



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Modulation of HDL metabolism : studies in APOE\*3- Leiden.CETP mice**

Haan, W. de

### **Citation**

Haan, W. de. (2009, April 16). *Modulation of HDL metabolism : studies in APOE\*3-Leiden.CETP mice*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13730>

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/1887/13730>

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

# **Chapter 10**

**SUMMARY  
SAMENVATTING  
ABBREVIATIONS  
LIST OF PUBLICATIONS  
CURRICULUM VITAE**

## Summary

Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of mortality and morbidity in the Western world. CVD is mainly caused by atherosclerosis, for which dyslipidemia, characterized by high a plasma level of (very) low density lipoprotein ((V)LDL) and a low plasma level of high density lipoprotein (HDL), is a major risk factor. To reduce the risk to develop CVD, drugs aimed at correcting dyslipidemia by lowering (V)LDL are currently the first choice of treatment. Albeit that these drugs lower (V)LDL-C very efficiently (up to ~40%), and generally result in a slight increase in HDL-C, they only prevent a fraction of all cardiovascular events (~30%). Therefore new therapeutic strategies to reduce cardiovascular events more efficiently are necessary. Since HDL is has been attributed multiple protective effects in atherosclerosis by its role in reverse cholesterol transport and its anti-inflammatory and anti-oxidative properties, HDL-raising therapy is currently considered as a promising strategy to further reduce CVD risk. In this thesis, the mechanisms underlying the HDL-raising effects of the classical lipid-lowering drugs fenofibrate, atorvastatin and niacin were elucidated. Furthermore, the effects of potential novel HDL-raising strategies, including torcetrapib, PXR agonism and apoCI, on HDL metabolism were addressed. For these studies, we used the APOE\*3-Leiden.CETP (E3L.CETP) transgenic mouse, a valuable model for human-like lipoprotein metabolism.

The lipid-lowering drugs fibrates and statins efficiently reduce plasma cholesterol and triglycerides (TG) in dyslipidemic subjects. In addition, they also increase HDL-C to some extent (~5-15%), but the mechanism underlying the increase in HDL-C was unclear. Since both fibrates and statins 1) reduce the concentration of cholesteryl ester transfer protein (CETP) in human plasma, and 2) do not increase HDL-C in naturally CETP-deficient mice, we reasoned that CETP plays a dominant role in the HDL-increasing effect of both fibrates and statins. To evaluate the role of CETP in the HDL-C increase as seen in humans, we used E3L mice that have been shown to respond in a human-like manner with respect to the lipid-lowering effects of fibrates and statins, and E3L.CETP littermates. In **chapter 2**, E3L and E3L.CETP mice were fed a Western-type diet with or without fenofibrate. Fenofibrate decreased (V)LDL-TG and (V)LDL-C in both E3L and E3L.CETP mice, but fenofibrate increased HDL-C only in E3L.CETP mice. Fenofibrate did not affect the turnover of HDL-CE, indicating that fenofibrate causes a higher steady-state HDL-C level without altering the HDL-C flux through plasma. Analysis of the hepatic gene expression profile showed that fenofibrate did not differentially affect the main players in HDL metabolism, including phospholipid transfer protein (Pltp), ATP-binding cassette transporter A1 (Abca1), scavenger receptor class B type I (Sr-b1), and apolipoprotein AI (Apoa1), in E3L.CETP mice as compared to E3L

mice. However, in E3L.CETP mice, fenofibrate reduced hepatic CETP mRNA as well as the CE transfer activity in plasma. In **chapter 3**, a similar approach was used to evaluate whether atorvastatin increases HDL-C via CETP modulation. Atorvastatin reduced plasma cholesterol in both E3L and E3L.CETP mice, which was specific for (V)LDL, but atorvastatin increased HDL-C only in E3L.CETP mice. Hepatic mRNA expression levels of genes involved in HDL metabolism, including Pltp, Abca1, Sr-b1 and Apoa1, were not differently affected by atorvastatin in E3L.CETP mice as compared to E3L mice. However, in E3L.CETP mice, atorvastatin down-regulated the hepatic CETP mRNA expression as well as the total CETP level and cholesteryl ester (CE) transfer activity in plasma. Therefore, we concluded that both fenofibrate and atorvastatin increase HDL-C by reducing the CETP-dependent transfer of cholesterol from HDL to (V)LDL, as related to lower hepatic CETP expression and a reduced plasma (V)LDL pool.

The most potent HDL-raising drug currently available is niacin, but the mechanism underlying the effects of niacin on HDL metabolism is still unknown. In **chapter 4**, E3L and E3L.CETP mice on a western-type diet were treated with niacin. In E3L.CETP mice, niacin dose-dependently decreased plasma cholesterol and TG and dose-dependently increased HDL-C, plasma apoAI as well as the HDL particle size. In E3L mice, niacin also reduced plasma cholesterol and TG, but had no effect on HDL. In E3L.CETP mice, niacin dose-dependently decreased the hepatic expression of CETP as well as plasma CETP mass and CETP activity. Additionally, niacin dose-dependently decreased the clearance of apoAI from plasma and reduced the uptake of apoAI by the kidneys. Therefore, we concluded that niacin markedly increases HDL-C in E3L.CETP mice by reducing CETP activity, as related to lower hepatic CETP expression and a reduced plasma (V)LDL pool, and increases HDL-apoAI by decreasing the clearance of apoAI from plasma.

Torcetrapib is the first compound designed specifically to increase HDL-C levels via inhibition of CETP activity. In large clinical trials, torcetrapib increases HDL-C by about 60%, but did not potentiate the effect of atorvastatin on atherosclerosis, as determined by measurement of intima-media thickness (IMT) and intravascular ultrasound (IVUS). The effect of torcetrapib alone is unknown. Moreover, torcetrapib treatment led to adverse effects including an increase in cardiovascular events and increased death rate. In **chapter 5** we aimed to study the effects of torcetrapib with and without atorvastatin on the development of atherosclerosis and to study the adverse effects of torcetrapib. E3L.CETP mice on a western-type diet were treated with torcetrapib, atorvastatin or both, and atherosclerosis development was determined in the aortic root. Torcetrapib decreased plasma cholesterol, albeit to a lesser extent than atorvastatin or the combination of torcetrapib and atorvastatin. Torcetrapib increased HDL-C in the absence and presence of atorvastatin. Torcetrapib and

atorvastatin alone both reduced atherosclerotic lesion size to a similar extent, but combination therapy did not reduce atherosclerosis as compared to atorvastatin alone. Remarkably, as compared to atorvastatin, torcetrapib induced enhanced monocyte recruitment and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and resulted in lesions of a more inflammatory phenotype, as reflected by an increased macrophage content and reduced collagen content. We thus concluded that CETP inhibition by torcetrapib per se reduces atherosclerotic lesion size but does not enhance the anti-atherogenic potential of atorvastatin. In addition, as compared to atorvastatin, torcetrapib introduces lesions of a less stable phenotype.

Pregnane X receptor (PXR) agonism has been suggested to increase HDL levels in wild-type mice, but its effect on integrated HDL metabolism in a model with human-like lipoprotein metabolism was still unknown. In **chapter 6**, we treated E3L and E3L.CETP mice with the PXR agonist pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN). In E3L and E3L.CETP mice, PCN increased liver lipids as well as plasma cholesterol and TG. Whereas PCN increased HDL-C, especially within large HDL-1 particles in E3L mice, it dose-dependently decreased HDL-C in E3L.CETP mice. PCN decreased expression of genes involved in HDL synthesis (*Abca1*, *Apoa1*), maturation (lecithin: cholesterol acyltransferase (*Lcat*), *Pltp*) and clearance (*Sr-b1*). The HDL-increasing effect of PCN, observed in E3L mice, is likely caused by a marked decrease in hepatic SR-BI protein expression, and is completely reversed by CETP expression. We concluded, therefore, that chronic PXR agonism dose-dependently reduces plasma HDL-C in the presence of CETP and is thus not a relevant target for the development of HDL raising therapy.

Apolipoprotein CI (apoCI) has been suggested to influence HDL metabolism by activation of LCAT and inhibition of HL and CETP. However, the effect of apoCI on SR-BI, as well as the net effect of apoCI on HDL metabolism *in vivo* is unknown. Therefore, we evaluated in **chapter 7** the effect of apoCI on the SR-BI-mediated uptake of HDL-CE *in vitro* and determined the net effect of apoCI on HDL metabolism in mice. We demonstrated that apoCI dose-dependently decreased the SR-BI-dependent association of HDL-CE with primary murine hepatocytes *in vitro*. Subsequent *in vivo* studies showed that apoCI-deficiency in mice gene dose-dependently decreased HDL-C levels, and adenovirus-mediated expression of human apoCI in mice increased HDL levels at a low dose and increased the HDL particle size at higher doses. Therefore, we concluded that apoCI is a novel inhibitor of SR-BI *in vitro* and increases HDL levels *in vivo*.

Since apoCI is the main endogenous HDL-associated CETP inhibitor, it can be a lead for the development of a new generation CETP inhibitors aimed at increasing HDL levels and reducing CVD risk. However, apoCI also inhibits

LPL activity which leads to hypertriglyceridemia, a risk factor for CVD. Therefore, in **chapter 8** we aimed to identify the minimal CETP-inhibitory domain of apoCI without LPL-inhibitory activity. We show that the CETP-inhibitory function of apoCI resides in the C-terminal helix, whereas the C terminus is not sufficient for the LPL-inhibitory function of apoCI. The C-terminal peptide apoCI<sub>32-57</sub> potently inhibited CETP activity, mainly caused by positively charged amino acids, with a negligible effect on LPL activity. Therefore, we concluded that apoCI<sub>32-57</sub> may be an interesting lead in the search for novel CETP inhibitors as a new strategy to increase HDL thereby reducing cardiovascular risk.

Taken together, the studies described in this thesis contribute to the understanding of the mechanisms underlying HDL-modulating strategies. We demonstrated that the HDL-raising effect of classical lipid-lowering drugs depends on the presence of CETP. We also showed that CETP inhibition may still be a potential atherogenic strategy, provided that CETP inhibitors do not adversely affect lesion composition. In addition, we identified the minimal CETP-inhibitory domain within apoCI that may provide a lead towards a new generation of safe CETP inhibitors.

## Samenvatting

Hart- en vaatziekten vormen een belangrijke oorzaak van mortaliteit en morbiditeit in de westerse wereld, en worden voornamelijk veroorzaakt door atherosclerose. Een belangrijke risicofactor voor atherosclerose is dyslipidemie, die gekarakteriseerd wordt door een hoog plasmaniveau van het lage dichtheids lipoproteïne ((V)LDL) en een laag plasmaniveau van het hoge dichtheid lipoproteïne (HDL). Dyslipidemie wordt voornamelijk behandeld met lipidenverlagende medicijnen. Deze medicijnen verlagen de plasmaniveaus van (V)LDL-C zeer efficiënt (~40%) en geven tevens een milde verhoging van HDL, maar desondanks voorkomen zij slechts een fractie van alle hart- en vaatziekten (~30%). Daarom zijn nieuwe therapeutische strategieën om hart- en vaatziekten verder terug te dingen noodzakelijk. Omdat HDL op verschillende manieren kan beschermen tegen atherosclerose, namelijk door zijn rol in het reverse cholesterol transport en/of door middel zijn van anti-inflammatoire en anti-oxidatieve eigenschappen, wordt HDL verhoging gezien als een veelbelovende nieuwe manier om hart- en vaatziekten te voorkomen. In dit proefschrift werden de mechanismen onderzocht die aan de HDL-verhogende werking van de klassieke lipidenverlagende middelen atorvastatine, fenofibraat en niacine ten grondslag liggen. Daarnaast werden de effecten van potentiële nieuwe HDL verhogende strategieën, inclusief het experimentele geneesmiddel torcetrapib, en de lichaamseigen eiwitten pregnaan X receptor (PXR) en apolipoproteïne CI (apoCI), op het HDL metabolisme onderzocht. Voor deze studies maakten we gebruik van APOE\*3-Leiden.CETP (E3L.CETP) transgene muizen, een waardevol nieuw muismodel voor het menselijke lipoproteïnen metabolisme.

Fibraten en statines verlagen plasmaniveaus van cholesterol en triglyceriden efficiënt in dyslipidemische patiënten. Daarnaast laten deze middelen een milde verhoging van het cholesterol in HDL (5-15%) zien terwijl het mechanisme dat hieraan ten grondslag ligt onduidelijk is. Omdat fibraten en statines de concentratie van het cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) in het plasma verlagen, en omdat fibraten en statines HDL niet verhogen in muizen die van nature geen CETP tot expressie brengen, onderzochten wij de hypothese dat CETP een essentiële rol speelt bij het HDL-verhogende effect van zowel fibraten als statines. Hiervoor werd gebruik gemaakt van E3L en E3L.CETP transgene muizen die hetzelfde als de mens reageren op klassieke lipidenverlagende medicijnen zoals statines en fibrates met betrekking tot verlagings van lipiden in het plasma. In **hoofdstuk 2** werden E3L en E3L.CETP muizen gevoed met een vetrijk dieet in aan- en afwezigheid van fenofibraat. Fenofibraat verlaagde plasma (V)LDL-cholesterol (C) en (V)LDL-triglyceriden (TG) in zowel E3L als E3L.CETP muizen, maar verhoogde HDL-C alleen in E3L.CETP muizen. Fenofibraat beïnvloedde de klaring van HDL-cholesteryl

esters (CE) uit het plasma niet, wat erop wijst dat fenofibraat een hoger plasmaniveau van HDL-C veroorzaakt zonder de flux van het HDL-C te veranderen. Analyse van de expressie van genen in de lever die betrokken zijn bij het HDL metabolisme toonde aan dat fenofibraat de belangrijkste spelers in het HDL metabolisme, waaronder het fosfolipiden transport proteïne (Pltp), de ATP-bindende cassette transporter A1 (Abca1), de scavenger receptor B type I (SR-B1), en het apolipoproteïne AI (Apoa1) niet verschillend beïnvloedde in E3L.CETP en E3L muizen. In E3L.CETP muizen verminderde fenofibraat wel de genexpressie van CETP evenals de overdracht van CE tussen lipoproteïnen in plasma. In **hoofdstuk 3** gebruikten we een vergelijkbare aanpak om te evalueren of atorvastatine HDL-C ook zou verhogen via CETP modulatie. Atorvastatine verlaagde plasma (V)LDL-C niveaus in zowel E3L als E3L.CETP muizen, maar verhoogde HDL-C uitsluitend in E3L.CETP muizen. Expressie van genen in de lever die betrokken zijn bij het HDL metabolisme (Pltp, Abca1, Sr-b1 en Apoa1) werden niet verschillend beïnvloed door atorvastatine in E3L.CETP en E3L muizen. In E3L.CETP muizen verlaagde atorvastatine echter wel de genexpressie van het CETP evenals het niveau van CETP en de activiteit van CETP in plasma. Daarom concludeerden wij dat zowel fenofibraat als atorvastatine HDL-C verhogen door de CETP-afhankelijke overdracht van CE van HDL naar (V)LDL te verlagen. Dit wordt veroorzaakt door een lagere hepatische CETP expressie en een lagere hoeveelheid (V)LDL in het plasma.

Het meest krachtige medicijn wat momenteel beschikbaar is om HDL te verhogen is niacine. Het mechanisme dat aan de verhoging van HDL ten grondslag ligt is echter nog onbekend. In **hoofdstuk 4** voerden wij E3L en E3L.CETP muizen een vet rijk dieet met of zonder niacine. In E3L.CETP muizen verlaagde niacine het plasma cholesterol en TG op een dosisafhankelijke wijze. Niacine verhoogde het HDL-C niveau ook op een dosisafhankelijke manier, net als het plasmaniveau van apoAI en de deeltjesgrootte van het HDL. In E3L muizen verlaagde niacine het plasmaniveau van cholesterol en TG terwijl de verhoging van HDL-C niet werd waargenomen. In E3L.CETP muizen verminderde niacine dosisafhankelijk de hepatische expressie van CETP evenals de massa en activiteit van CETP in plasma. Bovendien reduceerde niacine op een dosisafhankelijke manier de opname van apoAI vanuit het plasma door de nieren. Daarom concludeerden wij dat niacine het HDL-C in E3L.CETP muizen verhoogt door de CETP activiteit te verlagen, als gevolg van zowel een verlaagde CETP expressie als een verminderde hoeveelheid (V)LDL in het plasma. Daarnaast verhoogt niacine apoAI door de klaring van apoAI uit plasma te verminderen.

Torcetrapib is het eerste medicijn dat specifiek is ontworpen om HDL te verhogen, namelijk door de activiteit van CETP in het plasma te remmen. In grote klinische studies bleek torcetrapib inderdaad in staat het HDL met ongeveer 60% verhogen. Ondanks deze forse HDL verhoging werd in patiënten



die met atorvastatine en torcetrapib werden behandeld echter geen vermindering van atherosclerose gevonden in vergelijking met patiënten die alleen met atorvastatine werden behandeld. Het effect van torcetrapib zonder atorvastatine was vooralsnog onbekend. Daarnaast leidde de behandeling met torcetrapib tot ongunstige bijwerkingen zoals een verhoging van cardiovasculaire gebeurtenissen en een verhoogd sterftcijfer. In **hoofdstuk 5** werd het effect van torcetrapib met en zonder atorvastatine in muizen bestudeerd om meer inzicht te krijgen in de potentiële anti-atherogene werking en de bijwerkingen van torcetrapib. E3L.CETP muizen werden gevoerd met een vetrijk dieet waaraan torcetrapib, atorvastatine of beide werden toegevoegd, en de ontwikkeling van atherosclerose werd vervolgens na 14 weken beoordeeld in het kleppengebied van het hart. Torcetrapib verminderde het plasmaniveau van cholesterol, hoewel in mindere mate dan atorvastatine en combinatie van torcetrapib en atorvastatine. Daarnaast verhoogde torcetrapib het HDL-C. Zowel torcetrapib als atorvastatine verminderden atherosclerose, en wel in gelijke mate, maar de combinatie van beide middelen had geen additionele anti-atherogene werking. Vergeleken met atorvastatine veroorzaakte torcetrapib een verhoogde binding van monocytan aan het vaatendotheel, wat gepaard ging met een verhoogde hoeveelheid van het monocytenchemoattractant proteïne-1 (MCP-1) in de atherosclerotische plaques. Dit resulteerde in laesies met meer macrofagen en minder collageen, die in de mens minder stabiel zijn en kunnen scheuren. Wij concludeerden daarom dat remming van CETP door torcetrapib op zich atherosclerose kan verminderen. Echter, net zoals in de mens is torcetrapib niet in staat het anti-atherogene effect van atorvastatine te versterken. Bovendien introduceert torcetrapib laesies van een minder stabiel fenotype vergeleken met atorvastatine.

Er is in de literatuur gesuggereerd dat agonisten van de pregnaan X receptor (PXR) het HDL kunnen verhogen. Deze suggestie hebben wij onderzocht in ons muismodel met een menselijk lipoproteïnen metabolisme. In **hoofdstuk 6** behandelden wij E3L en E3L.CETP muizen met de PXR agonist pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril (PCN). In E3L en E3L.CETP muizen verhoogde PCN lipiden in de lever evenals cholesterol en TG in plasma, terwijl PCN in E3L muizen het cholesterol specifiek in HDL verhoogde, vooral in grote HDL-1 deeltjes. In E3L.CETP muizen gaf PCN een dosisafhankelijke verlaging van het HDL. PCN verminderde de expressie van genen in de lever betrokken bij de synthese (Abca1, ApoA1), maturatie (lecithin: cholesterol acyltransferase (Lcat), Pltp) en klaring (SR-B1) van het HDL. Het HDL-verhogende effect van PCN, dat in E3L muizen werd waargenomen, wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een daling van de HDL receptor SR-B1 in de lever. Deze HDL verhoging wordt echter door CETP expressie volledig tenietgedaan. Wij concludeerden daarom dat chronisch PXR agonisme in de aanwezigheid van CETP het HDL-C

dosisafhankelijk verlaagt en daarom geen relevante strategie is voor de ontwikkeling van HDL-verhogende medicijnen.

Er is aangetoond dat het plasma eiwit apoCI het HDL metabolisme zou kunnen beïnvloeden door activatie van LCAT, en remming van HL en CETP. Het effect van apoCI op SR-BI en het netto effect van apoCI op HDL niveaus was echter nog onbekend. In **hoofdstuk 7** werd daarom het effect van apoCI op de SR-BI-gemedieerde opname van HDL-CE *in vitro* geëvalueerd en het netto effect van apoCI op het HDL metabolisme in muizen bepaald. Wij toonden aan dat apoCI de SR-BI-afhankelijke associatie van HDL-CE met muizenhepatocyten vermindert. Daarnaast verminderde apoCI-deficiëntie in muizen op een dosisafhankelijk wijze het HDL-C niveau. Een matige overexpressie van apoCI in muizen leidde tot een verhoogd HDL-C niveau, en een hogere overexpressie van apoCI leidde tot een vergroting van de HDL deeltjes. Daarom concludeerden wij dat apoCI een nieuwe remmer is van SR-BI *in vitro* en dat apoCI het HDL niveau verhoogt *in vivo*.

Omdat apoCI de belangrijkste fysiologische HDL-geassocieerde CETP remmer is kan apoCI een basis vormen voor de ontwikkeling van nieuwe CETP remmers om HDL te verhogen en het risico op hart- en vaatziekten te verminderen. ApoCI remt echter ook de activiteit van LPL wat leidt tot hypertriglyceridemia, en dus een atherogene eigenschap is. Daarom was het doel in **hoofdstuk 8** om het minimale CETP remmende domein van apoCI zonder LPL remmende eigenschappen te identificeren. Wij toonden aan dat de CETP remmende functie van apoCI zich vooral bevindt in het C-terminale domein van apoCI, en dat de C terminus niet voldoende is voor de LPL remmende functie van apoCI. ApoCI<sub>32-57</sub> remde de activiteit van CETP krachtig, hoofdzakelijk gemedieerd door positief geladen aminozuren, terwijl apoCI<sub>32-57</sub> LPL niet remde. Daarom concludeerden wij dat apoCI<sub>32-57</sub> een interessante basis kan zijn in de zoektocht naar nieuwe CETP remmers om HDL te verhogen en het risico op hart- en vaatziekten te verlagen.

Samengenomen dragen de studies die in dit proefschrift worden beschreven bij tot het begrip van de mechanismen die aan HDL modulerende strategieën ten grondslag liggen. Wij toonden aan dat het HDL verhogende effect van klassieke lipidenverlagende middelen afhankelijk is van de aanwezigheid van CETP. Daarnaast toonden wij aan dat de remming van CETP nog steeds een potentiële anti-atherogene strategie kan zijn, met als voorwaarde dat nieuwe CETP remmers de laesie samenstelling niet ongunstig beïnvloeden. Bovendien identificeerden wij het minimale CETP remmende domein binnen apoCI dat een basis voor een nieuwe generatie van veilige CETP remmers kan vormen.

**List of abbreviations**

aa	amino acid
ABCA1/G1/G4	adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1/G1/G4
AcLDL	acetylated LDL
AdAPOC1	adenovirus expressing human APOC1
AdLacZ	adenovirus expressing $\beta$ -galactosidase
APOC1	human apoC1 expressing mice
Apo	apolipoprotein
Bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
C	cholesterol
CE	cholesteryl ester
CETP	cholesteryl ester transfer protein
CM	chylomicron
CO	cholesteryl oleate
COEth	cholesteryl oleoyl ether
CVD	cardiovascular disease
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
E3L	APOE*3-Leiden
FC	free cholesterol
FCR	fractional catabolic rate
FFA	free fatty acids
FPLC	fast-performance liquid chromatography
HDL	high density lipoprotein
HL	hepatic lipase
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HRP	horse radish peroxidase
HSL	hormone sensitive triglyceride lipase
HSPG	heparin sulfate proteoglycans
IDL	intermediate density lipoprotein
IMT	intima-media thickness
IVUS	intravascular ultrasonography
LCAT	lecithin:cholesterol acyl transferase
LDL	low density cholesterol
LDLr	LDL receptor
LPL	lipoprotein lipase
LPS	lipopolysaccharide
LRP	LDL receptor related protein

LXR	liver X receptor
MCP1	monocyte chemotactic protein-1
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphate buffered phosphate
PCN	pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile
PCR	polymerase chain reaction
Pfu	plaque forming unit
PL	phospholipid
PLTP	phospholipid transfer protein
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
PPRE	peroxisome proliferator response element
PXR	pregnane X receptor
RCT	reverse cholesterol transport
RNA	ribonucleic acid
RXR	retinoid X receptor
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
SRA	scavenger receptor class A
SR-BI	scavenger receptor class B type I
TC	total cholesterol
TG	triglyceride
VLDL	very low density lipoprotein
VLDLr	VLDL receptor
WAT	white adipose tissue
WT	wild type

## Publications

### Full papers

1. LW Vader, DT Stepniak, EM Bunnik, YM Kooy, W de Haan, JW Drijfhout, PA van Veelen, F Koning. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. **Gastroenterology** **2003**, 125:1105-1113.
2. M Westerterp, W de Haan, JFP Berbee, LM Havekes, PCN Rensen. Endogenous apoCI increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. **J Lipid Res** **2006**, 47:1203-1211.
3. M Westerterp, CC. van der Hoogt, W de Haan, EH Offerman, GM Dallinga-Thie, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Cholesteryl ester transfer protein decreases HDL and severely aggravates atherosclerosis in *APOE\*3-Leiden* Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2006**, 26:2552-2559.
4. M Van Eck, D Ye, RB Hildebrand, JK Kruijt, W de Haan, M Hoekstra, PCN Rensen, C Ehnholm, M Jauhiainen, TJC Van Berkel. Important role for bone marrow-derived cholesteryl ester transfer protein in lipoprotein cholesterol redistribution and atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice. **Circ Res** **2007**, 100:678-685.
5. M Westerterp, M van Eck, W de Haan, EH Offerman, TJC van Berkel, LM Havekes, PCN Rensen. Apolipoprotein CI aggravates atherosclerosis development in apoE-knockout mice despite mediating cholesterol efflux from macrophages. **Atherosclerosis** **2007**, 195:e9-16.
6. W de Haan\*, CC van der Hoogt\*, M Westerterp, M Hoekstra, GM Dallinga-Thie, HMG Princen, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Fenofibrate increases HDL cholesterol by reducing cholesteryl ester transfer protein expression. **J Lipid Res** **2007**, 48:1763-1771. \*Both authors contributed equally.
7. CJ Moen, AP Tholens, PJ Voshol, W de Haan, LM Havekes, P Gargalovic, AJ Lusis, K Willems van Dijk, RR Frants, MH Hofker, PCN Rensen. The *Hyplip2* locus causes hypertriglyceridemia by decreased clearance of triglycerides. **J Lipid Res** **2007**, 48:2182-2192.

8. W de Haan, CC van der Hoogt, M Westerterp, M Hoekstra, GM Dallinga-Thie, HMG Princen, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Atorvastatin increases HDL cholesterol by reducing CETP expression in cholesterol-fed APOE\*3-Leiden.CETP mice. **Atherosclerosis** **2008**, 197:57-63.
9. JWA van der Hoorn, W de Haan, LM Havekes, JW Jukema, PCN Rensen, HMG Princen. Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE\*3Leiden.CETP mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2008**, 28:2016-2022.
10. W de Haan, J de Vries-van der Weij, JWA van der Hoorn, T Gautier, CC van der Hoogt, M Westerterp, JA Romijn, JW Jukema, LM Havekes, HMG Princen, PCN Rensen. Torcetrapib does not reduce atherosclerosis beyond atorvastatin and induces more pro-inflammatory lesions than atorvastatin. **Circulation** **2008**, 117:2515-2522.
11. W de Haan, JW Jukema. On the forefront of cholesterol management: inhibiting cholesterol absorption and production. **Netherlands Heart J** **2008**, 16: 1-2.
12. W de Haan, CC van der Hoogt, IM Mol, JFP Berbée, JW Jukema LM Havekes, PCN Rensen. Apolipoprotein CI inhibits scavenger receptor BI and increases plasma HDL levels *in vivo*. **Biophys Biochem Res Commun** **2008**, 377:1294-1298.
13. W de Haan, IM Mol, M Hoekstra, JA Romijn, JW Jukema, LM Havekes, HMG Princen, PCN Rensen. PXR agonism decreases plasma HDL levels in APOE\*3-Leiden.CETP mice. **Biochim Biophys Acta**, In Press.
14. J De Vries-Van der Weij, W de Haan, L Hu, M Kuif, HLDW Oei, JWA van der Hoorn, LM Havekes, HMG Princen, JA Romijn, JWA Smit, PCN Rensen. Bexarotene induces dyslipidemia by increased VLDL production and cholesteryl ester transfer protein (CETP)-mediated reduction of HDL. **Endocrinology**, In Press.
15. W de Haan, IM Mol, JFP Berbée, CC van der Hoogt, CJT van der Wal, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Identification of a C-terminal domain in apolipoprotein CI that inhibits CETP activity but not LPL activity, by structure-function analysis. Submitted for publication.

16. D Ye, RB Hildebrand, JFP Berbée, W de Haan, TJC van Berkel, PCN Rensen, M van Eck. Cholesteryl ester transfer protein modulates LPS-induced TNF $\alpha$  production and forms a host defense mechanism against systemic inflammation. Manuscript in preparation.
17. W de Haan, JW Jukema, HMG Princen, LM Havekes, PCN Rensen. Pharmacological intervention to raise plasma HDL levels - lessons from E3L.CETP mice. Manuscript in preparation.

#### Abstracts

1. M Westerterp, W de Haan, JFP Berbee, LM Havekes, PCN Rensen. Apolipoprotein CI deficiency reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2005**, 25:E92.
2. HMG Princen, W de Haan, CC van der Hoogt, CM van den Hoogen, GM Dallinga-Thie, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Torcetrapib inhibits cholesteryl ester transfer protein, atorvastatin decreases it and both increase HDL in *APOE\*3-Leiden.CETP* transgenic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** **2006**, 26:E57.
3. CC van der Hoogt, W de Haan, M Westerterp, M Hoekstra, GM Dallinga-Thie, HMG Princen, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Fenofibrate increases HDL cholesterol by reducing the expression of the cholesteryl ester transfer protein. **Atherosclerosis Suppl** **2006**, 7:560.
4. M Westerterp, CC van der Hoogt, W de Haan, GM Dallinga-Thie, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Cholesteryl ester transfer protein expression increases the (V)LDL/HDL ratio and severely aggravates atherosclerosis in *APOE\*3-Leiden* mice. **Atherosclerosis Suppl** **2006**, 7:489.
5. W de Haan, CC van der Hoogt, CM van den Hoogen, GM Dallinga-Thie, HMG Princen, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Torcetrapib inhibits cholesteryl ester transfer protein and increases HDL in *CETP.APOE\*3-leiden* transgenic mice. **Atherosclerosis Suppl** **2006**, 7:551.
6. JWA van der Hoorn, W de Haan, LM Havekes, JW Jukema PCN Rensen, HMG Princen. Niacin decreases plasma cholesterol and triglycerides and increases HDL in *APOE\*3Leiden.CETP* transgenic mice. Reduced CETP levels and hepatic lipase activity. **Atherosclerosis Suppl** **2007**, 8:211.

7. JWA van der Hoorn, W de Haan, LM Havekes, JW Jukema PCN Rensen, HMG Princen. Niacin decreases plasma cholesterol and triglycerides and increases HDL in APOE\*3Leiden.CETP transgenic mice. Reduced CETP levels and hepatic lipase activity. **J Clin Lipidol 2007**, 1:480.
8. W de Haan, CC van der Hoogt, M Westerterp, GM Dallinga-Thie, JA Romijn, HMG Princen, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Fenofibrate increases HDL-cholesterol by reducing cholesteryl ester transfer protein expression. **J Clin Lipidol 2007**, 1:323.
9. W de Haan, CC van der Hoogt, M Westerterp, GM Dallinga-Thie, HMG Princen, JA Romijn, JW Jukema, LM Havekes, PCN Rensen. Atorvastatin increases HDL-cholesterol by reducing CETP expression in cholesterol-fed *APOE\*3-Leiden.CETP* mice. **J Clin Lipidol 2007**, 1:481.
10. W de Haan, J de Vries-van der Weij, JWA van der Hoorn, JA Romijn, JW Jukema, LM Havekes, HMG Princen, PCN Rensen. Torcetrapib monotherapy increases HDL and reduces atherosclerosis in *E3L.CETP* mice, but does not enhance the anti-atherosclerotic potency of atorvastatin. **J Clin Lipidol 2007**, 1:366.





**Curriculum Vitae**

Willemke de Haan werd geboren op 12 september 1980 te Drachten. Na het behalen van haar VWO diploma in 1999 aan de Christelijke Scholengemeenschap Liudger te Drachten studeerde zij Biomedische Wetenschappen aan de Universiteit van Leiden. Ze behaalde in 2000 haar propedeutisch diploma en in 2002 haar Bachelor diploma. Tijdens de Master fase heeft zij een drietal stages doorlopen. Tijdens haar eerste stage bij de afdeling Immunohematologie en Bloedtransfusie van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) deed zij onderzoek naar de gevoeligheid van gluten voor enzymatische afbraak in het maag-darmkanaal onder begeleiding van Dr F Koning. Tijdens haar tweede stage heeft zij op de afdeling Humane en Klinische Genetica, begeleid door Dr CHM van Moorsel en Dr CL Hartevelde, meegewerkt met het opzetten van een microarray om  $\beta$ -thalassemie mutaties te detecteren. Haar derde stage voerde ze uit onder begeleiding van Dr M Westerterp en Dr PCN Rensen bij TNO-Kwaliteit van Leven waarbij zij onderzoek verrichtte naar het mechanisme achter de lipidenverhogende effecten van het bloedeiwit apoC1. In 2004 behaalde zij haar Master diploma (*cum laude*) en startte ze als assistent in opleiding met haar promotieonderzoek op de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten van het LUMC onder begeleiding van haar promotores Dr LM Havekes en Dr JW Jukema en haar copromotor Dr PCN Rensen. Zij werkte nauw samen met de groep van Dr HMG Princen, werkzaam bij TNO-Kwaliteit van Leven. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in dit proefschrift. Zij won een Poster Award tijdens de Gordon Research Conference on Lipoprotein Metabolism in zowel 2006 als 2008, de Poster Award van de 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Lipoprotein Club in 2006 en de 11<sup>e</sup> Vasculaire Biologie Werkgroep Jaarprijs 2008 (derde prijs) voor haar publicatie in *Circulation*. Vanaf maart 2009 hoopt zij als postdoc onderzoek te verrichten naar de relatie tussen het lipidenmetabolisme en diabetes in de groep van Prof Dr MR Hayden te Vancouver, Canada. Hiervoor heeft zij een Rubicon subsidie van NWO toegekend gekregen.



