



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Hyperlipidemia, inflammation and atherosclerosis : roles of apolipoprotein C1 and cholesteryl ester transfer protein

Westerterp, M.

Citation

Westerterp, M. (2007, June 12). *Hyperlipidemia, inflammation and atherosclerosis : roles of apolipoprotein C1 and cholesteryl ester transfer protein*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12043>

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/1887/12043>

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

Samenvatting

Samenvatting

In de Westerse wereld vormen cardiovasculaire ziekten de eerste doodsoorzaak, terwijl ook de prevalentie hiervan in Oost-Europa en ontwikkelingslanden toeneemt. De hoofdoorzaak van cardiovasculaire ziekten is atherosclerose, in de volksmond ook wel aderverkalking genoemd. Atherosclerose wordt gekarakteriseerd door een chronische ontsteking van de vaatwand, waarin cholesterol zich vervolgens ophoopt. Dit leidt tot het ontstaan van een zogenoemde atherosclerotische plaque of laesie. Atherosclerose bevindt zich vooral in het begin van de aorta die het meest kwetsbaar is voor beschadiging, ten gevolge van vertakkingen van bloedvaten en veranderingen in de snelheid van de stroming van het bloed. Een vroege stadium van de ontwikkeling van atherosclerose is het dichtslibben van een bloedvat. In de kransslagader kan dit leiden tot een verminderde zuurstofvoorziening voor het hart, en uiteindelijk in een hartinfarct. Verhoogde niveaus van zeer-lage-dichtheids-lipoproteïne (VLDL)-cholesterol, VLDL-triglyceriden (TG) en lage-dichtheids-lipoproteïne (LDL)-cholesterol, en verlaagde niveaus van hoge-dichtheids-lipoproteïne (HDL)-cholesterol zijn risicofactoren voor atherosclerose. Daarnaast vormt een verhoogde inflammatoire (ontstekings-) status een risicofactor voor atherosclerose, onafhankelijk van effecten op cholesterol. Veel genen die eiwitten coderen die een effect hebben op het lipoproteïnen-metabolisme en/of op ontsteking, kunnen dan ook de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloeden. De rol van deze eiwitten in het lipoproteïnenmetabolisme of ontsteking is onder meer ontdekt met behulp van transgene muismodellen die ofwel een gen tot overexpressie brengen (zogenoemde transgene muizen) dan wel missen (zogenoemde knock-out muizen). Naast indentificatie van nieuwe genen/eiwitten die effect hebben op atherosclerose, worden deze muismodellen ook gebruikt om de werkingsmechanismen van experimentele anti-atherosclerotische medicijnen te bestuderen. Deze medicijnen verlagen veelal pro-atherogene VLDL en LDL-cholesterol niveaus. Een aantal studies hebben aangetoond dat transgene muizen vergelijkbaar reageren op anti-atherosclerotische medicijnen gericht op verlaging van pro-atherogene VLDL en LDL niveaus als de mens. Nieuwe strategieën voor de behandeling van atherosclerose zijn gericht op de verhoging van anti-atherogene HDL niveaus. Een muismodel dat geschikt is voor het testen van het effect van deze experi-

mentele anti-atherosclerotische medicijnen op HDL niveaus bestaat echter nog niet. In dit proefschrift wordt onderzoek naar de rol van het apolipoproteïne CI (apoCI), en het cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) in het lipoproteïnenmetabolisme, ontsteking, en atherosclerose beschreven. Daarnaast wordt de ontwikkeling van een muismodel dat geschikt zal zijn voor de evaluatie van potentiële HDL-verhogende therapieën als een nieuwe strategie voor de behandeling van atherosclerose beschreven.

Er zijn resultaten die erop wijzen dat plasma apoCI-niveaus positief correleren met VLDL-TG niveaus in mensen. In overeenstemming met deze bevindingen zijn VLDL-TG en VLDL-cholesterol niveaus respectievelijk sterk en matig verhoogd in transgene muizen die hoge niveaus van humaan apoCI tot overexpressie brengen. Onze groep heeft recent aangetoond dat deze toename onafhankelijk is van apoE-expressie en veroorzaakt wordt door apoCI-geïnduceerde inhibitie van het TG-splitsend eiwit lipoproteïne lipase (LPL). In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe fysiologische expressie van endogeen apoCI in muizen ook leidt tot verhoging van VLDL-TG en VLDL-cholesterol, onafhankelijk van de expressie van apoE. Endogene apoCI-expressie heeft geen effect op de absorptie van TG door de darm, maar verhoogt de productie van VLDL-deeltjes door de lever. De postprandiale TG-respons na orale toediening van olijfolie wordt versterkt door apoCI, hetgeen suggereert dat apoCI ook de klaring van VLDL-TG uit het plasma remt. Dit is inderdaad het geval, aangezien de TG-afgeleide vetzuren-opname in gonadaal en perirenaal wit vetweefsel lager is wanneer muizen apoCI tot expressie brengen. Omdat LPL het enzym is dat vooral betrokken is bij de opname van TG-afgeleide vetzuren door wit vetweefsel, en apoCI het niveau van de totale post-heparine LPL-niveaus niet beïnvloedt, vermindert endogeen apoCI dus de LPL activiteit. Hieruit concludeerden we dat endogene apoCI-expressie in apoE-deficiënte muizen plasma niveaus van VLDL-cholesterol en VLDL-TG verhoogt. Dit is het gevolg van gelijktijdige stimulatie van VLDL-deeltjesproductie en inhibitie van LPL activiteit.

Onze eerdere bevindingen dat muizen die humaan apoCI homozygoot tot expressie brengen (*APOCI*^{+/+} muizen), een schrale huid hebben en tegelijkertijd beschermd zijn tegen obesitas (overgewicht), zou gedeeltelijk verklaard kunnen worden door de apoCI-gemedieerde inhibitie van de LPL activiteit. LPL inhibitie zou kunnen leiden tot verminderde beschikbaarheid

van vrije vetzuren voor opname in vetweefsel en de huid. Desalniettemin zijn de niveaus van vrije vetzuren in het plasma van *APOCI*^{+/+} muizen ook verhoogd en is aangetoond dat apoCI de opname van een vrije vetzuur-analoog in vetweefsel verhindert. ApoCI lijkt dus ook een direct effect te hebben op vrije vetzuur-opname vanuit het plasma. Deze hypothese is getoetst en het onderzoek is beschreven in **hoofdstuk 3**. Het fenotype van de huid van *APOCI*^{+/+} muizen werd niet beïnvloed na transplantatie van een klein stuk huid naar wild-type muizen wat erop wijst dat lipidentransport naar de huid wordt verhinderd door lokaal geproduceerd apoCI. Dit werd verder onderzocht in macrofagen (cellen die kunnen infiltreren in vetweefsel en de huid) die al dan niet apoCI tot expressie brengen. Deze cellen werden met vrije vetzuren geïncubeerd. ApoCI expressie bleek de associatie van vrije vetzuren met macrofagen te verminderen en ook de esterificatie van deze vetzuren in cholesteryl esters en TG voor opslag in de cel. Ook exogeen apoCI vermindert de associatie van vrije vetzuren met macrofagen. Op grond van deze resultaten speculeerden we dat apoCI extracellulair bindt aan vrije vetzuren en daardoor de opname van vrije vetzuren door de cel voorkomt. Inderdaad hebben *APOCI*^{+/+} muizen verhoogde niveaus van vrije vetzuren in hun bloed. Het bleek dat de vrije vetzuren voornamelijk gebonden waren aan VLDL. *In vitro* hebben we vervolgens laten zien dat de associatie van vrije vetzuren met VLDL-achtige emulsiedeeltjes waaraan geen andere eiwitten gebonden zijn afhankelijk is van de concentratie apoCI op dit deeltje. ApoCI zou dus ook in de circulatie de associatie van vrije vetzuren met VLDL kunnen verhogen. We concludeerden dat apoCI vrije vetzuren kan binden in de circulatie en daarbij de beschikbaarheid van vrije vetzuren voor celopname vermindert. Dit mechanisme dient, naast apoCI-geïnduceerde LPL-inhibitie, als een additioneel mechanisme voor de bescherming tegen obesitas en de schrale huid van *APOCI*^{+/+} muizen.

Naast expressie in de lever, hersenen en vetweefsel, komt apoCI ook tot expressie in macrofagen. *APOCI* mRNA niveaus worden in hoge mate opgereguleerd tijdens de differentiatie van monocyten in macrofagen en de behandeling van macrofagen met een agonist voor de lipidsensor de lever X receptor (LXR). Deze data suggereren dat apoCI een rol speelt in lipidenhomeostase in de macrofaag, naast de rol van apoCI in vetzuur en TG metabolisme. Aangezien macrofagen cruciaal zijn voor de ontwikkeling van atherosclerose, werd de rol van zowel systemische apoCI expressie en lokale

apoCI expressie in macrofagen in atherosclerose onderzocht op een *apoe*^{-/-} achtergrond, weergegeven in **hoofdstuk 4**. Het oppervlak van de atherosclerotische laesies in het hartkleppengebied van *apoe*^{-/-}*apoc1*^{+/+} muizen was groter dan in *apoe*^{-/-}*apoc1*^{-/-} muizen, gerelateerd aan de apoCI-geïnduceerde hyperlipidemie, zoals beschreven in hoofdstuk 2. Maar daarnaast induceerde apoCI cholesterol efflux uit macrofagen met een vergelijkbare efficiëntie als apoAI en apoE *in vitro*, wat juist duidt op een beschermende rol van apoCI in de ontwikkeling van atherosclerose. Deze hypothese werd getoetst door het effect van macrofaag-specifieke apoCI expressie op atherosclerose te onderzoeken in *apoe*^{-/-}*apoc1*^{+/+} muizen getransplanteerd met beenmerg uit *apoe*^{-/-}*apoc1*^{+/+} muizen ten opzichte van beenmerg uit *apoe*^{-/-}*apoc1*^{-/-} muizen. ApoCI expressie in macrofagen had echter geen effect op het oppervlak van de atherosclerotische plaques. Uit deze resultaten concludeerden we dat systemische apoCI expressie atherosclerose induceert tengevolge van apoCI-geïnduceerde hyperlipidemie, terwijl lokale apoCI-productie in macrofagen van de vaatwand niet bijdraagt aan atherosclerose ontwikkeling *in vivo*, ondanks dat apoCI in staat is om cholesterol efflux uit macrofagen te induceren.

Naast hyperlipidemie is ontsteking een risicofactor voor atherosclerose. Lipopolysaccharide (LPS), een inflammatoir bestanddeel uit het celmembraan van Gram-negatieve bacteriën dat vrijkomt tijdens vermenigvuldiging of bacteriedood verergert atherosclerose in mensen, konijnen en muizen door de inductie van een chronische ontsteking via de zogenoemde Toll-like receptoren. Omdat apoCI de LPS-geïnduceerde inflammatoire respons in macrofagen *in vitro* en in muizen stimuleert, werd het effect van endogene systemische apoCI-expressie op LPS-geïnduceerde atherosclerose onderzocht, zoals beschreven in **hoofdstuk 5**. Hiertoe werden *apoe*^{-/-}*apoc1*^{-/-} en *apoe*^{-/-}*apoc1*^{+/+} muizen wekelijks intraperitoneaal geïnjecteerd met LPS of het oplosmiddel (controle) gedurende een periode van 10 weken. Vervolgens werd de ontwikkeling van atherosclerose bepaald in het hartkleppengebied. Het oppervlak van de LPS-geïnduceerde atherosclerotische plaques was groter in de muizen die apoCI tot expressie brachten, en ook waren de LPS-geïnduceerde plasma niveaus van fibrinogeen en E-selectine verhoogd in deze groep. De verhoging van deze plasmaniveaus is een indicatie voor respectievelijk een verhoogde systemische inflammatoire status en een verhoogde inflammatoire status van de vaatwand. Ondanks dat LPS ook een matige ver-

hoging van deze parameters in *apoe^{-/-}apoc1^{-/-}* muizen induceerde, had LPS toediening in deze muizen geen effect op atherosclerose. Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat expressie van endogeen apoCI cruciaal is voor LPS-geïnduceerde atherosclerose in *apoe^{-/-}* muizen, gerelateerd aan een verhoogde inflammatoire status. Deze resultaten impliceren dat verhoogde niveaus van apoCI in plasma bij zouden kunnen dragen aan een versnelde ontwikkeling van atherosclerose in mensen die lijden aan chronische infecties.

Het cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) is een transfer factor die de uitwisseling van TG uit apoB-bevattende lipoproteïnen voor CE uit HDL medieert, en is daardoor belangrijk voor de VLDL/LDL en HDL niveaus in het plasma. CETP komt tot expressie in mensen, maar niet in muizen. De rol van CETP in atherosclerose is nog steeds onderwerp van discussie. Daarom werd het effect van CETP op atherosclerose ontwikkeling bestudeerd in *APOE*3-Leiden* transgene muizen, zoals weergegeven in **hoofdstuk 6**. *APOE*3-Leiden* transgene muizen hebben namelijk een cholesterolverdeling over de lipoproteïnen die veel vergelijkbaarder is met de mens dan bijvoorbeeld in wild-type muizen, als gevolg van een minder efficiënte klaring van apoB-bevattende lipoproteïnen dan in wild-type muizen. Expressie van CETP in *APOE*3-Leiden* muizen leidde tot een toename van VLDL-cholesterol en een afname van HDL-cholesterol, resulterend in een lichte verhoging van het totale cholesterol niveau. Om atherosclerose te bestuderen werden *CETP.APOE*3-Leiden* en *APOE*3-Leiden* muizen op een cholesterol-rijk dieet gezet. Het oppervlak van de atherosclerotische laesies was veel hoger in *CETP.APOE*3-Leiden* dan *APOE*3-Leiden* muizen en ook de samenstelling van de laesies wees op een verder stadium van de ontwikkeling van atherosclerose in *CETP.APOE*3-Leiden* ten opzichte van *APOE*3-Leiden* muizen. Dit kan worden verklaard door de toename in VLDL-cholesterol en de afname van HDL-cholesterol ten gevolge van CETP expressie. Daarnaast werd aangetoond dat het plasma van *CETP.APOE*3-Leiden* minder SR-BI afhankelijke cholesterol efflux induceert dan het plasma van *APOE*3-Leiden* muizen, waarschijnlijk gerelateerd aan de verlaagde HDL-niveaus. Er werd geconcludeerd dat CETP expressie de cholesterolverdeling over lipoproteïnen in grote mate beïnvloedt en een duidelijke pro-atherogene factor vormt in *APOE*3-Leiden* muizen.

*APOE*3-Leiden* muizen hebben een vergelijkbare respons op medicijnen die VLDL/LDL cholesterol verlagen met de mens. Naast medicijnen die een

Samenvatting

effect hebben op het VLDL/LDL metabolisme zullen *CETP.APOE*3-Leiden* muizen nu ook geschikt zijn voor de preklinische toetsing van HDL-verhogende therapieën die een nieuwe strategie vormen voor de behandeling van cardiovasculaire ziekten.