder onderzoek laat zien dat deze chemokinen differentieel kunnen worden vrijgegeven. Aangezien het vormen van heterodimeren van CCL5 en CXCL4 de inflammatoire functie versterkt en farmacologisch onderbroken kan worden, is de relatieve lokalisatie van de twee eiwitten in bloedplaatjes belangrijk. In dit hoofdstuk laten we de eiwit lokalisatie zien in rustende plaatjes met lichtmicroscopie, elektronenmicroscopie, en gecombineerde licht- en elektronenmicroscopie. De huidige opnames suggereren dat er inderdaad differentiële opslag is van de chemokinen in de α -granules van bloedplaatjes.

Chemokinen kunnen ook heterodimeren vormen met galectinen. In *hoofdstuk zes* wordt de stimulatie van bloedplaatjes door galectine-1 en CXCL4 bestudeerd. We laten zien dat galectine-1 de $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrine stimuleerde zonder P-selectine expressie, terwijl CXCL4-stimulatie een omgekeerde reactie veroorzaakte. Pre-incubatie van galectine-1 en CXCL4 veranderde de respons niet, en desialylatie van bloedplaatjes resulteerde in een hogere galectine-1 binding en reactie, en aggregatie bij lagere concentraties, tegenovergesteld van wat verwacht werd. De reactie van gedesialyleerde bloedplaatjes op CXCL4 was ongewijzigd, maar de aggregatie van deze bloedplaatjes was volledig afwezig.

Om trombose *in vivo* in beeld te brengen, kan gebruik gemaakt worden van moleculaire beeldvormingstechnieken. In *hoofdstuk zeven* is een fibrine-bindende tracer gebruikt om trombose in beeld te brengen. Vroeg in het proces van trombusvorming wordt het eiwit α_2 -antiplasminen aan fibrine gekoppeld door FXIIIa, om voortijdige lyse van de trombus te voorkomen. Dit enzymatische koppelingsmechanisme kan benut worden om een tracer aan de trombus te laten binden. Eerder zijn al tracers gemaakt gebaseerd op α_2 -antiplasminen. In de huidige studie is de oplosbaarheid van de tracer geoptimaliseerd, en vervolgens getest in humaan en murien bloed *in vitro*, en vervolgens in een murien

diep veneuze trombose model *in vivo*. Dit resulteerde in specifieke binding van de tracer aan de bloedstolsels en trombose, zowel *in vivo* als *in vitro*. De SPECT/CT scan gaf een hotspot weer op de plaats van de trombusvorming, en opname in nieren en blaas wees op renale klaring van de radioactiviteit.

Hoofdstuk acht is het laatste hoofdstuk, waarin de hierboven beschreven studies worden besproken in relatie tot de literatuur. Het belang van de studies wordt besproken, en er worden aanbevelingen gedaan waarop het beschreven werk kan worden voortgezet om (vroegere) diagnose en prognose van hart- en vaatziekten te verbeteren. Tenslotte wordt er kort stilgestaan bij het gebruik van diermodellen in de medische wetenschap.