



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Crosstalk between apoptosis and inflammation in atherosclerosis**

Westra, M.M.

### **Citation**

Westra, M. M. (2010, January 26). *Crosstalk between apoptosis and inflammation in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14616>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14616>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Nederlandse Samenvatting

Hart- en vaatziekten, zoals hartinfarct of beroerte, hebben meestal atherosclerose, ook wel aderverkalking genoemd, als oorzaak. Atherosclerose is een vaak progressieve verdikking van de vaatwand in grote en middelgrote slagaders, waarvan het ontstaan een proces is dat tientallen jaren in beslag neemt en dat vaak al begint in de tienerjaren. De belangrijkste risicofactoren voor de ontwikkeling van atherosclerose zijn een vet-rijk dieet, roken, gebrek aan lichaamsbeweging en hoge bloeddruk, geslacht en leeftijd. Daarnaast is er een erfelijke component die de ontwikkeling van atherosclerose kan beïnvloeden.

Bij het ontstaan van atherosclerose spelen zowel de ophoping van vetten in de wand van het bloedvat als het immuunsysteem een belangrijke rol. Een gezonde vaatwand bestaat uit endotheelcellen die een gladde spiercellaag bedekken. In het eerste stadium van plaque ontwikkeling raakt het endotheel lokaal geïrriteerd door de chronische blootstelling aan cholesterol in het bloed en hoge bloeddruk, en vindt lekkage door de vaatwand en ophoping van lipidemateriaal zoals cholesterol in de vaatwand plaats als gevolg waarvan endotheelcellen geactiveerd kunnen raken. Deze brengen vervolgens verschillende eiwitten tot expressie die de rekrutering van ontstekingscellen zoals monocyt en T cellen naar de vaatwand kunnen bevorderen. In de vaatwand differentieren de monocyt tot macrofagen die de opgehoopte lipiden kunnen opnemen leidend tot de vorming van zogenaamde schuimcellen. Wanneer de plaque zich verder ontwikkelt migreren gladde spiercellen vanuit de vaatwand naar de plaque en vormen een beschermend kapsel. In verder gevorderde stadia van atherosclerose heeft de plaque zich ontwikkeld tot een forse verdikking met een kern van vetmateriaal, schuimcellen en dood celmateriaal. Naarmate het ziekteproces vordert kunnen deze groter wordende plaques het bloedvat vernauwen of zelfs afsluiten waardoor de bloedtoevoer naar stroomafwaarts gelegen weefsel beperkt wordt. Daarnaast

kan een atherosclerotische plaque scheuren waarbij plaquemateriaal vrijkomt in de bloedbaan waardoor een omvangrijke ontstekingsreactie en vorming van een bloedstolsel kan ontstaan. Dit laatste proces kan gepaard gaan met de klinische symptomen als een hart- of herseninfarct.

Behandeling van hart- en vaatziekten is gericht op het verminderen van risicofactoren, zoals een verhoogd cholesterolgehalte in het bloed (statines), en chirurgische ingrepen zoals dotteren. In een groot aantal patienten hebben deze interventies helaas onvoldoende effect en dit legitimeert verder onderzoek naar de ontwikkeling van nieuwe, effectievere behandelmethode. De in dit proefschrift beschreven studies zijn uitgevoerd met als uiteindelijke doel om nieuwe aangrijpingspunten voor een effectievere therapie te identificeren.

De studies beschreven in dit proefschrift hebben voornamelijk betrekking op apoptose oftewel geprogrammeerde celdood. Wanneer een cel stress ondervindt als gevolg van bijvoorbeeld DNA schade, infectie door een pathogeen, of binding van bepaalde eiwitten aan de cel en reparatie van de schade niet meer haalbaar lijkt zal er een programma in werking treden met als uiteindelijke uitkomst celdood. Dit proces wordt apoptose genoemd. Apoptose leidt tot afbraak van de cel en opname van het restmateriaal door naburige cellen zonder dat de inhoud van de cel vrijkomt. In dit laatste aspect onderscheidt apoptose zich van een andere vorm van celdood, necrose genoemd, dat een veel willekeuriger verloop heeft en waarbij de celinhoud wel vrijkomt, wat een reactie van het immuunsysteem in gang kan zetten.

Aangetoond is dat alle cellen in de atherosclerotische plaque apoptose kunnen ondergaan en dat apoptose toeneemt naarmate een plaque verder ontwikkelt. De gevolgen van apoptose voor de ontwikkeling van een plaque hangen af van het celtype en het stadium van de plaque. Algemeen wordt aangenomen dat apoptose van gladde spiercellen in het kapsel dat de plaque bedekt schadelijk is omdat deze daardoor zwakker wordt en de plaque kan gaan scheuren. Apoptose van macrofagen in vroege stadia van atherosclerose remt de plaqueontwikkeling doordat macrofagen en schuimcellen vroegtijdig worden afgebroken. In late stadia wordt macrofaag apoptose echter vaak als pro-atherosclerotisch gezien. Opname van apoptotische macrofagen door naburige cellen via een proces dat fagocytose wordt genoemd, is dan onvoldoende waardoor de cel necrose ondergaat en de celinhoud alsnog vrijkomt. De daarop volgende immuunreactie kan bijdragen aan plaque-ontsteking.

Omdat hart- en vaatziekten vaak het gevolg zijn van scheuren van een atherosclerotische plaque hebben wij in hoofdstuk 3 genen geïdentificeerd, die mogelijk betrokken zijn bij de overgang van stabiele plaques naar meer kwetsbare plaques. Hierbij hebben we gebruik gemaakt van de zogenaamde micro-array techniek, waarbij de mate van aanwezigheid (de expressie) van een grote hoeveelheid genen in één meting kan worden bepaald, en van twee muismodellen voor stabiele en meer kwetsbare plaques. In onze studie is de expressie van 22.000 genen

gemeten. Apolipoproteïne E (ApoE) deficiënte muizen, die spontaan atherosclerose ontwikkelen, werden na een aantal weken van vetrijk dieet langs operatieve weg voorzien van een licht constrictief bandje rond de halsslagaders. Na de vorming van de atherosclerotische plaques in de halsslagader is p53 tot overexpressie gebracht in het kapsel van de plaque. Dit eiwit induceert apoptose van de gladde spiercellen in het kapsel, als gevolg waarvan deze laag zwakker wordt en de kwetsbaarheid van de plaque toeneemt. Als controle werd het enzyme beta-galactosidase gebruikt, dat geen invloed op de plaque heeft maar goed detecteerbaar is. Het tweede model voor kwetsbare plaques is de *arteria brachiocephalica*. Atherosclerotische plaques die zich in deze slagader vormen in ApoE deficiënte muizen na een 9 weken durend vetrijk dieet hebben van nature een extra dun kapsel en zijn daarmee extra gevoelig voor ruptuur. Als controle hiervoor werden stabiele plaques die zich iets verder stroomafwaarts in de halsslagader vormen gebruikt.

Wanneer per model de genexpressie in voor ruptuur gevoelige of kwetsbare plaques, (ook wel ThCFA voor thin cap fibro-atheroma genoemd) en meer stabiele plaques (TkCFA voor thick cap fibro-atheroma genoemd) wordt vergeleken kan worden bepaald welke genen anders gereguleerd zijn in de meer kwetsbare plaques. Deze analyse liet zien dat 57 en 58 genen een verhoogde expressie en 87 en 66 genen een verlaagde expressie hadden in de twee respectievelijke modellen voor kwetsbare plaque vorming ten opzichte van hun stabiele tegenhangers. Van deze genen hebben 5 een verhoogde expressie in beide modellen en 10 een verlaagde expressie in beide modellen. Van de vijf genen met verhoogde expressie in kwetsbare plaques bleken er drie een functie te hebben in de regulering van apoptose, nl. *Cd5l*, *Plagl1* en *Bim*. Vervolgens hebben we gekeken of er nog andere processen waren waarin meerdere betrokken genen verhoogd of verlaagd waren in de meer kwetsbare plaque. Hieruit bleek dat verschillende processen zoals vetstofwisseling, celgroei en -proliferatie en cel-cel communicatie significant beïnvloed waren in de meer kwetsbare plaque. Het proces dat in de kwetsbare plaque het meest verschilde van de meer stabiele plaque bleek celdood te zijn.

Verder hebben we in hoofdstuk 3 een ander gen met toegenomen expressie aangetoond, nl. het neuropeptide Y (Npy), dat ook in weefsel verkregen uit humane plaques een verhoogde productie bleek te hebben in kwetsbare vergeleken met stabiele plaques. Npy is een eiwit dat voornamelijk een functie heeft als neurotransmitter in het zenuwstelsel. Daarnaast is in diermodellen aangetoond dat Npy zowel een schadelijke als een beschermende werking kan hebben in het ontstaan van atherosclerose.

Met deze studie hebben we aangetoond dat in de diverse modellen voor kwetsbare plaquevorming een aantal genen waarvan de productie verhoogd of verlaagd is in vergelijking met de meer stabiele plaque en die mogelijk bijdragen tot de vorming van kwetsbare plaques gemeenschappelijk zijn. Daarnaast hebben wij Npy geïdentificeerd als mogelijke indicator voor een toegenomen kwetsbaarheid van atherosclerotische plaques.

Na de identificatie van processen en genen die karakteristiek zijn voor de ruptuur-gevoelige plaque hebben we in de daaropvolgende hoofdstukken de functionele rol van enkele bij celdood betrokken eiwitten in de ontwikkeling van atherosclerose onderzocht met behulp van dierexperimenteel onderzoek in muismodellen.

In hoofdstuk 4 is het effect van Bim onderzocht, een pro-apoptotisch eiwit en lid van de Bcl-2 familie van apoptose regulerende eiwitten, waarvan in hoofdstuk 3 al was aangetoond dat het verhoogd aanwezig is in de kwetsbare plaque.

Eerder is aangetoond dat Bim cruciaal is voor een goede werking van het immuunsysteem doordat het mede verantwoordelijk is voor de eliminatie van ongewenste T en B cel klonen. In hoofdstuk 3 werden muizen met een defecte LDL (lage dichtheids lipoproteïne) receptor (LDLr<sup>-/-</sup>), en die als gevolg daarvan spontaan atherosclerose ontwikkelen, bestraald om uit beenmerg afkomstige cellen te depletieren. Hierna werd het beenmerg gerepopuleerd door injectie van beenmerg uit Bim deficiënte (Bim<sup>-/-</sup>) of controle donormuizen. Na een herstelperiode van acht weken werd de muizen een vetrijk dieet gegeven om de ontwikkeling van atherosclerotische plaques te initiëren. De LDLr<sup>-/-</sup> muizen waarin Bim ontbrak in de witte bloedcellen bleken een vergrote milt en niet alleen verhoogde aantallen maar ook meer geactiveerde T cellen in bloed en lymfeknopen te hebben, hetgeen wijst op een verhoogde ontstekingsgraad van deze muizen. Daarnaast bleken ook de atherosclerotische plaques van muizen waarin Bim ontbrak in witte bloedcellen verhoogde aantallen T cellen te bevatten. Bim zorgt, naast het induceren van apoptose in T cellen, ook voor eliminatie van B cellen. Deze B cellen kunnen antilichamen of antistoffen produceren die lichaamsvreemde stoffen kunnen herkennen om vervolgens andere cellen van het immuunsysteem te stimuleren deze stoffen of cellen af te breken. Indien B cellen antilichamen maken tegen lichaamseigen stoffen wordt gesproken van auto-immuniteit. Recent onderzoek heeft een verhoogde spiegel van antilichamen tegen lichaamseigen stoffen laten zien in het bloed van muizen en patiënten met hart- en vaatziekten, hetgeen suggereert dat atherosclerose deels een auto-immuunziekte is. In onze Bim studie zagen we dat het aantal antilichamen in het bloed dat geoxideerd LDL herkent aanmerkelijk verhoogd was in muizen waarin Bim ontbrak in witte bloedcellen. Van deze antilichamen is aangetoond dat ze een beschermende werking hebben in atherosclerose. Verder analyseerden we dat het totaal aantal antilichamen in de atherosclerotische plaques in deze muizen sterk was toegenomen. Zoals verwacht waren Bim deficiënte macrofagen minder gevoelig voor apoptose dan controle macrofagen. Als eerste hebben we nu ook laten zien dat stimulatie van macrofagen met geoxideerd LDL, dat in hoge concentraties celdood kan induceren, resulteert in minder apoptose in deze macrofagen.

Ondanks de bovenbeschreven effecten bleken de atherosclerotische plaques in Bim deficiënte muizen vergelijkbaar met die in controle muizen wat betreft grootte en stabiliteit. Mogelijk is dit het gevolg van het grote aantal verschillende effecten veroorzaakt door Bim deficiëntie die elkaar opheffen.

Mcl-1 behoort, net als Bim, tot de Bcl-2 familie, maar heeft in tegenstelling tot Bim een celdood remmende werking. Mcl-1 gaat een interactie aan met pro-apoptotische eiwitten, waaronder Bim, waardoor hun apoptose bevorderende werking geremd wordt. In hoofdstuk 5 hebben we een vergelijkbare strategie gevolgd als voor Bim, om het effect van Mcl-1 deficiëntie op de ontwikkeling van plaques te bestuderen. Omdat Mcl-1 vooral een belangrijke rol speelt in de regulatie van apoptose in macrofagen en neutrofielen, beide immuuncellen die celresten, bacterien en dergelijke kunnen opnemen, hebben we in deze studie gebruik gemaakt van muizen waarin Mcl-1 specifiek ontbreekt in deze celtypen.

Mcl-1 deficiënte macrofagen waren gevoeliger voor de celdood die optreedt na incubatie met geoxideerd LDL. Daarnaast bleek de opname van vetmateriaal door en de daaropvolgende vorming van schuimcellen uit macrofagen na incubatie met geoxideerd LDL of VLDL, sterk verhoogd. In overeenstemming hiermee bleek ook het aantal macrofaag afgeleide schuimcellen toegenomen in Mcl-1 deficiënte vergeleken met controle muizen. Daarnaast bleek ook dat Mcl-1 deficiënte macrofagen meer ontstekingsbevorderend zijn dan controle macrofagen. Ten slotte bleek zowel in vroege als in meer geavanceerde atherosclerotische plaques het aantal apoptotische cellen verhoogd in Mcl-1 deficiënte muizen.

Ondanks deze atherosclerose bevorderende effecten van macrofaag Mcl-1 deficiëntie was de plaquegrootte in Mcl-1 deficiënte en controle muizen in beide stadia vergelijkbaar. Dit is mogelijk te wijten aan de sterke afname in het aantal neutrofielen, zowel in bloed als in de plaque, en het door ons waargenomen veranderde migratiepatroon van dit celtype. Van neutrofielen is aangetoond dat ze bijdragen aan de ontwikkeling van atherosclerose, dus door de verlaagde aantallen neutrofielen in deze studie is waarschijnlijk die ontwikkeling geremd.

In hoofdstuk 6 is ten slotte de rol van FAK, een eiwit dat de adhesie en migratie van cellen reguleert en daarnaast celdood beïnvloedt, in atherosclerose bestudeerd. Adhesie en hechting van cellen aan andere cellen of de vaatwand, en inbedding van deze cellen in de weefselmatrix zijn essentiële processen bij het ontstaan van plaques. FAK reguleert deze sleutelprocessen in alle in de plaque aanwezige cellen, waaronder macrofagen, gladde spiercellen, endotheelcellen en T cellen. Daarom is het aannemelijk dat FAK een belangrijke factor is in plaque-ontwikkeling. Een volledige verlies van FAK functie is helaas lethaal en daarom hebben we voor deze studie transgene muizen die heterozygoot waren voor FAK (FAK<sup>+/-</sup>) gebruikt en deze gekruist met ApoE deficiënte (ApoE<sup>-/-</sup>) muizen, die spontaan atherosclerose ontwikkelen. Op deze manier werden ApoE deficiënte muizen met verminderde FAK functie verkregen. Tot onze verrassing hadden FAK<sup>+/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> muizen een verlaagd cholesterolniveau in het bloed. Dit werd veroorzaakt door een verminderde productie van VLDL deeltjes in de lever. In ApoE<sup>-/-</sup> deficiënte muizen is cholesterol voornamelijk verbonden met VLDL dat in de lever wordt gemaakt en uitgescheiden in het bloed. De verlaagde VLDL productie was waarschijnlijk het gevolg van de

verminderde expressie van een aantal sleutelgenen in de VLDL productie in de lever.

Daarnaast leidde vermindering van FAK tot een veranderde inflammatoire status in ApoE deficiënte muizen. Zo was de milt vergroot en bevatte het minder macrofagen maar meer T cellen, terwijl in bloed en in de buikholte meer macrofagen en minder T cellen aanwezig waren. Deze verschillen werden waarschijnlijk veroorzaakt door een verstoorde migratie van monocyten/macrofagen vanuit het bloed naar de milt en een verhoogde retentie van T cellen in de milt.

Ook in deze studie leidt de optelsom van pro- (ontstekings-bevorderend effect) en anti-atherogene (verlaagde cholesterol) effecten van verminderde FAK functie tot een gelijkblijvende grootte en samenstelling van atherosclerotische plaques in verschillende vaten.

Samenvattend kan gesteld worden dat de studies beschreven in dit proefschrift laten zien dat celdood-regulerende genen mogelijk bijdragen tot de overgang van stabiele naar meer kwetsbare plaques (hoofdstuk 3) en dat uitschakeling van enkele van sleutelgenen in de regulatie van apoptose, Bim en Mcl-1, diverse effecten heeft op vetmetabolisme en ontsteking (hoofdstuk 4 en 5). Verder blijkt uit hoofdstuk 6 dat FAK aan de ene kant betrokken is bij VLDL productie in de lever en daaraan gerelateerd het cholesterolniveau in het bloed, en aan de andere kant de migratie en adhesie van immuuncellen beïnvloedt in ApoE deficiënte muizen. Wanneer dus wordt overwogen de hier bestudeerde genen te moduleren zal een celtype specifieke of plaque-gerichte aanpak moeten worden gebruikt om gewenste effecten te isoleren van ongewenste effecten. Lokale beïnvloeding van de werking van bijvoorbeeld Mcl-1 zou bijvoorbeeld de lipide-ophoping in en apoptose van macrofagen in de plaque gunstig kunnen beïnvloeden hetgeen de ontwikkeling van atherosclerose zou kunnen afremmen. Via deze aanpak worden systemische effecten op onder andere neutrofielen vermeden. Om deze inzichten te bevestigen zullen aanvullende studies nodig zijn.