



Universiteit
Leiden

The Netherlands

The role of ApoCI, LPL and CETP in plasma lipoprotein metabolism - studies in mice

Hoogt, C.C. van der

Citation

Hoogt, C. C. van der. (2006, November 28). *The role of ApoCI, LPL and CETP in plasma lipoprotein metabolism - studies in mice*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/5414>

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/1887/5414>

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

Hyperlipidemie, ofwel een verhoogde plasma lipidenpiegel, is een belangrijke risicofactor voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten. Verlagen van de lipiden is een strategie om het risico hierop te verkleinen. Voor het optimaliseren van lipiden-verlagende therapieën is gegronde kennis van het lipidenmetabolisme van groot belang. In de afgelopen decennia is deze kennis sterk toegenomen, vooral door de ontwikkeling van muismodellen, die belangrijke (humane) eiwitten betrokken bij het lipoproteïnenmetabolisme tot overexpressie brengen (transgene muizen) of juist missen (knockout muizen). In dit proefschrift hebben we ons erop gericht de functies van apolipoproteïne CI (apoCI), lipoproteïne lipase (LPL) en cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) verder te karakteriseren. Daarbij hebben we gebruik gemaakt van diverse transgene en knockout muismodellen, waarvan sommige in combinatie met adenovirale genexpressie.

Eerdere studies in muizen en mensen hebben een positieve correlatie laten zien tussen plasmaniveaus van apoCI en zowel triglyceriden (TG) als cholesterol (zgn. gecombineerde hyperlipidemie). In muizen is aangetoond dat apoCI vooral plasma TG verhoogt, en in veel mindere mate cholesterol. Er zijn verschillende mechanismen gepostuleerd hoe apoCI tot hyperlipidemie leidt, waaronder inhibitie van de hepatische receptor-gemedieerde opname van TG-rijke lipoproteïnen remnants, maar deze konden het grote effect van apoCI op met name TG niveaus niet verklaren. In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht welke van de stappen in het metabolisme van het zeer lage dichtheids lipoproteïne (VLDL) zijn aangedaan in transgene *APOC1* muizen, die humaan apoCI tot expressie brengen. De toevoer van TG in de bloedcirculatie door opname vanuit de darm of door VLDL productie in de lever was niet verschillend tussen *APOC1* en controle muizen. Door *APOC1* muizen te kruisen met apoE-deficiënte muizen hebben we laten zien dat de lipidenstapeling ook geen louter gevolg is van blokkade van deeltjes-opname door de apoE-herkende lipoproteïne receptoren in de lever. Injectie van VLDL-achtige emulsiedeeltjes in *APOC1* muizen leidde wel tot een vertraagde verdwijning van TG vanuit deze deeltjes uit het plasma. Het lijkt er daarom op dat apoCI de lipolytische afbraak van VLDL remt. Hoewel tussen de muizen geen verschil was in plasmaniveaus van LPL, was gezuiverd apoCI wel in staat de LPL-gemedieerde TG lipolyse *in vitro* te verlagen en de klaring van VLDL-achtige emulsiedeeltjes *in vivo* te vertragen. Daarom konden we concluderen dat de hypertriglyceridemie in *APOC1* muizen voornamelijk het gevolg is van remming van de LPL-gemedieerde TG hydrolyse.

Omdat de VLDL receptor (VLDLr) en apoCIII beide de LPL activiteit in belangrijke mate beïnvloeden, onderzochten we in **hoofdstuk 3** of de inhibitie van lipolyse door apoCI mede via interactie met één van deze eiwitten verloopt. Daarvoor hebben we een recombinant adenovirus ontwikkeld, dat humaan apoCI tot expressie brengt (*AdAPOC1*) en dat vervolgens ingespoten in muizen, die deficiënt waren voor de VLDLr of apoCIII. De gebruikte muizen waren ook deficiënt voor respectievelijk de lage dichtheids lipoproteïne receptor (LDLr) en het LDLr gerelateerd proteïne (LRP) of apoE. In wildtype muizen resulteerde *AdAPOC1* expressie in een soortgelijk gecombineerd hyperlipidemisch fenotype als gezien was in *APOC1* transgene muizen. Daarnaast zagen

we dat AdAPOC1 ook in afwezigheid van de VLDLr of van apoCIII de plasma triglyceriden niveaus verhoogde. Dus apoCI is een sterke remmer van LPL activiteit, onafhankelijk van de VLDLr en apoCIII.

Recent hebben onderzoekers in ons laboratorium aangetoond dat muizen die de drie belangrijkste apoE-herkende receptoren (*i.e.* VLDLr, LDLr en LRP) missen verhoogde plasma TG en cholesterol niveaus hebben. Echter, omdat VLDL deeltjes continu door de lever worden uitgescheiden in de bloedbaan, moet er ook klaring van VLDL optreden om steady state plasma waarden te bereiken. In **hoofdstuk 4** bestudeerden we of LPL een rol speelt in de VLDL klaring onafhankelijk van deze drie receptoren. Aan de ene kant zorgde injectie van de LPL-remmer AdAPOC1 voor verdere verhoging van TG en cholesterol plasma niveaus, voornamelijk als component van VLDL. Ook werd de binding van VLDL-achtige emulsiedeeltjes aan de lever, zoals aangetoond in controle muizen, compleet teniet gedaan door AdAPOC1. Aan de andere kant resulteerde injectie met een LPL-adenovirus in verlaging van plasma TG en cholesterol niveaus en een verhoogde associatie van VLDL-achtige emulsiedeeltjes met de lever. We hebben dus gevonden dat ook in de afwezigheid van de VLDLr, LDLr en LRP, de remnant klaring afhankelijk is van LPL.

Het is bekend dat apoE*2 in mensen tot hyperlipidemie kan leiden. Dit kan worden nagebootst in muizen door het endogene apoE gen te vervangen door APOE*2 (de zogenaamde APOE*2-knockin muis). Door de lage bindingsaffiniteit van apoE*2 voor de LDLr en door de apoE-gemedieerde inhibitie van LPL, wordt VLDL niet geklaard en ontstaat hyperlipidemie. In **hoofdstuk 5** onderzochten we de vraag of verhoging van de LPL activiteit in APOE*2-knockin muizen, zowel direct (door toediening van de LPL activator heparine en door een adenovirus dat LPL tot expressie brengt) als indirect (door een adenovirus dat apoAV tot expressie brengt en door apoCIII deficiëntie), de plasma lipiden niveaus kon normaliseren. We vonden dat de gecombineerde hyperlipidemie in deze muizen genormaliseerd werd door directe activatie van LPL en door indirecte activatie via apoAV expressie, maar niet door indirecte activatie door afwezigheid van apoCIII. We konden aldus concluderen dat veranderingen in apoAV concentratie een dominant effect hebben ten opzichte van veranderingen in apoCIII ten aanzien van verbetering van apoE2-geassocieerde hyperlipidemie.

CETP is een cruciale factor in het plasma, die de overdracht van neutrale lipiden tussen hoge dichtheids lipoproteïnen (HDL) en apoB-bevattende lipoproteïnen (zoals VLDL en LDL) medieert, en tot expressie komt in de mens, maar van nature niet in de muis. Als gevolg van CETP expressie komt meer cholesterol in pro-atherogeen (V)LDL terecht en minder cholesterol in anti-atherogeen HDL. Het genereren van kleiner HDL door de acties van CETP kan er echter ook voor zorgen dat het reverse cholesterol transport versneld wordt, dat als anti-atherogeen wordt beschouwd. Omdat het al dan niet atherogeen zijn van CETP nog steeds ter discussie staat, hebben we in **hoofdstuk 6** het effect van CETP expressie bestudeerd in APOE*3-Leiden muizen met een verdeling van de lipiden over lipoproteïnen fracties die vergelijkbaar is met die in de mens. Behalve een lichte stijging in cholesterol concentratie leidde CETP expressie tot een verhoging van VLDL-cholesterol ten koste van HDL-cholesterol. Om het effect van CETP op atherosclerose ontwikkeling te bepalen, kregen muizen een cholesterol-rijk

dieet, wat resulteerde in verhoogde VLDL-cholesterol niveaus zowel in de CETP muizen als in de controles. Het gemiddelde atherosclerotische oppervlak van de lesies was sterk verhoogd in *CETP.APOE*3-Leiden* muizen en er werden meer gecompliceerde, gevorderde plaques aangetroffen. We concludeerden dat CETP expressie grote invloed heeft op cholesterol verdeling over lipoproteïnen en dat het een duidelijke atherogene factor is in *APOE*3-Leiden* muizen.

Twee groepen van geneesmiddelen die vaak worden voorgeschreven aan mensen met dyslipidemie zijn de statines en de fibraten. Hoewel fibraten voornamelijk VLDL-TG verlagen en statines met name het LDL-cholesterol reduceren, is voor beide groepen medicijnen een associatie met verhoogde HDL-cholesterol niveaus in mensen gevonden. Dit effect is niet aanwezig in muizen, die zoals reeds eerder gemeld, in tegenstelling tot mensen geen CETP tot expressie brengen. In **hoofdstuk 7** hebben we onderzocht of de fenofibraat-geïnduceerde verhoging in HDL afhangt van CETP expressie. Hoewel behandeling van *APOE*3-Leiden* muizen met fenofibraat geen effect had op HDL-cholesterol, werd het HDL-cholesterol verhoogd in *CETP.APOE*3-Leiden* muizen. Fenofibraat had geen invloed op de HDL-cholesteryl ester klaring vanuit het serum in beide groepen muizen, wat aangeeft dat het verhoogde HDL-cholesterol niveau niet gepaard gaat met een veranderde HDL-cholesterol flux door het plasma. Omdat apoAI, adenosine binding cassette transporter A1 (ABCA1), fosfolipiden transfer proteïne (PLTP) en scavenger receptor klasse B type I (SR-BI) betrokken zijn bij het bepalen van HDL-cholesterol niveaus, hebben we de mogelijkheid getest dat fenofibraat deze genen verschillend beïnvloedde in de muizen met en zonder CETP. Lever mRNA expressie analyse liet zien dat deze genen vergelijkbaar veranderden onder invloed van fenofibraat in beide muisgroepen. Dus deze genen kunnen niet de oorzaak zijn van verhoogd HDL-cholesterol in *CETP.APOE*3-Leiden* muizen. Lever mRNA expressie van CETP in *CETP.APOE*3-Leiden* muizen ging echter sterk omlaag na fenofibraat behandeling. Tevens waren de plasma CETP concentratie en activiteit verlaagd. In de afgelopen jaren zijn data gepubliceerd over de betrokkenheid van apoAI, ABCA1, PLTP, en mogelijk CD36- en LIMPII-analoog 1 (CLA1, het humane equivalent van SR-BI) bij de HDL verhoging door fibraten. Op grond van onze huidige data concludeerden we dat verlagings van de CETP expressie een cruciale additionele causale factor is.

In **hoofdstuk 8** hebben we een vergelijkbare werkwijze toegepast om te testen of de statine-geïnduceerde verhoging in HDL-cholesterol niveaus afhankelijk is van CETP expressie. In *APOE*3-Leiden* muizen veranderde het HDL-cholesterol niet na atorvastatine behandeling, terwijl het omhoog ging in de muizen met CETP. Ook zorgde atorvastatine behandeling voor versnelling van de HDL-cholesteryl ester klaring uit het serum van ongeveer +30% in beide groepen. Dus zijn de verhoogde steady-state HDL-cholesterol plasma waarden niet het gevolg van een verlaagde afvoer van HDL-cholesterol uit het bloed. Atorvastatine had een vergelijkbaar effect op de lever mRNA waarden van genen die betrokken zijn bij het HDL-metabolisme (apoAI, ABCA1, PLTP en SR-BI) in beide typen muizen. De lever mRNA expressie van CETP in *CETP.APOE*3-Leiden* muizen ging echter omlaag na atorvastatine behandeling. Dit kwam overeen met reducties in plasma CETP concentratie en activiteit. We concluderen dat

atorvastatine het HDL-cholesterol verhoogt in *CETP.APOE*3-Leiden* muizen via verlaging van de CETP-afhankelijke HDL klaring.

Samengevat draagt dit proefschrift bij aan een betere karakterisatie van de functie van apoCI, LPL en CETP in het lipoproteïne metabolisme. We laten zien dat de activiteit van LPL, en de daaraan gerelateerde TG niveaus, voor een belangrijk deel bepaald wordt door de relatieve plasmaconcentratie van apolipoproteïnen. We hebben tevens laten zien dat LPL van belang is bij de remnant-klaring in afwezigheid van de drie belangrijkste apoE-herkende receptoren. Tenslotte is gebleken dat CETP een atherogene factor is in muizen met een lipidenverdeling over lipoproteïnen die vergelijkbaar is met die in de mens en dat interventies gericht op het verbeteren van het apoB-bevattende lipoproteïne metabolisme (*i.e.* statines en fibraten) het HDL-metabolisme beïnvloeden via inhibitie van CETP. Omdat aanvankelijk gevreesd werd dat inhibitie van CETP de flux van cholesteryl esters van de periferie naar de lever zou remmen, waardoor het risico op atherosclerose juist zou worden verhoogd, is het een interessant bevinding dat de totale flux van HDL-cholesteryl esters niet aangedaan is door CETP expressie op zichzelf, en ook niet door fenofibraat gemedieerde verlaging van CETP. Dit is veelbelovend voor therapieën gebaseerd op CETP inhibitie.