



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Modulation of genes involved in inflammation and cell death in atherosclerosis-susceptible mice

Zadelaar, Anna Susanne Maria

Citation

Zadelaar, A. S. M. (2006, March 23). *Modulation of genes involved in inflammation and cell death in atherosclerosis-susceptible mice*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4401>

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/1887/4401>

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

Summary & Samenvatting

Summary

In this thesis we focussed on atherosclerosis as the primary cause of cardiovascular disease. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease and is characterised by the focal accumulation of lipid laden foam cells covered by a fibrous smooth muscle cell rich cap. Progression of such a plaque depends on the balance of pro-atherogenic and anti-atherogenic factors. These factors determine plaque composition and thereby plaque stability and vulnerability to rupture. Since inflammation and cell death are thought to be important processes in the onset and progression of atherosclerosis, we investigated the role of several genes involved in inflammation and cell death in the vessel wall and their effect on atherosclerosis. To this end, we used several ways to modulate genes in various atherosclerosis-susceptible mice.

Since inflammation and cell death are two important processes in the transition towards advanced and complex atherosclerotic lesions, we investigated the involvement of two genes of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. In **chapter 2** we investigated tumor necrosis factor- α (TNF α), a pleiotropic cytokine exerting both inflammatory and cell death modulatory activity, which is thought to play a role in the pathogenesis of atherosclerosis. Studies in mice indicated that TNF α affects atherosclerosis minimally or not under conditions that allow fatty streak formation. To examine the possible role of TNF α in advanced and complex atherosclerotic lesions we crossbred TNF α -deficient mice onto an ApoE*3Leiden background and fed them a cholesterol-rich diet. Comparable levels of plasma cholesterol and triglycerides and the systemic inflammatory parameters, serum amyloid A and soluble intercellular adhesion molecule-1 were found in TNF α -deficient and control mice. Although absence of TNF α did not affect the quantitative area of atherosclerosis, a higher relative number of early lesions and a lower relative number of advanced lesions were observed. In addition, the advanced lesions showed less necrosis and an increase in apoptosis in absence of TNF α . Our data indicate that TNF α stimulates the formation of lesions towards an advanced phenotype, with more lesion necrosis and a lower incidence of apoptosis.

In **chapter 3** another member of the TNF superfamily was investigated: Fas Ligand. The death receptor Fas and Fas Ligand (FasL) are present in human advanced atherosclerotic plaques. The activation of the Fas/FasL pathway of apoptosis has been implicated in plaque vulnerability. We investigated whether overexpression of FasL in pre-existing

atherosclerotic lesions can induce lesion remodelling and rupture-related events. Carotid atherogenesis was initiated in apolipoprotein E deficient mice by placement of a perivascular silastic collar. The resulting plaques were incubated transluminally with recombinant adenovirus carrying FasL (Ad-FasL, lateral) or control β -galactosidase (Ad-LacZ, contralateral). Transfection was restricted to the smooth muscle cell-rich cap of the plaque, and FasL expression led to increased apoptosis in the cap one day after gene transfer. Three days after gene transfer, FasL expression led to a reduction in the number of cap cells. Two weeks after Ad-FasL transfer, non-thrombotic rupture, intra-plaque haemorrhage, buried caps and iron deposits were observed, indicative of enhanced plaque vulnerability. These data demonstrate that advanced murine plaques are sensitive to Fas/FasL induced apoptosis, which may indicate that stimulation of this pathway could result in plaque remodelling towards a more vulnerable phenotype.

Since SMCs are the only cells producing the structurally important collagen, SMC growth would be favourable. However, weakening them under the influence of inflammatory cytokines and rendering them more susceptible to cell death may lead to plaque destabilization and remodelling towards a more vulnerable phenotype. The guardian of cell cycle, the tumor suppressor protein p53, is a potent inhibitor of cell growth and inducer of apoptotic cell death. The mdm2 oncoprotein inhibits p53 activity during embryonic development and in adult homeostatic tissues. Whether tight surveillance of p53 activity is required in terminally differentiated cells is unknown and is first addressed in **chapter 4**. To test this, conditional inactivation of mdm2 was carried out in G0 smooth muscle cells (SMCs) of mice harboring mdm2 floxed alleles and a tamoxifen-inducible Cre-recombinase under control of the SM22 promoter. Upon induction of SMC-specific mdm2 deletion, mice became rapidly ill and died. Necropsy showed severe small intestinal dilatation and histological analyses indicated a severe reduction in the number of intestinal SMCs. Increased p53 stability and activity was detected in the remaining SMCs and the phenotype was completely rescued on a p53-null background. Surprisingly, SMCs did not exhibit signs of apoptotic cell death but had a necrotic morphotype including a “mottled” nucleus and marked mitochondrial and membrane lesions. Together, Mdm2 prevents accumulation of active p53 in quiescent SMCs and induction of p53-mediated necrotic cell death in vivo.

Often pathological processes such as atherosclerosis and restenosis occur in highly localized regions of the vasculature. Unfortunately, systemical induction of the mouse model described in **chapter 4** presented a lethal phenotype and hampered studies of the role of SMC-specific p53 in atherosclerosis. To avoid systemical side-effects a restriction to the area that is conditionally gene targeted is required. To this end, we added spatial control to the conditional model in **chapter 5**. We describe a means to conditionally modify genes at a predefined and localized region of the vasculature using a perivascular drug delivery device (PDD). A 4-hydroxytamoxifen (4-OHT)-eluting PDD was applied around the carotid or femoral artery of a mouse strain, carrying both the tamoxifen-inducible and smooth muscle cell (SMC)-specific Cre-recombinase (SM-Cre-ERT2) transgene and a stop-floxed β -galactosidase gene in the Rosa26 locus: the SM-CreERT2(ki)/ rosa26 mouse. A dose and time curve of 0-10% (w/w) 4-OHT and 0-14 days application of the PDD in SM-CreERT2(ki)/ rosa26 mice showed optimal gene recombination at 1% (w/w) 4-OHT loading at 7 days post application in SMCs of carotid and femoral arteries. Recombination was similar to the level achieved by systemic tamoxifen administration and was completely confined to the PDD-treated vessel wall segment. Thus, local application of a 4-OHT-eluting PDD results in vascular SMC-specific Cre-mediated recombination in SM-CreERT2(ki)/ rosa26 mice without affecting additional SMCs.

In **chapter 6** we took a different approach and used a pharmacological compound to stimulate the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and modulate their target genes. PPAR α is mostly involved in lipid metabolism and PPAR γ in glucose homeostasis and the respective PPAR agonists were proven effective in positively regulating these processes. PPAR agonists are suggested to have pleiotropic effects, although their nature is unclear and revolves around putative effects on endothelial function, inflammation, cell cycle, thrombosis, plaque stability, and immune regulation. These effects suggest that PPAR α and γ agonists may have additional cardiovascular benefits. We investigated whether the combined PPAR α / γ agonist tesaglitazar, in clinical development, has anti-atherogenic effects in ApoE*3Leiden mice with normal and reduced insulin sensitivity. ApoE*3Leiden transgenic mice were fed either a low-fat (LF) or high-fat (HF) insulin-resistance-inducing diet. In both LF and HF-fed mice, one group received a high-cholesterol supplement (1% wt/wt, HC-group). A second group received

the same HC diet, additionally supplemented with 0.5 μ mol tesaglitazar/kg diet (T). A third control group received a low cholesterol supplement (0.1% wt/wt, LC-group), resulting in plasma cholesterol levels similar to those of the T-group. Tesaglitazar treatment reduced atherosclerosis in the aortic root and induced a shift to less severe lesions. The anti-atherosclerotic effect goes beyond cholesterol lowering, and is more pronounced in animals on high-fat diet. In addition, tesaglitazar treatment reduced inflammatory parameters as plasma SAA levels, the number of adhering monocytes, and NF κ B activity in the vessel wall. Therefore, the mechanism by which tesaglitazar exerts its anti-atherosclerotic actions could be associated with its anti-inflammatory effects.

Together, the data from this thesis support that apoptotic and necrotic cell death and inflammation are important processes in atherosclerosis. The genes involved in inflammation and cell death studied in this thesis, *i.e.* TNF α , FasL, p53 and Rb play a role in changing plaque composition towards a possibly more vulnerable phenotype. Although rupture-related events were observed in one study, targeting only one gene at the time showed no major influence on plaque composition, which seems logical, considering the multifactorial, highly complicated micro-environment of the advanced atherosclerotic plaque. From this thesis we can derive that genes involved in cell death and inflammation need to be targeted at the right place, at the right time, and in the right combination. Conditional models, when optimized, make an excellent tool in this research. A clarification of the molecular mechanisms, responsible for inflammation and cell death in atherogenesis eventually leading to acute clinical events, may aid in the development of novel therapeutic strategies and experimental models to the benefit of the treatment of atherosclerosis and its complications. While this would aid the existing patient, with the knowledge that we currently possess, a prevention rather than cure approach would be the preferable strategy for the next generation people.

Samenvatting

In dit proefschrift staat atherosclerose centraal als belangrijkste oorzaak van hart en vaatziekten. Atherosclerose is een chronisch ontstekingsproces, gekarakteriseerd door de plaatselijke ophoping van met vetbolletjes gevulde schuimcellen, bedekt door een fibreuze kap van gladde spiercellen. De verdere ontwikkeling van deze plaque is afhankelijk van de balans tussen pro- en anti-atherosclerotische factoren. Deze factoren bepalen de samenstelling van de plaque en daarmee ook de stabiliteit, ofwel de gevoeligheid voor ruptuur. Ontsteking en celdood zijn voorbeelden van dergelijke belangrijke processen in het ontstaan en ontwikkelen van een plaque. Daarom hebben we de rol van verschillende genen betrokken bij deze processen in de vaatwand bestudeerd en gekeken naar hun effect op atherosclerose. Hiertoe hebben we gebruik gemaakt van verschillende manieren om genen te moduleren in verschillende muismodellen voor atherosclerose.

Naar aanleiding van de betrokkenheid van ontsteking en celdood in de voortgang naar een ingewikkelde, vergevorderde plaque, hebben we onderzoek verricht naar de betrokkenheid van 2 genen uit de tumor necrose factor (TNF) superfamilie. In **hoofdstuk 2** gaat het om de tumor necrose factor alpha (TNF α). TNF α is een cytokine, dat zowel ontsteking als celdood kan beïnvloeden en waarvan men denkt dat het een rol speelt in de pathogenese van atherosclerose. Studies in muizen gaven aan dat TNF α de vorming van beginnende atherosclerotische plaques minimaal tot niet beïnvloedt. Daarom hebben we de rol van TNF α bestudeerd onder condities van vergevorderde atherosclerose ontwikkeling. Hiertoe hebben we in ApoE3*Leiden muizen TNF α op totaal lichaamsniveau uitgeschakeld en de muizen een cholesterolrijk dieet gevoerd. Plasma cholesterol, triglyceriden en de systemische ontstekingsparameters, serum amyloid A en oplosbaar intercellulair adhesie molecuul-1 waren gelijk in muizen met en zonder TNF α . Hoewel afwezigheid van TNF α de kwantitatieve atherosclerose oppervlakte niet heeft beïnvloed, zijn er wel een relatief hoger aantal beginnende en een lager aantal vergevorderde plaques gevonden. Daarnaast was er in vergevorderde plaques zonder TNF α minder necrose en meer apoptose. Dit wijst erop dat TNF α de transitie van plaques naar een vergevorderd fenotype met meer necrose en een lagere incidentie van apoptose stimuleert.

In **hoofdstuk 3** hebben we het tweede lid van de TNF superfamilie onderzocht, namelijk Fas Ligand. De celdood receptor Fas en zijn ligand (Fas Ligand) zijn beiden aanwezig in

humane vergevorderde atherosclerotische plaques. Van de inductie van apoptose via de Fas/Fas Ligand route wordt gesuggereerd dat het invloed heeft op de ruptuurgevoeligheid van de plaque. In deze studie onderzochten we destabilisatie en hermodulering van plaques in apolipoproteïne E deficiënte ($\text{apoE}^{-/-}$) muizen door lokaal Fas Ligand tot overexpressie te brengen in de gladde spiercelrijke kap van reeds aanwezige atherosclerotische plaques. De ontwikkeling van atherosclerotische plaques werd geïnduceerd in de carotiden van $\text{apoE}^{-/-}$ muizen door het plaatsen van een silastische collar om het vat. De gevormde plaques werden transluminaal geïncubeerd met een adenovirus, dat Fas Ligand tot expressie brengt (Ad-FasL, lateraal), en een controle β -galactosidase adenovirus (Ad-LacZ, contra-lateraal). Transfectie bleef beperkt tot de gladde spiercelrijke kap van de plaque en FasL expressie leidde tot een verhoging van apoptose in de kap 1 dag na transfectie. Drie dagen na transfectie veroorzaakte de expressie van FasL een verlaging in het aantal kapcellen, terwijl twee weken na transfectie, intra-plaque bloedingen, begraven gladde spiercel kops, ijzerafzettingen en breuken in de endotheellaag zonder thrombose waargenomen zijn. Hiervan wordt gesuggereerd dat ze geassocieerd zouden kunnen zijn met plaque ruptuur. Geconcludeerd is, dat gevorderde plaques gevoelig waren voor apoptose via de Fas/Fas Ligand route en dat stimulatie van die route zou kunnen leiden tot hermodulering van de plaque naar een fenotype dat gevoeliger is voor ruptuur.

Aangezien gladde spiercellen als enige in de plaque collageen produceren voor de stevigheid en stabiliteit van de plaque, zou het gunstig kunnen zijn als er meer van deze cellen aanwezig waren en ze zich zouden vermeerderen. Anderzijds zou het ongunstig zijn als ze verzwakt worden door ontstekingscytokines, waardoor ze gevoeliger worden voor celdood. Dit zou kunnen leiden tot destabilisatie van plaques en hermodulering tot een ruptuurgevoeliger fenotype. De beschermer van de celcyclus, het tumor suppressor eiwit p53, is een belangrijke remmer van celgroei en een induceerder van apoptotische celdood. Het Mdm2 onco-eiwit remt de activiteit van p53 tijdens embryonale ontwikkeling en in volwassen homeostatische weefsels. Of de strakke regulering van p53 activiteit door Mdm2 ook vereist is in terminaal gedifferentieerde, niet-gestresste cellen is onbekend en daarom hebben we dit eerst onderzocht in **hoofdstuk 4**. Hiertoe hebben we specifiek in G0 gladde spiercellen Mdm2 systemisch, conditioneel geïnactiveerd met behulp van een tijds- en conditie geïnduceerd muismodel. Deze muis bevat gefloxed Mdm2 allelen en een

tamoxifen-reguleerbaar Cre-recombinase onder aansturing van de SM22 promotor. Als gevolg van de gladde spiercel-specifieke uitschakeling van mdm2 werden de muizen snel ziek en gingen daarna dood. Bij sectie viel ernstige zwelling van de dunne darm op en histologische analyse liet een reductie in het aantal gladde spiercellen van de darm zien. Verhoogde stabiliteit en activiteit van p53 was waargenomen in de overgebleven gladde spiercellen en het fenotype werd compleet gered bij kruising naar een p53 knock-out achtergrond. Opvallend was, dat gladde spiercellen geen kenmerken van apoptotische celdood hadden, maar wel kenmerken van een necrotisch morfotype, waaronder een “gemottelde” kern en opmerkelijke lesies in de mitochondriën en het membraan. Samenvattend, Mdm2 voorkomt de opstapeling van actief p53 in G0 gladde spiercellen en de inductie van p53-gemedieerde necrotische celdood *in vivo*.

Vaak komen pathologische processen als atherosclerose en restenose voor in zeer plaatselijke delen van het vaatstelsel. Nadeligerwijs resulteerde de systemische inschakeling van het conditionele muismodel van **hoofdstuk 4** in een dodelijk fenotype, dat verder onderzoek naar de rol van gladde spiercel-specifiek p53 in atherosclerose onmogelijk maakte. Om nadelige systemische bijwerkingen te voorkomen, zou een restrictie tot het deel van het weefsel, dat conditioneel gemoduleerd wordt, bewerkstelligd moeten worden. In **hoofdstuk 5** hebben we daarom de toepassing van een systeem beschreven, bestaande uit een polymeer dat farmacologische verbindingen kan insluiten en weer vrijlaten. Om het gladde spiercel-specifieke conditionele muismodel te activeren plaatsten we op het gewenste tijdstip en lokatie een hulsel van het polymere afleveringssysteem gevuld met 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) om een bepaald deel van de vaatwand van de carotis en de femoralis. Om het muismodel met het tamoxifen-reguleerbare Cre-recombinase onder aansturing van de SM22 promotor (SM22CreER^{T2}(ki) muis) te karakteriseren is de SM22CreER^{T2}(ki) muis gekruisd met de rosa26 reporter muislijn. Recombinatie van cellen in deze muis is te herkennen aan een blauw reactie product na toevoeging van een kleurgelabeld substraat voor β -galactosidase. Een dosis en tijdscurve van 0-10% (w/w) 4-OHT en 0-14 dagen applicatie van het toedieningssysteem in SM-CreER^{T2}(ki)/ rosa26 muizen gaf een optimale recombinitie bij 1% (w/w) 4-OHT lading op 7 dagen na applicatie in gladde spiercellen van de carotis en femoralis. Met het unieke polymere 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) toedieningssysteem verkregen we een gelijke hoeveelheid gladde spiercelspecifieke, Cre-gemedieerde

recombinatie als bij systemische 4-OHT toediening, echter wel beperkt tot het deel van de behandelde vaatwand. Uit deze studie blijkt, dat de toediening van 4-OHT via het unieke polymere farmacologische toedieningssysteem resulteerde in specifieke en zeer lokale Cre-gemedieerde recombinatie in de SM-CreERT2(ki)/ rosa26 muis.

In **hoofdstuk 6** hebben we voor het moduleren van genen een andere aanpak gekozen. We gebruikten een farmacologische stof om peroxisome proliferator-geactiveerde receptoren (PPARs) te stimuleren en daardoor genen te beïnvloeden. Er zijn 3 PPAR subtypes: PPAR α , PPAR γ en PPAR β/δ . Het meeste is bekend over PPAR α en γ . PPAR α is voornamelijk betrokken bij vetmetabolisme en PPAR γ bij glucose homeostase en de respectievelijke PPAR agonisten hebben hier een gunstig effect op. Van PPAR agonisten wordt gezegd dat ze pleiotrope effecten hebben. Hoewel de aard van deze effecten nog niet uitgekristalliseerd is, hebben ze vermoedelijk te maken met effecten op endotheel functie, ontsteking, celcyclus, thrombose, plaque stabiliteit en immunregulatie. Dit zou kunnen betekenen dat PPAR α en γ agonisten extra cardiovasculaire voordelen kunnen opleveren. In dit onderzoek bekeken we het anti-atherosclerotische effect van tweezijdig PPAR α/γ agonisme via stimulatie met tesaglitazar in apoE3*Leiden muizen onder normale en insuline resistente condities. ApoE3*Leiden muizen kregen een laag-vet (LV) of een insuline resistentie-inducerend hoog-vet (HV) dieet. De muizen op LV en HV werden beiden verdeeld in 3 groepen. Een groep kreeg een hoog cholesterol supplement (1% wt/wt, HC-groep). Een tweede groep kreeg hetzelfde dieet, met 0.5 μ mol tesaglitazar/kg diet (T) toegevoegd. De derde groep kreeg een laag cholesterol supplement (0.1% wt/wt, LC-groep), wat resulteerde in gelijke plasma cholesterol niveaus met de T-groep. De behandeling met tesaglitazar verlaagde de hoeveelheid atherosclerose in het kleppengebied van de aorta en induceerde een verschuiving naar minder ernstige atherosclerotische plaques. Het anti-atherosclerotische effect ging verder dan cholesterol verlaging alleen en was sterker in muizen op hoog-vet dieet. Daarnaast verlaagde de behandeling met tesaglitazar de ontstekingsparameters zoals plasma serum amyloid A, het aantal aanhechtende monocytten en nuclear factor-kappa B activiteit in de vaatwand. Daarom zou het mechanisme, waarmee tesaglitazar zijn anti-atherosclerotische effecten uitoefent, geassocieerd kunnen zijn met zijn ontstekingsremmende werking.

Samenvattend, de data in dit proefschrift ondersteunen dat apoptotische en necrotische celdood en ontsteking belangrijke processen zijn in atherosclerose. De genen die

bestudeerd zijn in dit proefschrift en betrokken zijn bij celdood en ontsteking, zoals TNF α , FasL, p53 en Rb, hebben een rol in het veranderen van de samenstelling van de plaque naar een mogelijk gevoeliger fenotype voor ruptuur. Hoewel we in één studie wel ruptuur gerelateerde voorvallen zagen, heeft het beïnvloeden van één gen weinig effect gehad op de samenstelling van de plaque. Met de zeer gecompliceerde micro-omgeving van de vergevorderde atherosclerotische plaque in het achterhoofd lijkt dit een logisch gegeven. Uit dit proefschrift komt naar voren dat genen, betrokken bij celdood en ontsteking, op de juiste tijd, de juiste plaats en in de juiste combinatie bestudeerd moeten worden. Wanneer conditionele muismodellen geoptimaliseerd worden, zullen ze daarbij een zeer goed hulpmiddel zijn. Opheldering van het moleculaire mechanisme, dat verantwoordelijk is voor ontsteking en celdood in atherogenese en dat uiteindelijk leidt tot acute klinische voorvallen, zou kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën en experimentele modellen ten bate van de behandeling van atherosclerose en de complicaties. Dit zou zeker de bestaande patiënten helpen, echter een voorkomende boven een genezende aanpak zou de voorkeursstrategie zijn voor de volgende generatie mensen.