



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel mechanistic insight in cholesteryl ester transfer protein production and pharmacological inhibition

Tuin, S.J.L. van der

Citation

Tuin, S. J. L. van der. (2017, February 23). *Novel mechanistic insight in cholesteryl ester transfer protein production and pharmacological inhibition*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/46114>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/46114>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/46114> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Tuin, Sam van der

Title: Novel mechanistic insight in cholesteryl ester transfer protein production and pharmacological inhibition

Issue Date: 2017-02-23

Addendum

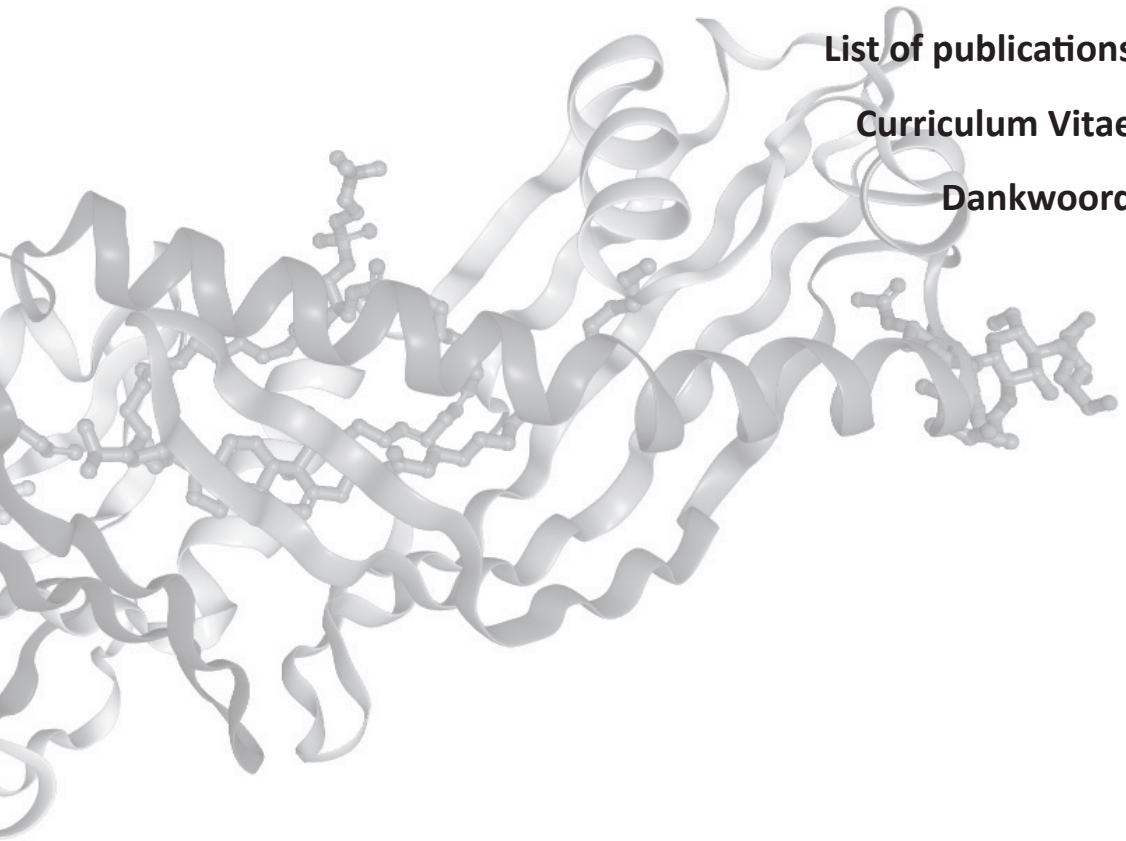
Summary

Samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord



SUMMARY

Cardiovascular disease (CVD) is one of the largest health problems in the Western world, with atherosclerosis being the main underlying pathophysiology, resulting in morbidity and mortality. Atherosclerosis is a disease affecting the vessel wall, characterized by the local accumulation of lipids, immune cells, smooth muscle cells and connective tissue. Accumulation of these constituents leads to a local inflammatory response, progressive narrowing of the vessel wall and subsequently to a decrease in blood flow to the organs. Progressive narrowing is associated with local pain (Angina Pectoris), and may also lead to plaque rupture and subsequent heart attack, stroke or even death. Epidemiological studies have identified several risk factors for the development of atherosclerosis e.g. genetic factors, smoking, blood pressure, age, gender, obesity, inflammation and plasma lipid levels. In this thesis, we have focussed on abnormal plasma lipid levels, characterized by increased levels of triglycerides (TG) and (very) low density lipoprotein [(V)LDL] cholesterol (C), and decreased level of high density lipoprotein (HDL)-C. The current standard treatment for the normalization of (V)LDL-C level and reduction of CVD risk is statin therapy, with lowering of inflammation as a pleiotropic effect of the statins. However, a substantial residual CVD risk remains, which has triggered the search for additional treatment targets. The observation of an inverse association between HDL-C level and CVD risk, and the fact that cholesteryl ester transfer protein (CETP) decreases HDL-C, has made CETP an important therapeutic target for treatment of CVD. This has led to the development of several CETP-inhibitors (e.g. torcetrapib, anacetrapib, evacetrapib and dalcetrapib). Interestingly, at present only one (anacetrapib) is still in a clinical trial.

The aim of this thesis was to better understand the cellular origin of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and to investigate the effects of the CETP inhibitor anacetrapib on the development of atherosclerosis.

In **chapter 2** we aimed to elucidate the cellular origin of CETP in humans. Previous studies have indicated that adipose tissue and liver are the two primary sources of plasma CETP. However, data from a general population cohort revealed no correlation between plasma CETP level and waist circumference, suggesting that central adipose tissue does not contribute to the plasma CETP pool. Moreover, the level of CETP expression in liver and adipose tissue was compared. This revealed much more abundant CETP expression in liver as compared to adipose tissue. In the liver, a strong correlation was found between expression of the CETP gene and multiple macrophage markers, while this correlation was not found in adipose tissue. This suggested that liver macrophages are the principal source of CETP expression. To verify liver macrophages as the primary source of CETP expression, *in situ* hybridization and immunofluorescence stainings on liver sections from healthy donors were performed. Both techniques showed that CETP and the macrophage marker CD68 are



co-localized, confirming that CETP is expressed and synthesized by liver macrophages. Next, we investigated the contribution of *CETP* expression in liver macrophages to plasma CETP. To address this question, APOE*3-Leiden.CETP mice were depleted from liver macrophages by liposomal clodronate injection. Liposomal clodronate markedly reduced F4/80⁺ cell number and *F4/80* mRNA expression, and almost completely abolished CETP⁺ cells and *CETP* expression. Elimination of liver macrophages also largely reduced the plasma CETP level, decreased plasma triglycerides and increased HDL-C. Adipose tissue *F4/80* mRNA and *CETP* mRNA levels were not affected by liposomal clodronate injection. This confirmed that liver macrophages are the principal source of plasma CETP, and that CETP expression in liver macrophages affects the distribution of plasma cholesterol over the different lipoprotein fractions. Finally, we showed in APOE*3-Leiden.CETP mice that several lipid-lowering drugs reduce plasma CETP level by reducing the liver macrophage content, thereby improving the lipoprotein profile.

Remarkably, immunohistochemistry revealed that, in livers of both humans and APOE*3-Leiden.CETP mice, only a specific subtype of macrophages express CETP. In **chapter 3** we further characterized these liver macrophages expressing CETP. Firstly, a microarray analysis was performed on livers of APOE*3-Leiden.CETP mice obtained from **chapter 2**. We found, in addition to *CETP* and *F4/80*, that liposomal clodronate significantly down regulated two markers of tissue resident mature macrophages; V-set and immunoglobulin domain containing 4 (*Vsig4*) and C-type lectin domain family 4, member f (*Clec4f*), without affecting markers of infiltrating immature monocyte/macrophages; lymphocyte antigen 6C (*Ly6C*) and Macrophage-1 antigen (*Mac-1*). Since liposomal clodronate abolished both expression of *CETP* and *Clec4f* and *Vsig4*, these data suggest that CETP is expressed by tissue resident mature macrophages. Next, we investigated the reappearance of mRNA and protein expression of hepatic CETP, *Clec4f*, *Vsig4* and *Ly6C*, after liposomal clodronate injection. Therefore, a time-course study was performed in which mice were sacrificed at certain time points after liposomal clodronate injection. Our data revealed in the liver a simultaneous reappearance of both mRNA and protein expression of CETP, *Clec4f* and *Vsig4*, but liposomal clodronate did not affect *Ly6C* mRNA and protein expression. This was supported by a strong correlation between mRNA and protein levels of CETP and *Clec4f*, and of CETP and *Vsig4*. In addition, immunohistochemical analysis revealed that CETP co-localized with *Clec4f*⁺ resident mature macrophages, but not with *Ly6C*⁺ immature macrophages in the liver. Our data clearly indicated that in the liver, CETP is exclusively expressed by F4/80⁺*Ly6C*⁻*Clec4f*⁺*Vsig4*⁺ macrophages that represent resident rather than immature macrophages.

In the final chapter of this part of the thesis, we studied the role of hepatic macrophages in the mechanism by which lipopolysaccharide (LPS) reduces plasma CETP concentration and hepatic CETP expression (**chapter 4**). To address this, we investigated the effect of intraperitoneal LPS injection on hepatic macrophage activation, CETP expression (RNA and

protein), and plasma lipid and lipoprotein levels. We observed a marked decrease in the expression of the resident macrophage marker *Clec4f* and *Vsig4*, 4 and 8 hours after the injection of LPS. This coincided with a decrease in the expression of CETP and an increase in the expression of the pro-inflammatory genes tumor necrosis factor α (*Tnf α*) and monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp-1*). Simultaneously, the ratio of plasma HDL-C over non-HDL-C transiently peaked. Eight hours after LPS injection, expression of the infiltrating monocyte marker *Ly6c* was increased, concomitant with an increase in the number of *Ly6c* positive cells in the liver. Collectively, these data indicate that upon LPS injection, Kupffer cells are rapidly activated, lose expression of resident Kupffer cell markers and CETP expression, which increases the HDL-C/nonHDL-C ratio. We show that hepatic macrophages link the response to the inflammatory stimulus LPS with an increase in the level of HDL-C via down regulation of CETP expression in the liver.

In the second part of this thesis, we examined the effects of pharmacological inhibition of CETP by anacetrapib on the development of atherosclerosis, via the reduction of non-HDL-C rather than raising HDL-C (). Moreover, we elucidated the mechanism by which anacetrapib reduces non-HDL-C (**chapter 5**). We conclude that anacetrapib is a novel compound to treat dyslipidaemia and to reduce the cardiovascular event.

In **supplementary chapter 1**, we examined the effects and mechanism of anacetrapib on atherosclerosis development and HDL function, and potential additive/synergistic effects of anacetrapib on top of atorvastatin. Using a wide range of anacetrapib concentrations, we showed that anacetrapib alone and in combination with atorvastatin reduced plasma non-HDL-C, triglycerides and increased HDL-C, without affecting HDL functionality. Anacetrapib also decreased the development of atherosclerosis and added to the effect of atorvastatin. An improvement in lesion stability was also observed, but only in the dosage of 3 and 30 mg/kg/d anacetrapib groups. Importantly, analysis of covariance showed that both anacetrapib treatment and reduction in non-HDL-C, but not raising HDL-C, independently determined lesion size. Taken these data together, we concluded that anacetrapib mainly decreases atherosclerotic lesion development via a reduction of non-HDL-C.

In **chapter 5**, we further explored the mechanism by which anacetrapib reduces non-HDL-C [also known as (V)LDL-C] and whether this effect is dependent on the inhibition of CETP. Here, we showed that anacetrapib decreased cholesterol biosynthesis in the liver, most probably via the inhibition of *Srebp-1* and *-2* signalling. Anacetrapib decreased hepatic *Pcsk9* expression and plasma *Pcsk9* level, accompanied by an increase in hepatic LDLr protein expression. Concomitantly, anacetrapib increased the lipoprotein remnant clearance by the liver, without affecting the VLDL-TG production and clearance rates. In APOE*3-Leiden mice not expressing CETP, anacetrapib decreased plasma non-HDL-C and *Pcsk9* level, but did not affect the lipoprotein remnant clearance. From these data we concluded that anacetrapib



reduces (V)LDL-C by increasing hepatic remnant clearance via two mechanisms: 1) inhibition of CETP activity, resulting in remodelled VLDL particles that are more susceptible to hepatic clearance, and 2) a CETP-independent reduction in plasma PCSK9 level that has the potential to increase LDL receptor-mediated hepatic remnant clearance.

Finally, we discussed the results obtained from these studies in **chapter 6**, the implications for the role of CETP in the diagnosis of CVD and the future of HDL-C raising strategies in CVD.

SAMENVATTING

Hart- en vaatziekten (HVZ) behoren tot de grootste gezondheidsproblemen in de Westerse wereld, met atherosclerose als belangrijkste onderliggende oorzaak. Atherosclerose is een ziekte die de vaatwand aantast en wordt gekenmerkt door een lokale ophoping van lipiden, afweercellen, gladde spiercellen en bindweefsel. Het ontstaan van deze 'plaque' kan leiden tot een lokale ontstekingsreactie, een geleidelijke vernauwing van de vaatwand en vervolgens tot een vermindering van de bloedtoevoer naar de organen. Het vernauwen van de vaatwand wordt geassocieerd met lokale pijn en een ruptuur van een plaque kan leiden tot een hartaanval, beroerte of zelfs de dood. Epidemiologische studies (onderzoek naar de verbreiding van ziektes onder de bevolking) hebben verschillende risicofactoren voor het ontwikkelen van atherosclerose ontdekt. Risicofactoren zijn roken, hoge bloeddruk, leeftijd, geslacht, obesitas, ontsteking en plasma lipide (cholesterol en triglyceriden) niveaus. In dit onderzoek hebben we ons gericht op abnormale plasma lipide niveaus, gekenmerkt door verhoogde niveaus van triglyceriden (TG) en (V)LDL-Cholesterol ('slechte cholesterol') en een verlaagd niveau van HDL-C ('goede cholesterol'). De huidige standaardbehandeling voor het normaliseren van de (V)LDL-C niveaus en het verminderen van het risico op HVZ, is een behandeling met een statine. Statines onderdrukken de productie van cholesterol in de lever. Ondanks een verlaging van het risico op HVZ, blijft er een substantieel risico bestaan. Dit residuele risico heeft het zoeken naar aanvullende en/of alternatieve behandelingen in gang gezet. De waarneming van een omgekeerde associatie tussen HDL-C niveaus en het risico op HVZ, en het feit dat cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) HDL-C niveaus verlaagt, heeft CETP een belangrijk therapeutisch doelwit voor de behandeling van HVZ gemaakt. CETP speelt een belangrijke rol in het transport van cholesterol tussen het (V)LDL en HDL. Een verhoogde CETP activiteit resulteert in verhoogde niveaus van (V)LDL-C en verlaagde niveaus van HDL-C. In de afgelopen jaren zijn er verschillende CETP-remmers (bijvoorbeeld torcetrapib, anacetrapib, evacetrapib en dalcetrapib) ontwikkeld. Dit zijn medicijnen die de activiteit van CETP verlagen. Dit resulteert in verhoogde niveaus van HDL-C. Interessant is dat slechts één van deze CETP-remmers tot op heden stand heeft gehouden in een klinische trial, te weten anacetrapib.

Het doel van ons onderzoek was om een beter inzicht te krijgen in de cellulaire oorsprong van CETP. Met andere woorden: in welk orgaan en door welke cel wordt CETP gemaakt? Daarnaast hebben we onderzoek gedaan naar de effecten van de CETP-remmer anacetrapib op de ontwikkeling van atherosclerose. CETP komt van nature niet voor in 'gewone' muizen, dus voor dit onderzoek is er gebruik gemaakt van genetische gemodificeerde muizen. Deze muizen zijn in eerste instantie 'gevoelig gemaakt' voor cholesterol in het dieet ('gewone' muizen krijgen namelijk amper atherosclerose) en in tweede instantie hebben ze het gen

CETP ingebouwd gekregen. Dit muismodel (APOE*3-Leiden.CETP) is in de afgelopen jaren ontwikkeld op de afdeling waar ik werkzaam ben en is een veel gebruikt muismodel om onderzoek te doen naar de ontwikkeling van atherosclerose.

In **hoofdstuk 2** was het doel om de cellulaire oorsprong van CETP van de mens op te helderen. Eerdere studies hebben aangetoond dat de twee belangrijkste bronnen van plasma CETP het vetweefsel en de lever zijn. Echter, gegevens uit een bevolkingsonderzoek lieten geen correlatie zien tussen de aanwezigheid van plasma CETP en tailleomtrek (als maat voor de hoeveelheid centraal vetweefsel). Dit geeft aan dat het centrale vetweefsel niet bijdraagt aan de productie van CETP. Daarnaast hebben we het niveau van expressie van *CETP* in de lever en in het vetweefsel vergeleken. Hieruit bleek dat de expressie van *CETP* in de lever vele malen groter is dan dat in het vetweefsel. Naast de vraag in welk orgaan CETP geproduceerd wordt, waren we ook geïnteresseerd in de vraag door welk celtype CETP geproduceerd wordt. De lever bestaat uit verschillende celtypes, maar de voornaamste celtypes zijn de hepatocyten (levercellen), vaatwandcellen en macrofagen (Kupffer cellen). Macrofagen spelen een rol in het afweersysteem en in de lever hebben ze een rol in het opruimen van dode bloedcellen en het filteren van bloed. Om specifieke celtypes aan te tonen gebruikten we celtype specifieke markers. In ons onderzoek vonden we een hele sterke correlatie tussen de expressie van het *CETP*-gen en verschillende macrofaag markers. Deze correlatie vonden we niet in het vetweefsel en ook niet met markers van andere celtypes. Dus naast het feit dat de lever de voornaamste bron is van CETP-expressie, lijkt het er op dat het de levermacrofaag (Kupffer cel) is die CETP produceert. Dit hebben we verder aangetoond met het kleuren van *CETP* mRNA (*in situ* hybridisatie) en het CETP eiwit (immunofluorescentie). Beide technieken toonden aan dat expressie van CETP co-lokaliseert met expressie van CD68 (een macrofaag marker). Hieruit konden we concluderen dat CETP wordt geproduceerd (mRNA) en gesynthetiseerd (eiwit) door de Kupffer cellen.

Vervolgens hebben we de relatieve bijdrage van de expressie van CETP in Kupffer cellen aan de totale hoeveelheid plasma CETP onderzocht. Om deze vraag te beantwoorden hebben we APOE*3-Leiden.CETP muizen een injectie gegeven met liposomaal clodronaat. Liposomaal clodronaat zorgt voor het verdwijnen van alle macrofagen in voornamelijk de lever van de muis. Om deze depletie te kunnen meten, is er gebruik gemaakt van de marker F4/80 (mRNA en eiwit), een muis specifiek macrofaag eiwit. Na de injectie met liposomaal clodronaat was het aantal F4/80⁺ cellen in de lever significant verlaagd ten opzichte van een niet geïnjecteerde muis. Daarbij was ook de expressie van CETP bijna totaal verdwenen uit de lever. Er waren tot 95% minder CETP⁺ cellen te zien in de levers van deze muizen. Het verdwijnen van de F4/80⁺ cellen en van de CETP expressie in de lever, zorgde voor significante verlaging van het plasma CETP niveau en een verhoogd HDL-C niveau. De expressie van

F4/80 en CETP (mRNA en eiwit) in het centrale vetweefsel werd niet beïnvloed door de injectie van liposomaal clodronaat. Dit bevestigde dat Kupffer cellen de voornaamste bron zijn van plasma CETP en dat CETP expressie in de Kupffer cellen een direct invloed heeft op de verdeling van cholesterol over de verschillende lipoproteïnefracties (lees: verdeling van cholesterol over het goede en slechte cholesterol). Als laatste hebben we laten zien dat verschillende lipide-verlagende medicijnen het plasma CETP niveau verlaagden, door het verlagen van de productie van CETP in de Kupffer cellen. Door deze verlaging van het plasma CETP niveau verbeterde het lipoproteïne profiel (meer 'goed' cholesterol en minder 'slecht' cholesterol).

Een verdere analyse met behulp van immunohistochemische kleuringen (het kleuren van dunne plakjes stukjes weefsel) gaf een opmerkelijke vondst. Het bleek dat zowel in levers van mensen als van APOE*3-Leiden.CETP muizen slechts een bepaald subtype macrofaag CETP tot expressie bracht. In **hoofdstuk 3** hebben we dit subtype lever macrofaag verder gekarakteriseerd. Met RNA verkregen uit de levers van muizen beschreven in **hoofdstuk 2** hebben we een gen expressie analyse m.b.v. microarrays uitgevoerd. Dit geeft een beeld van de expressie van alle genen in het betreffende weefsel. Uit deze analyse kwam dat liposomaal clodronaat er niet alleen voor zorgde dat de expressie van F4/80 en CETP omlaag ging, maar er waren nog een aantal genen die een lagere expressie hadden t.o.v. de niet geïnjecteerde muizen. De twee genen die aanzienlijk veel lager tot expressie kwamen, waren 'V-set and immunoglobulin domain containing 4' (*Vsig4*) en 'C-type lectin domain family 4, member f' (*Clec4f*). Uit literatuur onderzoek bleek dat deze genen vooral tot expressie komen in mature in weefsel zittende macrofagen. We zagen in deze analyse geen effect op een tweetal macrofaag markers die geassocieerd zijn met immature macrofagen. Omdat liposomaal clodronaat zowel de expressie van CETP, *Clec4f* als *Vsig4* verlaagt, geeft dit aan dat CETP wordt geproduceerd door mature in weefsel zittende macrofagen. Om dit verder te onderzoeken, hebben we een tijdsverloop-experiment gedaan. Muizen werden ingespoten met liposomaal clodronaat en daarna werd er 'gewacht' tot de mRNA- en eiwitniveaus weer terugkeerden tot het niveau van voor de injectie. Op deze manier konden we het verschijnen van algemene (F4/80), immature (Ly6C) en mature macrofaagmarkers (*Clec4f* en *Vsig4*, en CETP) onderzoeken. Uit onze gegevens bleek een gelijktijdige terugkeer van de mRNA- en eiwitexpressie van CETP, *Clec4f* en *Vsig4* in de lever. Het liposomale clodronaat had geen invloed op de expressie van Ly6C. Statistisch onderzoek liet een sterke correlatie zien, van zowel mRNA als eiwit, tussen CETP en *Clec4f*, en CETP en *Vsig4*. Ook hebben we gekeken naar de cellulaire locatie van de expressie van de verschillende genen. Hieruit bleek dat CETP co-lokaliseerde met *Clec4f*, maar niet met Ly6C. Dus uit onze gegevens blijkt dat in de lever CETP uitsluitend tot expressie komt in een mature macrofaag die positief is voor F4/80 (algemene macrofaag marker), *Clec4f* en *Vsig4*, en negatief voor Ly6C.

In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken naar het mechanisme waarmee lipopolysaccharide (LPS), een deel van de celwand van een bacterie, het niveau van plasma CETP en de expressie van CETP in de lever vermindert. Dit hebben we onderzocht door muizen een injectie te geven met LPS en dan te kijken naar de activering van levermacrofagen, de expressie van CETP (RNA en eiwit) in de lever en de verandering in lipiden en lipoproteïne niveaus. Vier en acht uur na de injectie met LPS, observeerden we een afname in de expressie van macrofaag markers Clec4f en Vsig4. Deze afname viel samen met een afname in de expressie van CETP en de toename van een tweetal genen die een rol spelen in ontsteking. Acht uur na de LPS-injectie was er een significantie verhoging van de immature macrofaag marker Ly6C waarneembaar, zowel op RNA- als op eiwitniveau. Deze gegevens geven het beeld dat na een LPS injectie, de mature lever macrofagen geactiveerd worden en de expressie van Clec4f en Vsig4 verliezen. Daarbij verliezen ze ook hun CETP expressie en wordt het plasma CETP niveau lager. Dit resulteert op zijn beurt in een verschuiving van het cholesterol van het slechte [(V)LDL] naar het goede (HDL) cholesterol. Hier laten we zien dat hepatische macrofagen (Kupffer cellen) een directe link verzorgen tussen een ontstekingsstimulus (LPS) en verhoogde niveaus van goed cholesterol (HDL), via het verlagen van de expressie van CETP in de lever.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we de effecten van de farmacologische remming van CETP door anacetrapib, op de ontwikkeling van atherosclerose onderzocht (**aanvullend hoofdstuk 1**). Daarnaast hebben we het mechanisme achter de verlaging van (V)LDL-C door anacetrapib opgehelderd (**hoofdstuk 5**). Onze conclusie is dat anacetrapib een mogelijk nieuw medicijn is om dyslipedemie te behandelen en de kans op een hartaanval te verminderen.

In **aanvullend hoofdstuk 1** onderzochten we de effecten van anacetrapib op de ontwikkeling van atherosclerose, HDL functie, en de mogelijke additieve/synergistische effecten van anacetrapib naast een behandeling met atorvastatine. Atorvastatine is een medicijn dat veelal gebruikt wordt voor de behandeling van een hoog cholesterolgehalte in bloed bij mensen. Dit onderzoek heeft aangetoond dat anacetrapib alleen, en in combinatie met atorvastatine, in staat was om de concentratie (V)LDL-C en triglyceriden in het plasma te verlagen. Daarnaast verhoogden de verschillende behandelingen het HDL-C. Anacetrapib verminderde ook de ontwikkeling van atherosclerose, de combinatiebehandeling van anacetrapib en atorvastatine liet zelfs een nog grotere vermindering van de ontwikkeling van atherosclerose zien. We hebben ook laten zien dat deze vermindering in de ontwikkeling van atherosclerose voor het grootste deel is toe te schrijven aan de verlaging van de concentratie (V)LDL-C in het plasma en niet aan het verhogen van het HDL-C ('goede cholesterol'). Uit de door ons verkregen gegevens kunnen we concluderen dat de vermindering in atherosclerose door anacetrapib komt door een verlaging van het (V)-LDL-C in plasma.

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzoek gedaan naar het mechanisme achter de verlaging van (V)LDL-C door anacetrapib en of dit effect afhankelijk is van de remming van CETP. Uit een genexpressie-analyse van gegevens uit **aanvullend hoofdstuk 1** kunnen we concluderen dat anacetrapib de biosynthese van cholesterol in de lever remt. Dit vindt plaats via een remming van *Srebp-1* en *-2* signalering. Dit zijn beide belangrijke regulatoren van de productie van cholesterol in de lever. Ook verminderde anacetrapib de expressie en het plasmaniveau van Pcsk9, gepaard met een toename aan LDL-receptoreiwitexpressie. De LDL-receptor is een belangrijk transporteiwit, dat cholesterol transporteert van het bloed naar de levercel. Pcsk9 reguleert op haar beurt weer de aanwezigheid van de LDL-receptor op de levercel. Daarnaast verhoogde anacetrapib de opname van het zogenaamde 'lipoproteïne remnant deeltje'. Dit is een lipoproteïne deeltje wat relatief veel cholesterol bevat. Simpel gezegd verhoogde anacetrapib de opname van cholesterol door de lever, zonder dat er een effect was op de productie en opname van VLDL-TG door de lever. In APOE*3-Leiden muizen, muizen die geen CETP tot expressie brengen, vonden we ook verlaagde niveaus van (V)LDL-C en Pcsk9 in het plasma. Dit had alleen geen effect op de opname van de 'lipoproteïne remnant deeltjes' door de lever. Hieruit konden we concluderen dat anacetrapib de concentratie (V)LDL-C in het bloed verlaagde door het verhogen van de klaring van 'lipoproteïne remnant deeltjes' door de lever. Deze verhoogde klaring verloopt via twee verschillende mechanismes: 1) inhibitie van CETP activiteit resulteert in een VLDL deeltje wat gemakkelijker wordt opgenomen door lever, en 2) een CETP-onafhankelijke vermindering van de concentratie Pcsk9 in het plasma wat kan zorgen voor een verhoogde opname van VLDL deeltjes door de LDL-receptor.

In het laatste hoofdstuk bediscussiëren we alle resultaten van dit onderzoek en bespreken we de mogelijk implicaties voor CETP in het stellen van een diagnose voor HVZ en de toekomst van HDL-verhogende strategieën in de behandeling van HVZ.

List of publications

LIST OF PUBLICATIONS

(* equally contributed)

- **S.J.L. van der Tuin***, S. Kühnast*, J.W.A. van der Hoorn, J.B van Klinken, B. Simic, E. Pieterman, L.M. Havekes, U. Landmesser, T.F. Lüscher, J.W. Jukema, H.M.G. Princen, K. Willems van Dijk, P.C.N. Rensen, Y. Wang (2015), Anacetrapib reduces (V)LDL-cholesterol by inhibition of CETP activity and reduction of plasma Pcsk9 *Journal of lipid research* 56 (11), 2085-2093
- **S.J.L. van der Tuin***, Y. Wang*, N. Tjeerdema, V. Bieghs, S.S. Rensen, J. Fu, M.G. Wolfs, M. Hoekstra, J.W. Greve, W.A. Buurman, M.H. Hofker, R. Shiri-Sverdlov, O.C. Meijer, J.W.A. Smit, L.M. Havekes, K. Willems van Dijk, P.C.N. Rensen (2015), Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. *Hepatology* 62 (6), 1710-1722
- **S.J.L. van der Tuin***, S. Kühnast*, J.W.A. van der Hoorn, J.B van Klinken, B. Simic, E. Pieterman, L.M. Havekes, U. Landmesser, T.F. Lüscher, K. Willems van Dijk, P.C.N. Rensen, J.W. Jukema, H.M.G. Princen (2015), Anacetrapib reduces progression of atherosclerosis, mainly by reducing non-HDL-cholesterol, improves lesion stability and adds to the beneficial effects of atorvastatin. *European Heart Journal* 1, 39-50
- Y. Wang, E. Parlevliet, J. Geerling, **S.J.L. van der Tuin**, H. Zhang, V. Bieghs, A. Jawad, R. Shiri-Sverdlov, I. Bot, S. de Jager, L. Havekes, J. Romijn, K. Willems van Dijk, P.C.N. Rensen (2014), Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *British journal of Pharmacology* 171, 723-734
- **S.J.L. van der Tuin***, J.H.W.M. Rombout*, G. Yang, N. Schopman, A. Mroczek, T. Hermsen, J.J. Taverne-Thiele, (2008) Expression of a polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Fish & Shellfish Immunology* 24, 620-628



CURRICULUM VITAE

Sam Job Leo van der Tuin werd geboren op 24 februari 1983 te Tilburg. In 2001 behaalde hij zijn VWO-diploma aan het Pauluslyceum te Tilburg. In september van dat jaar begon hij aan de studie Biologie aan de Wageningen universiteit, te Wageningen. Na het afronden van de Bachelor biologie met specialisatie cel biologie in maart 2007, vervolgde hij in Wageningen de master Biologie met specialisatie cel biologie en immunologie.

Tijdens zijn masteropleiding heeft Sam drie onderzoeksstages gevolgd. De eerste stage was bij de afdeling Cel Biologie en Immunologie aan de Wageningen Universiteit en onderzoekscentrum te Wageningen, bij Prof. Dr. J Rombout. Sam deed daar onderzoek aan de expressie van de polymere IgA receptor in mucosale weefsels van de gewone karper (*Cyprinus Carpio L.*). Zijn tweede stage was bij de afdeling Immunologie, unit Auto-immune ziektes, aan het Erasmus Medisch centrum te Rotterdam. Sam deed daar, onder begeleiding van Dr. P. Leenen en Dr. J. Riepsaame, onderzoek aan de rol van microRNAs in de ontwikkeling van dendritische cellen. Zijn derde en laatste stage was aan de universiteit van Melbourne, Australië, bij het 'Cooperative Research Centre for Chronic Inflammatory Disease' binnen de afdeling geneeskunde. Sam deed daar onderzoek aan de rol van GM-CSF in monocyt ontwikkeling, tijdens de ontwikkeling van artritis in het 'K/BxN serum transfer model'. Dit onderzoek werd uitgevoerd onder begeleiding van Prof. dr. J.A. Hamilton en dr. A.D. Cook.

Na het behalen van zijn Master of Science-diploma in 2009 ging hij aan de slag als research analist bij de afdeling Pathologie, unit 'Inflammatory Disease Profiling' aan het Vrije Universitair Medisch centrum te Amsterdam bij Prof. C.L. Verweij en Dr. S. Vosslander. Hier deed hij onderzoek naar bloedcellen in artralgie patiënten om nieuwe, ziekte specifieke, markers te vinden.

In maart 2011 begon Sam met zijn promotieonderzoek bij de afdeling Endocrinologie aan het Leids Universitair Medisch Centrum te Leiden, onder begeleiding van Prof. dr. P.C.N. Rensen, Prof. Dr. J.A.P. Willems van Dijk en dr. Y. Wang. Tijdens zijn promotieonderzoek werd hij verscheidende malen genomineerd voor poster prijzen en won hij tijdens de 3^{de} jaarlijkse PREDICCT meeting in 2011 de Beste Poster Prijs. Sinds augustus 2015 is Sam werkzaam als praktijkdocent bij de studie Chemie en Life Sciences aan de Hogeschool Inholland te Amsterdam.

DANKWOORD

Zoals met bijna alles in mijn leven heb ik er iets langer over gedaan dan eigenlijk de bedoeling was, maar ik kan terugkijken op een fantastische tijd met een mooi proefschrift als gevolg. In de afgelopen 5 jaar heb ik een aantal hobbels moeten nemen en heb ik een paar dalen gezien. Ik heb veel van anderen en over mezelf geleerd tijdens mijn promotie. Ik heb geleerd dat hulp zoeken geen teken is van zwakte en dat zeggen dat je het niet weet, beter is dan een twijfel laten horen. Het schrijven van dit boekje heb ik wellicht alleen gedaan, maar voor al het andere heb ik hulp gehad van veel fijne en aardige mensen. Ik wil ze dan ook van harte bedanken!

Of course I have to start thanking my daily supervisor and co-promotor: Dear dr. Wang, dear **Yanan**, thanks for all the nice discussions, the guidance you gave me and the many laughs we had. I enjoyed working with you and I learned a lot. Without you as my buddy, I would have never survived in the world of science. You gave me the strength to believe in my thoughts and tell Ko and Patrick my opinion about the data. You gave me the confidence to trust my results and how to be a scientist. Although I did not pursue a career in science, the skills you have learned me will stay with me forever. Many thanks for everything.

Ook zonder mijn twee promotores was ik nergens. Geachte Prof. Dr. Rensen, beste **Patrick**. Het begin was wat stroef omdat je me elke keer wéér het cholesterol metabolisme uit moest leggen. Toch bleef je me in me geloven en 'was er nooit sprake van een no-go' geweest. Bedankt voor al je hulp, begeleiding en adviezen. Je hebt er voor gezorgd dat ik zorgvuldiger ben geworden en dat ik minder vaak met 'gewoon goed' genoegen neem.

Geachte Prof. Dr. Ir. Willems van Dijk, beste **Ko**. Het was gelukkig maar één keer nodig om me uit het lab te komen halen. Gelukkig bleef je in me vertrouwen en kon je het voorval goed relativeren. Het was fijn dat je deur altijd open stond om even snel data te bespreken, of gewoon om mijn hart even te luchten. Bedankt voor alle waardevolle lessen over het samenwerken en over reputatie. Dit zijn zaken die ik voor altijd bij me zal dragen.

Ook een bijzonder woord van dank aan Prof. dr. Havekes, beste **Louis**, bedankt voor je advies, je vragen en je tips. Een bijzondere dank gaat uit naar de weekenden op jouw boerderij in Frankrijk. We kwamen daar als team dicht bij elkaar en konden zonder stress genieten.

Bij humane genetica zat er natuurlijk nog een speciaal clubje mensen: de Lipido's. De gezelligheid en de ontspannen sfeer die bij ons in de groep heerste deed mij altijd veel goed. Ik ging met veel plezier naar mijn werk, omdat ik wist dat jullie daar ook waren. **Lisa H**,

Ayse, Harish, Fatiha, Amanda, Saeed, Jan, Sjoerd en **Vanessa** veel dank voor al jullie tijd, moeite en gezelligheid.

In het bijzonder ga ik **Lianne** en **Mattijs** missen, mijn roomies. We waren alle drie kort na elkaar gestart en konden op die manier veel van elkaar leren en begrepen exact in welke periode van het promotietraject de ander zat. Het was fijn om data te bespreken (ook al lagen onze projecten heel ver uit elkaar) en om gewoon over koetjes en kalfjes te kletsen. Bedankt voor de interessante (wetenschappelijke) discussies en jullie gezelligheid.

Naast bovengenoemden waren er natuurlijk nog een ontzettende hoop lieve, fijne en aardige collega's bij Humane genetica; roomies **Sandra** en **Ludo**, en **Else E., Maartje, Peter, Kelly, Bianca, Anita, Patrick, Richard** en natuurlijk iedereen die ik vergeet. Bij Endocrinologie; **Chris, Trea, Hetty, Lianne v.d. W-P** (bedankt voor het wegwijs maken in de wereld van de histologie), **Rosa, Jimmy, Andrea, Sander, Mariëtte, Kimberley, Huub, Eline, José, Onno, Isabel, Lisa v.d. W.**, en als laatste ook bij TNO; **José, Elsbet, Hans** en natuurlijk **Susan**. **Susan** bedankt voor een mooie samenwerking! Met horten en stoten wellicht, maar met een prachtig eindresultaat. Ook een dank naar mijn drie studenten, **Marit, Natasja** en **Linda**. Wellicht een klein onderdeel van mijn 5 jaar, maar een belangrijk onderdeel. Mede dankzij jullie ben ik nu docent aan de hogeschool.

Beste **Ronald**, van ver weg en korte tijd zelfs van heel ver weg, was je altijd een beetje betrokken bij mijn promotie. Maar belangrijker, ben je altijd betrokken geweest bij mij, bij mij leven. Ik wil je bedanken voor een bijzondere vriendschap.

Uiteraard mag ik ook niet mijn **schoonfamilie** vergeten, bedankt voor een duw in de goede richting en een vriendelijke vraag 'Hoe is het met je proefschrift?'. Fijn dat jullie er voor me waren op de momenten dat ik het even nodig had.

Ook gaat er een bijzondere dank uit naar mijn **broers Job en Oek** en hun **vrouwen** en **kinderen**. Bedankt voor jullie liefde en gezelligheid. Ondanks dat jullie ver weg wonen, zitten jullie altijd in mijn hart. Natuurlijk kan ik mijn ouders niet vergeten. Lieve **Papa** en **Mama**, ook al hadden jullie geen flauw idee van wat ik deed in Leiden, er was wel altijd interesse. Het was aan mij om het uit te leggen en aan jullie om lief te knikken dat je het snapte (ook al was dat niet altijd zo denk ik). Dank jullie voor alle kansen die ik in mijn leven heb gekregen. Van het zeilkamp tot studeren in Wageningen en van een geweldige reis naar New York tot mijn avonturen in Australië. Lieve **Papa** en **Mama**, zonder al die kansen was ik nooit op deze dag aanbeland.

En dan 'last but not least' en 'lest best', mijn lieve meisje **Florianne**. Ik kan me niet meer herinneren hoe mijn leven er uitzag zonder jou. Je hebt mijn leven kleur gegeven en samen genieten we van onze lieve zoon **Timon** en alles wat het leven ons verder te bieden heeft. Lieve **Florianne**, zonder jou was ik nooit zover gekomen, je bent mijn steun en toeverlaat.

Sam

