

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30640> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Kampen, Erik van

**Title:** Macrophage activation and cholesterol accumulation in atherosclerosis development

**Issue Date:** 2015-01-08

**NEDERLANDSE SAMENVATTING**

VIII

Wereldwijd zijn hartinfarcten en herseninfarcten ten gevolge van hart- en vaatziekten de meest voorkomende doodsoorzaken. Een artikel gepubliceerd door Murray en Lopez in de Lancet in 1997 schat dat er in 2020 ruim 82 miljoen levensjaren (Disability Adjusted Life Years, of DALY's) verloren gaan aan de gevolgen van hartinfarcten alleen. Dit is meer dan bij verkeersongevallen (71 miljoen DALY's) en oorlog (41 miljoen DALY's). Hart- en herseninfarcten zijn vaak het gevolg van slagaderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd. Atherosclerose wordt gekenmerkt door lesievorming in de wand van bloedvaten als gevolg van opeenhoping van cholesterol en immuuncellen.

De ontwikkeling van lesies is een proces dat voorkomt in de overgrote meerderheid van de bevolking; de eerste lesies, zogenaamde "fatty streaks", zijn doorgaans al gevormd voordat men 30 jaar oud is. Gaandeweg worden lesies steeds groter en complexer in opmaak zodat ze de doorbloeding van bloedvaten kunnen beperken. Als een lesie uiteindelijk scheurt wordt het materiaal dat opgesloten was in de lesie blootgesteld aan de bloedsomloop, wat kan leiden tot een bloedstolling cascade. De ontstane bloedprop kan een bloedvat in het hart of in de hersenen verstoppen waardoor een deel van het orgaan geen zuurstof meer krijgt, met als gevolg een hartinfarct, verlamming of zelfs het overlijden van de patiënt.

De mate waarin atherosclerose zich ontwikkelt wordt bepaald door de aanwezigheid van risico factoren. Hierbij spelen ongezonde gewoontes zoals roken, een vetrijk dieet en een gebrek aan lichaamsbeweging een belangrijke rol. Daarnaast wordt het risico om atherosclerose te ontwikkelen ook bepaald door erfelijke factoren die bijvoorbeeld tot hoog cholesterol, diabetes of een hoge bloeddruk leiden.

Therapeutische strategieën om atherosclerose te bestrijden zijn gericht op het verminderen van deze risicofactoren. Daarom worden vaak bloeddrukverlagende en bloedstollingremmende middelen voorgeschreven. De meest belangrijke medicijnen om atherosclerose te bestrijden zijn statines. Statines verlagen het cholesterol gehalte in het bloed en hebben daarnaast ontstekingsremmende effecten op de vaatwand en het immuunsysteem. Hierdoor kan het risico op een infarct verlaagd worden met ongeveer 20%. Naast farmacologische interventie kan er ook operatief ingegrepen worden. Als een patiënt zich meldt in de kliniek met gevorderde atherosclerose kan er gekozen worden om een stent te plaatsen of een bypass operatie uit te voeren om de bloeddoodloop te herstellen en het risico op het ontstaan van een bloedprop te verminderen.

Ondanks de beschikbaarheid van deze behandelingen is atherosclerose nog steeds een van de grootste bedreigingen voor onze gezondheid, en zijn de kosten voor onze maatschappij geassocieerd met behandeling van atherosclerose en gerelateerde invaliditeit en sterfte onacceptabel hoog. Daarom bestaat er een noodzaak om nieuwe, betere behandelingsmethoden te ontwikkelen.

De meest bekende risicofactor voor de ontwikkeling van atherosclerose is cholesterol. Omdat cholesterol niet oplosbaar is in water wordt het verpakt in

lipoproteïnen voor transport, waarna het via de bloedstroom door het hele lichaam verspreid wordt om gebruikt te worden als bouwsteen voor cellen. Lipoproteïnen zijn vetdruppels met een schil die bestaat uit fosfolipiden en een kern die triglyceriden en cholesterol bevat. Er kunnen 5 verschillende typen lipoproteïnen onderscheiden worden op basis van hun formaat en hun dichtheid. De grootste deeltjes, chylomicronen (CM), worden in de darmen gemaakt uit vetzuren en cholesterol dat opgenomen wordt uit de voeding. CM circuleren door het lichaam en geven hun triglyceriden en cholesterol af in de periferie totdat de restdeeltjes opgenomen worden door de lever. De lever gebruikt de bestanddelen van de CM en cholesterol dat geproduceerd wordt in de lever parenchymcellen om "very low-density" lipoproteïnen (VLDL) te maken. Deze hebben een lage dichtheid en een groot formaat. Terwijl VLDL deeltjes hun lading van triglyceriden en cholesterol afgeven in de periferie van het lichaam worden ze eerst "intermediate-density" lipoproteïnen (IDL) en dan "low-density" lipoproteïnen (LDL) met een kleiner formaat en een hogere dichtheid. In tegenstelling tot de andere lipoproteïnen transporteren de "high-density" lipoproteïnen (HDL) cholesterol van de periferie terug naar de lever. Daarom worden HDL deeltjes gezien als beschermend tegen atherosclerose, terwijl de andere deeltjes, CM, VLDL, IDL en LDL, in hoge concentraties het risico op het ontwikkelen van atherosclerose verhogen.

Atherosclerose treedt op in het bloedvat systeem op specifieke plaatsen. Rond aftakkingen in de vaatwand ontstaat turbulentie in de bloedstroom. De endotheelcellaag die de integriteit van de vaatwand waarborgt raakt hierdoor verstoord. De geïrriteerde endotheelcellen kunnen ter plaatste oppervlaktmoleculen tot expressie brengen die herkend worden door patrouillerende immuuncellen, genaamd monocyten. Deze migreren de vaatwand in en differentiëren naar macrofagen. Daarnaast kunnen LDL deeltjes de vaatwand doordringen op plaatsen waar de functie van de endotheelcellaag verstoord is. Als de LDL deeltjes zich in de vaatwand bevinden raken ze geoxideerd en worden ze herkend door het immuunsysteem als lichaamsvreemd. De geoxideerde LDL (oxLDL) deeltjes staan zo aan de basis van een immunoreactie. De macrofagen fagocyteren de oxLDL deeltjes die ze in de vaatwand tegenkomen en proberen het extra cholesterol dat ze hierdoor opnemen weer af te geven aan circulerende HDL deeltjes. Dit proces, genaamd "reverse cholesterol transport", is echter niet effectief genoeg om de ophoping van cholesterol in de vaatwand tegen te gaan, en uiteindelijk ontstaat er een macrofaagrijke lesie in de vaatwand.

Macrofagen spelen een belangrijke rol in de ontwikkeling van atherosclerose. Afhankelijk van externe stimuli kunnen macrofagen differentiëren naar een groot aantal subtypen met sterk variërende functies. Een ruwe classificatie van subtypes onderscheidt M1, M2 en Mox macrofagen. M1 macrofagen ontstaan als gevolg van een locale ontsteking en produceren factoren die de ontsteking verergeren. M1 macrofagen in de lesie verergeren atherosclerose door immuuncellen aan te

trekken en cytotoxische factoren te produceren. Dit leidt tot celdood en afbraak van weefsel in de lesie. Hierdoor zorgen M1 macrofagen ervoor dat de lesies een grotere kans hebben om te scheuren en een infarct te veroorzaken. In tegenstelling tot M1 macrofagen worden M2 macrofagen geassocieerd met wondherstellende processen. Deze macrofagen maken factoren die ontstekingsremmend werken en ze ondersteunen de groei van gladde spiercellen die een stabiele kap van bindweefsel over de lesie heen maken. M2 macrofagen zijn ook in staat om de resten van dode cellen in de lesie op te ruimen, waarmee ze voorkomen dat de ontsteking verergert. M2 macrofagen die hoge hoeveelheden cholesterol opnemen vormen "foam" cellen, zo genoemd vanwege de grote hoeveelheid vetdruppels in de cel. Deze vetrijke macrofagen komen in hoge aantallen voor in de lesie en houden grote hoeveelheden cholesterol vast in de lesie.

Het derde type macrofaag dat veel voorkomt in de atherosclerose lesie is de Mox macrofaag. Mox macrofagen worden gevormd ten gevolge van de oxidatieve stress in de lesie. Dit subtype is minder gespecialiseerd dan de M1 en de M2 macrofagen. Mox macrofagen produceren ook factoren die de ontstekingsreactie kunnen laten escaleren, maar in mindere mate dan de M1 macrofagen. De ontstekingsreactie die aangewakkerd wordt door M1 en Mox macrofagen leidt tot het aantrekken van meer immuuncellen. De infiltrerende inflammatoire cellen produceren agressieve factoren, zoals stikstofmonoxide (NO), die andere cellen aantasten. Uiteindelijk vindt er steeds meer celdood plaats in de lesie en ontstaat er een kern rijk aan dode cellen. Deze kern bestaat uit de celresten en cholesterol dat opgenomen was door "foam" cellen die daarna doodgingen. Zowel M2 macrofagen als Mox macrofagen zijn in staat om celresten op te ruimen, maar gewoonlijk slagen de macrofagen er niet in om de opstapeling van celfragmenten in de lesie tegen te gaan. Vanuit de dynamiek tussen de verschillende celtypen groeit er in de loop van de jaren een gecompliceerde atherosclerotische lesie. Er ontstaan regio's in de lesie met een sterke of een zwakke ontsteking. De gladde spiercellen vormen een beschermende kap over de lesie, maar deze kap is vaak erg dun en kwetsbaar in regio's waar de ontsteking sterk is. Als de beschermende kap scheurt dan komt de inhoud van de lesie, in het bijzonder de dode cellen in de kern, in de bloedstroom terecht. Dit leidt tot een bloedstollingcascade, het verstopt raken van een bloedvat en mogelijk het overlijden van de patiënt. De polarisatie van macrofagen naar M1, M2 en Mox subtypes heeft een grote invloed op de opmaak en de stabiliteit van de lesie. De rol van macrofagen in de vorming van de lesie, in het bijzonder het bevorderen van macrofaag polarisatie naar het M2 subtype, is een veelbelovend target voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.

De voortgang van atherosclerose wordt bepaald door de hoeveelheid LDL cholesterol in het bloed en door de immunreactie die de ontsteking in atherosclerotische lesies veroorzaakt. Deze ontsteking leidt tot de groei en uiteindelijk het verlies van

stabiliteit van de lesie. Belangrijke immunologische processen zoals de productie van immuuncellen vanuit het beenmerg en differentiatie van macrofagen naar ontstekingsbevorderende of ontstekingsremmende subtypes vereisen dat deze immuuncellen gedurende hun levensloop verschillende groepen van genen tot expressie brengen. Om het aflezen van bepaalde genen te stimuleren of te onderdrukken kunnen epigenetische mechanismen gebruikt worden. Een voorbeeld hiervan is het bevestigen van een methyl groep aan de DNA helix, waardoor expressie van een nabijgelegen gen gehinderd kan worden. Genen bevatten een zogenaamde CpG regio die gevoelig is voor methylatie. Door de DNA methylatie van bepaalde genen te verhogen kan de cel de mate waarin het gen tot expressie komt verminderen. Er kan onderscheid gemaakt worden tussen methylatie van specifieke genen en algemene, globale DNA methylatie. Studies hebben aangetoond dat globale DNA methylatie in de atherosclerotische lesie lager is dan in andere weefsels. Dit wijst op verhoogde expressie van een groot aantal genen, met als gevolg een hoge activiteit van de cellen in de lesie. DNA methylatie kan beïnvloed worden door voedingspatronen en factoren zoals de hoeveelheid cholesterol in het bloed, maar methylatiepatronen op het DNA kunnen lang voortbestaan nadat de factoren, die leidden tot de veranderingen in DNA methylatie, al verdwenen weg zijn. Daardoor bestaat er de mogelijkheid dat bepaalde patronen in de methylatie van ons DNA die nadelig zijn voor de gezondheid blijven bestaan lang nadat de oorzaak is opgelost. Om deze reden is het belangrijk dat de rol van het dieet op de vorming van DNA methylatie en de consequenties hiervan voor atherosclerose nader onderzocht worden.

Als de aanwezigheid van kwetsbare lesies in de kransslagaderen of de halsslagader van een patiënt vastgesteld wordt dan kan er ingegrepen worden om vaatvernauwing en het risico van het scheuren van een plak tegen te gaan. Door middel van het plaatsen van een microscopische cilinder van gaas, een stent, wordt de lesie ter plekke plat gedrukt en het bloedvat opgerekt met het resultaat dat de bloedstroom weer hersteld is. Een veel voorkomende complicatie bij deze methode is dat de gladde spiercellen in de vaatwand zich na de ingreep sterk vermenigvuldigen en binnen korte tijd een nieuwe lesie vormen, met het gevolg dat de bloedsomloop weer beperkt wordt. Dit komt doordat de procedure van het plaatsen van de stent gepaard gaat met de lokale vernietiging van de endotheelcellaag. Deze laag is noodzakelijk voor het bewaken van de homeostase van de vaatwand en het verlies van de endotheelcellaag leidt tot uitgroei van de gladde spiercellen en het ontstaan van een ontsteking in de vaatwand. De vorming van lesies in de geplaatste stents zorgt ervoor dat een groot aantal patiënten terug moeten komen om de operatie te herhalen. Om dit probleem op te lossen moeten er nieuwe strategieën onderzocht worden om de groei van lesies in de stents tegen te gaan en het herstel van de endotheelcellaag te bevorderen.

In dit proefschrift wordt de rol van verschillende celtypes, voornamelijk macrofagen en endotheelcellen, in de ontwikkeling van atherosclerotische lesies onderzocht. In de loop van dit onderzoek is gebruik gemaakt van chirurgische technieken en genetisch gemanipuleerde, ofwel transgene, muizen. Hieronder worden de verschillende muismodellen en chirurgische technieken kort toegelicht.

Onderzoek naar atherosclerose in normale muizen is problematisch omdat muizen van nature resistent zijn tegen atherosclerose, onder meer doordat het bloed van muizen relatief hoge hoeveelheden HDL cholesterol bevat. Dit probleem is opgelost dankzij de ontwikkeling van twee muizenmodellen die wel atherosclerose ontwikkelen. Low-density lipoprotein receptor knockout (LDLr KO) muizen hebben een defect in het gen voor een receptor die nodig is om LDL deeltjes te resorberen in de lever. Hierdoor is de hoeveelheid circulerend LDL cholesterol in deze muizen veel hoger. De ontwikkeling van lesies in de vaatwand van deze muizen is erg traag. De ontwikkeling van atherosclerose kan versneld worden door de muizen een dieet rijk aan vet en cholesterol, een zogenaamd Western-type diet (WTD), te voeren. Apolipoprotein E (ApoE) KO muizen zijn genetisch niet in staat om een eiwit te produceren dat nodig is voor de efficiënte functie van de receptoren die de opname van LDL in de lever faciliteren. Dit leidt tot een extreme verhoging van VLDL en LDL cholesterol en ontwikkeling van spontane atherosclerose in enkele maanden. Beide muismodellen worden gebruikt in dit proefschrift.

De beschikbaarheid van muismodellen die een genetisch defect hebben in een gen naar keuze maakt het mogelijk om onderzoek te doen naar de rol van specifieke genen. Een enkel gen kan echter uiteenlopende functies hebben in verschillende celtypen of organen, met als gevolg dat onderzoek soms gehinderd wordt door de samenloop van verschillende effecten die elkaar tegenwerken of versterken. Dit kan opgelost worden door gebruik te maken van een model waarbij de genetische deficiëntie beperkt is tot een enkel celtype. Door middel van een beenmergtransplantatie is het mogelijk om de witte bloedcellen van een muis te vervangen voor witte bloedcellen van een donormuis met een genetische mutatie. Hierdoor kan de werking van het gen van interesse in specifiek witte bloedcellen onderzocht worden.

De ontwikkeling van lesies in LDLr KO en apoE KO muizen is een proces dat meer dan twee maanden duurt. Dit kan versneld worden door het plaatsen van een "cuff", een strakke cilinder die het bloedvat vernauwd, om de carotis van een muis. Omdat de diameter van het bloedvat ter plaatse van de cuff iets kleiner is ontstaan er wervels in de bloedstroom, en dit leidt tot verstoring van de endotheelcellaag. De endotheelcellen kunnen hun beschermende functie niet meer uitvoeren en binnen korte tijd ontstaat er een lesie. Dit model wordt gebruikt in dit proefschrift om de expressie van bepaalde genen gedurende de ontwikkeling van een lesie te meten.

Om de klinische gevolgen van het plaatsen van een stent te simuleren in het

laboratorium hebben we een methode toegepast om stents te plaatsen in apoE KO muizen. Omdat muizen zo klein zijn is het niet mogelijk om een stent te plaatsen zonder ernstige schade aan te richten in het vatenstelsel van het proefdier. In plaats daarvan wordt er een stent geplaatst in de grote lichaamsslagader van een donor muis. De grote lichaamsslagader wordt daarna verwijderd uit de donor en geïmplanteerd in de carotis van een ontvanger. Dit model is in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift gebruikt om het herstel van de endotheelcellaag na het plaatsen van een stent te meten.

Hier volgt een overzicht van de belangrijkste bevindingen van de hoofdstukken in dit proefschrift.

In dit **hoofdstuk 2** wordt het belang van de endotheelcellaag voor het herstel van de vaatwand na het plaatsen van een stent beschreven. Door gebruik te maken van muizen die het reporter-gen "LacZ" selectief tot expressie brengen in endotheelcellen kon onderscheid gemaakt worden tussen endotheelcellen afkomstig van het geïmplanteerde weefsel waarin de stent geplaatst was en endotheelcellen die afkomstig waren van de gastheer. Het herstel van de endotheelcellaag in de beschadigde bloedvaten treedt voornamelijk op dankzij de uitgroei en migratie van endotheelcellen vanuit nabij gelegen intacte bloedvaten. Daarnaast was er ook nog een bijdrage van endotheliale progenitor cellen (EPC's). Deze ontstaan uit het beenmerg en circuleren door de bloedstroom. EPC's zijn in staat om bij te dragen aan het herstel van de endotheelcellaag door zich te hechten aan de vaatwand en vervolgens te prolifereren. De mate van deze bijdrage is nog niet duidelijk, en eerdere studies hebben tegenstrijdige antwoorden gevonden. Door middel van een beenmergtransplantatie met beenmerg dat LacZ tot expressie brengt in endotheelcellen kon aangetoond worden dat de bijdrage van EPC's aan het herstel van het endotheel significant was, maar erg varieerde tussen de verschillende dieren. Deze individuele variatie verklaart wellicht de verschillen tussen de eerdere studies die dit proces bestudeerd hebben.

Het plaatsen van een stent veroorzaakt een verwonding aan de vaatwand die leidt tot de groei van een lesie. Om de groei van deze lesies te remmen wordt gebruik gemaakt van stents gecoat met middelen die remmend werken op de celgroei. Helaas beperken deze middelen niet alleen de groei van gladde spiercellen, maar ook de groei van endotheelcellen. Dit werd bevestigd in deze studie; het plaatsen van een stent die gecoat was met paclitaxel resulteerde in verminderde lesievorming ten opzichte van een "kale" stent, maar ook in een sterk beperkt herstel van de endotheelcellaag. De endotheelcellaag is essentieel voor het herstel van een gezonde vaatwand. Dit werd gedemonstreerd door stents te plaatsen in muizen die GTP-cyclohydrolase (GTP) tot expressie brengen in endotheelcellen. Expressie van GTP heeft een verhoogde productie van stikstofmonoxide (NO) tot gevolg, en dit molecuul is erg belangrijk voor de functie van endotheelcellen.



Dankzij de verbeterde endotheelfunctie in deze dieren was het herstel van de endotheelcellaag na het plaatsen van een kale stent veel sneller, en dit leidde tot een sterk verminderde lesievorming zonder het gebruik van groeiverminderende stoffen. Het goed functioneren van de endotheelcellaag is dus een essentiële component van het herstel van de vaatwand na een verwonding, en interventies die het herstel van het endotheel beperken werken zichzelf dus tegen.

In **hoofdstuk 3** wordt het effect van Arginase1 (Arg1) expressie door macrofagen op de ontwikkeling van atherosclerose onderzocht. Arg1 is een belangrijke marker voor M2 macrofagen. Het is een enzym dat L-arginine omzet naar L-ornithine, dat vervolgens omgezet kan worden in stoffen die proliferatie van gladde spiercellen en bindweefselvorming bevorderen. Een belangrijk aspect van Arg1 activiteit is dat L-arginine ook gebruikt wordt door enzymen die NO produceren. Door het beperken van de hoeveelheid beschikbare L-arginine werkt Arg1 dus de productie van NO tegen. In hoofdstuk 2 wordt beschreven dat NO een belangrijke factor is die het gezond functioneren van endotheelcellen stimuleert. Productie van NO in macrofagen heeft echter een tegengestelde functie. In hogere concentraties is NO in staat om weefsels aan te tasten en een ontstekingsreactie teweeg te brengen. Eerdere studies hebben aangetoond dat verhoogde expressie van Arg1 door middel van virale transfectie in de gehele atherosclerotische lesie leidt tot een verhoging van de hoeveelheid bindweefsel in de lesie en dus tot een verminderd risico dat van scheuring van de lesie. In deze studie wordt specifiek het effect van Arg1 functie in macrofagen onderzocht. We tonen aan dat macrofagen die ontstaan uit beenmerg (BMDM's) en die een defecte vorm van Arg1 tot expressie brengen (Arg1 KO BMDM's) anders reageren op blootstelling aan geacetylerde LDL deeltjes (acLDL). Arg1 KO BMDM's die gestimuleerd worden met acLDL hebben een hogere expressie van het gen SREBP-1, een belangrijke regulator van lipide productie in de cel. Wellicht dankzij veranderingen in SREBP-1 expressie hebben Arg1 KO BMDM's verhoogde ophoping van cholesterol en vetten en vormen ze vetrijke macrofagen genaamd "foam" cellen. Daarnaast hebben acLDL gestimuleerde Arg1 KO BMDM's een lagere expressie van het M1 gen iNOS en een hogere expressie van M2 gen FIZZ-1. Om het effect van Arg1 KO macrofagen op atherosclerose vorming te bestuderen is er een beenmergtransplantatie uitgevoerd met Arg1 KO beenmerg in LDLr KO muizen. Na een herstelperiode van 8 weken werden de muizen 9 weken lang een dieet rijk aan vetten en cholesterol (WTD) gevoerd teneinde de ontwikkeling van atherosclerotische lesies te stimuleren.

Behalve een drastische vermindering in het aantal B-cellen waren er geen verschillen in de hoeveelheid circulerende witte bloedcellen tussen de muizen die Arg1 KO beenmerg (BM) hebben ontvangen en degene die normaal wild-type (WT) BM kregen. In de milt, een belangrijk orgaan voor de opslag van immuuncellen kon een kleine toename in de hoeveelheid CD4<sup>+</sup> T-cellen gemeten worden. Dit komt overeen met bevindingen uit de literatuur, waar aangetoond is dat T-cellen

L-arginine nodig hebben voor hun groei, en dat Arg1 door het wegvangen van L-arginine uit de directe omgeving de groei van T-cellen kan beperken. Omdat dit effect erg bescheiden is kunnen we concluderen dat de Arg1 functie van macrofagen in de milt geen grote invloed heeft op lokale T-cellen.

In overeenstemming met de observatie dat Arg1 BMDM's meer foam cellen vormen laten we zien dat er verhoogde foam cell vorming is in de buikholte van muizen die Arg1 KO BM hebben ontvangen.

Transplantatie met Arg1 KO BM leidde niet tot verschillen in de grootte van de atherosclerotische lesies van de ontvangende muizen, en er waren ook geen verschillen in bindweefselvorming en de hoeveelheid macrofagen in de lesie. Dit is verrassend, omdat we verschillen zagen in de manier waarop macrofagen reageerden op blootstelling aan acLDL. We kunnen hieruit concluderen dat het effect van Arg1 functie in macrofagen niet sterk genoeg is om de vorming van atherosclerotische lesies te beïnvloeden. Onze conclusie is hiermee in tegenspraak met de bevindingen van een eerdere studie waarin verhoogde expressie van Arg1 in de lesie leidde tot meer productie van bindweefsel in de lesie. In deze publicatie zijn het echter niet alleen macrofagen, maar ook gladde spiercellen en wellicht endotheelcellen die meer Arg1 produceren. Daarom is het waarschijnlijk dat de effecten van Arg1 functie in gladde spiercellen en endotheelcellen in de lesie groter zijn dan de effecten van macrofaagspecifieke Arg1 functie.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de rol van een ander molecuul dat in macrofagen tot expressie komt, Oxysterol Binding Protein Related Protein 8 (ORP8). ORP8 is aangetoond in macrofagen in atherosclerotische lesies van mensen. Macrofagen die geen ORP8 tot expressie kunnen brengen (ORP8 KO) kunnen meer cholesterol afgeven aan pre-HDL deeltjes dankzij een verhoogde productie van de cholesterol transporter "ATP-binding cassette transporter" A1 (ABCA1). In dit hoofdstuk wordt aangetoond dat ORP8 aanwezig is in atherosclerotische lesies in muizen, en dat de hoeveelheid ORP8 expressie in lineair verband staat tot de expressie van CD68, een marker voor de hoeveelheid macrofagen in het weefsel. Macrofagen gekweekt uit beenmerg dat een defect had in het ORP8 gen (ORP8 KO BMDM's) werden gestimuleerd met LPS of IL-4 om respectievelijk M1 macrofagen en M2 macrofagen te genereren. ORP8 KO BMDM's hebben een verminderde expressie van macrofaag differentiatie markers. Expressie en productie van het ontstekingsbevorderende signaalmolecuul IL-6, dat normaliter geproduceerd wordt door M1 macrofagen, is verminderd in ORP8 KO M1 macrofagen. Verder is de expressie van de M2 marker FIZZ-1 lager in ORP8 KO M2 macrofagen. In zowel M1, M2 en ongestimuleerde macrofagen was de expressie van ABCA1 verminderd. Dit komt niet overeen met de bevindingen in de hierboven aangehaalde studie met ORP8 KO macrofagen, maar een latere publicatie heeft aangetoond dat het effect van ORP8 deficiëntie geslachtsafhankelijk is. In overeenstemming met onze resultaten resulteert ORP8 deficiëntie in mannelijke dieren in een vermindering van ABCA1 expressie. De

verandering in ABCA1 expressie ging echter niet gepaard met een verandering in cholesterol afgifte aan HDL deeltjes.

Vervolgens werden LDLr KO muizen getransplanteerd met beenmerg van mannelijke ORP8 KO donoren. Omdat van alle cellen die uit het beenmerg ontstaan ORP8 alleen tot expressie komt in macrofagen wordt zo een macrofaagspecifieke deletie geïntroduceerd. Vanaf acht weken na beenmergtransplantatie werden de muizen negen weken lang een WTD gevoerd. Aan het einde van deze periode hadden de ORP8 KO BM muizen een hogere hoeveelheid VLDL cholesterol in het bloed; een factor die kan leiden tot versnelde atherosclerose vorming. Er was geen verschil in het aantal circulerende witte bloedcellen, maar er was wel een vermindering in het aantal "foam" cellen in de buikholte. Dit is interessant omdat de hoeveelheid VLDL cholesterol in het bloed verhoogd was, wat normaliter zou leiden tot een toename in "foam" cel vorming. Net als de bevindingen in ORP8 KO BMDM's vonden we een verlaagde expressie van ABCA1 in de macrofagen van de buikholte.

Atherosclerotische lesie vorming in de muizen getransplanteerd met ORP8 KO BM was verminderd, ondanks de verhoging in VLDL cholesterol. Dit is waarschijnlijk vanwege de verminderde productie van ontstekingsfactoren door ORP8 KO macrofagen en een vermindering in "foam" cel vorming. Er werd echter geen verschil gevonden in de samenstelling van de lesies.

ORP8 maakt deel uit van een familie van ORP's die in totaal 12 leden heeft. In **hoofdstuk 5** worden de expressiepatronen van alle leden van deze familie in diverse organen bestudeerd. In WT muizen is de expressie van ORPs bijzonder sterk in nier weefsel. Er is weinig bekend over de functie van ORP's in de nier. ORP's detecteren intracellulaire concentraties van oxysterolen, signaalmoleculen die bijproducten zijn van cholesterol metabolisme. De concentratie van oxysterolen in de nier kan sterk variëren, bijvoorbeeld in geval van suikerziekte. Hoge concentraties oxysterolen kunnen leiden tot een verlies in nierfunctie. Daarom is het mogelijk dat de concentratie van oxysterolen in de nier nauwkeurig gereguleerd moet worden, in het bijzonder door een hogere aanwezigheid van ORP's. Dit is wellicht een interessant nieuw onderwerp voor onderzoek naar ORP functies.

Verder was de expressie van diverse ORPs (ORP1, ORP2, ORP3, ORP9 en ORP11) erg hoog in de aortaboog.

Toen het expressiepatroon van ORP's in de aortaboog van WT muizen vergeleken werd met de expressie in de aortaboog van apoE KO dieren op normaal (chow) dieet en op WTD dieet was er een zeer sterke opregulatie van ORP8 expressie te zien. In overeenstemming met eerdere bevindingen was er een positieve correlatie tussen het ORP8 signaal en de verhoogde expressie van macrofaag marker CD68. Ondanks dat het aortaboog weefsel van apoE KO muizen relatief meer macrofagen bevat dan dat van WT muizen is er geen verhoging in expressie van de M1 marker iNOS of de M2 marker FIZZ-1. De expressie van de Mox marker HO-1 is echter

wel hoger in apoE KO muizen, en heeft een sterke lineaire relatie met de expressie van ORP8 en CD68 in deze monsters. HO-1 is een anti-atherogene factor en de aanwezigheid van HO-1 in de atherosclerotische lesie werkt beschermend. De relatie tussen ORP8 en HO-1 is nog niet bekend en dient verder onderzocht te worden.

**Hoofdstuk 6** richt zich op de rol van veranderingen in DNA methylatie, veroorzaakt door verschillen in dieet, op de ontwikkeling van atherosclerose. DNA methylatie patronen in het beenmerg beïnvloeden de groei van witte bloedcellen. Daarom werd er beenmerg geïsoleerd van LDLr KO muizen die 45 weken lang WTD gevoerd werden en dit werd getransplanteerd naar LDLr KO muizen die alleen chow dieet gevoerd kregen. In tegenstelling tot dieren die controle beenmerg (chow BM) kregen hadden, op 16 weken na transplantatie, de muizen met beenmerg van WTD muizen (WTD BM) verminderde methylatie in het beenmerg van de genen Pu.1 en IRF8. Deze genen zijn belangrijk voor de differentiatie van monocyten en macrofagen. De verminderde methylatie leidt ertoe dat deze genen meer tot expressie gebracht kunnen worden. Er werd inderdaad een dramatische verhoging in monocyten gemeten in de bloedstroom, en in de milt werd een verhoogde monocyten- en macrofaagactivatie gemeten. Dankzij deze verhoging in het aantal en de activatie van monocyten en macrofagen waren de atherosclerotische lesies in de muizen die WTD BM ontvingen groter dan die in de chow BM muizen. De effecten van WTD voeding op DNA methylatie zijn 16 weken na beenmergtransplantatie nog meetbaar en hebben een doorslaggevende invloed op de voortgang van atherosclerose. Dit geeft aan dat het effect van onze voeding op DNA methylatie mogelijk een significante rol speelt in de ontwikkeling van atherosclerose. Het is dus belangrijk om in patiënten met atherosclerose naast cholesterolverlaging te kijken naar methodes om ongezonde DNA methylatiepatronen te identificeren en te zoeken naar manieren om dit proces terug te draaien.

Huidige therapieën voor patiënten met atherosclerose richten zich voornamelijk op het verlagen van cholesterol, maar deze strategie is nog niet effectief genoeg om de meerderheid van de hartinfarcten en andere cardiologische aandoeningen te voorkomen. De interactie tussen de verschillende celtypen in de lesie is een belangrijk veld voor het identificeren van nieuwe therapeutische strategieën om de huidige behandelingsmethodes aan te vullen. In dit proefschrift is de rol van endotheelcellen en macrofagen tijdens de vorming van lesies bestudeerd, en worden de expressiepatronen van sterol sensoren in gladde spiercellen in de lesie geïdentificeerd. Uiteindelijk worden er belangrijke conclusies getrokken over de rol van ons dieet op het functioneren van het immuunsysteem. De nieuwe inzichten verworven in dit proefschrift kunnen zo bijdragen aan het ontdekken van nieuwe richtingen voor atherosclerose onderzoek.

