



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Identification of therapeutic targets in coronary artery disease: from patient to mice and back

Kraaijeveld, A.O.

Citation

Kraaijeveld, A. O. (2009, October 1). *Identification of therapeutic targets in coronary artery disease: from patient to mice and back*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14029>

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/1887/14029>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Op dit moment zijn hart en vaatziekten (HVZ) nog steeds de belangrijkste veroorzakers van sterfte in de Westerse samenleving. Een groot deel van HVZ wordt veroorzaakt door het proces van atherosclerose (aderverkalking). Dit is een chronisch ontstekingsproces van de binnenkant van slagaderen (arteriën) wat optreedt door het gehele lichaam. Het vat kan hierbij gedeeltelijk dichtslibben of uiteindelijk zelfs helemaal verstopt raken. Het resultaat is een verminderde of zelfs afwezige bloedvoorziening naar de verschillende organen, wat bijvoorbeeld kan leiden tot pijn op de borst (angina pectoris) door zuurstoftekort van de hartspier of zelfs een hartinfarct. De ontwikkeling van HVZ hangt voor een deel af van de aanwezigheid van een aantal traditionele risicofactoren, zoals rookgedrag, diabetes mellitus, erfelijke factoren, een verhoogd cholesterol gehalte of bloeddruk. Uiteraard zijn preventieve maatregelen om leefstijl te verbeteren verreweg het meest effectieve middel om de invloed van deze risicofactoren te beperken en hart en vaatziekten te voorkomen. Daarnaast hebben we ook de beschikking over medicijnen die onder andere de bloeddruk en het cholesterol gehalte in het bloed verlagen alsmede de stolling verminderen. Echter, het is tegenwoordig ook duidelijk dat andere, minder traditionele, risicofactoren zoals verhoogde ontstekingsmarkers en bepaalde genetische afwijkingen of varianten een verhoogd of juist een verlaagd risico op HVZ geven. Hier richt zich dan ook een steeds groter deel van onderzoek op. Het doel van dit proefschrift is tweeledig: eerst werden verschillende nieuwe risicofactoren, hetzij chemokines of genmutaties, door middel van diverse technieken geïdentificeerd. Vervolgens werd hun invloed op hart en vaatziekten *in vitro* en met behulp van proefdiermodellen onderzocht.

Het eerste deel van dit proefschrift betreft de identificatie van verschillende chemokines welke betrokken zijn bij een acuut coronair syndroom (ACS). Hieronder wordt zowel instabiele angina pectoris, als ook een daadwerkelijk hartinfarct (totale afsluiting van een ader) onder verstaan. Deze ziektebeelden zijn het gevolg van het scheuren van een atherosclerotische plaque met de vorming van een stolsel, wat tot een obstructie van de bloedstroom leidt. Vervolgens zijn de chemokines CCL18 (PARC) en CCL3 (MIP-1 α), welke beiden in verhoogde mate worden aangetroffen ten tijde van een ACS, onderwerp van nadere studie naar hun invloed bij de vorming en progressie van atherosclerose.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de huidige kennis rond de invloed van chemokines in het atherosclerotische proces. Atherosclerose wordt inmiddels grotendeels beschouwd als een (chronisch) ontstekingsproces van de vaatwand. De naam chemokine staat voor *chemo*attracting *cytokine*, wat betekent dat deze eiwitten zorgen voor het aantrekken van afweercellen naar een plek van ontsteking, zo ook bij atherosclerose. Chemokines komen in de circulatie terecht door onder andere endotheelschade aan de vaatwand en door geactiveerde bloedplaatjes. Zo trekken zij ontstekingscellen aan die de atherosclerotische plaque niet alleen vormen, maar uiteindelijk ook meer instabiel maken. Deze instabiele plaque kan scheuren

waardoor er een stolsel in het vat ontstaat die de bloedstroom blokkeert en zo een hartinfarct kan veroorzaken. De exacte invloed van chemokines in dit gehele proces is onderwerp van toenemende studie. Er zijn reeds een aantal studies verschenen die verhoogde circulerende chemokine waarden associëren met het voorkomen van atherosclerose. Sommige spelen een rol bij de eerste opbouw van de atherosclerotische plaque, andere juist bij het scheuren van een vergevorderde plaque. Het is echter nog lang niet duidelijk wat de functie van elk chemokine afzonderlijk is. Mede vanwege hun specifieke functies zouden chemokines een geschikt doelwit kunnen zijn voor toekomstige therapieën. Daarnaast zouden chemokines kunnen dienen als biomarkers voor het voorspellen van toekomstige hart en vaatziekten in geselecteerde patiënten populaties.

In aansluiting op dit laatste beschrijft **hoofdstuk 3** het resultaat van een multiplex chemokine screening in een gedeelte van de APR AIS populatie. Deze populatie bestaat uit patiënten met instabiele angina pectoris. Niet alleen blijken de chemokines CCL5 (RANTES) en CCL18 (PARC) verhoogd ten tijde van acuut zuurstoftekort (ischemie) van de hartspier, ook zijn de verhoogde waardes voorspellend of patiënten opnieuw ischemische klachten krijgen nadat ze zijn opgenomen in het ziekenhuis en de eerste behandeling al is gestart. Deze patiënten hebben zogeheten refractaire ischemische klachten en ondergaan vervolgens een dotter procedure of een bypass operatie. Daarnaast vertonen witte bloedcellen van deze patiënten een hogere eiwit expressie van de chemokine receptoren CCR3 en 5 ten tijde van ischemie, zowel in CD3⁺ T-lymfocyten als in CD14⁺ monocyten. Dit zijn receptoren voor CCL5, echter de receptor voor CCL18 is nog niet geïdentificeerd, hoewel het wordt gesuggereerd dat het een interactie aangaat met CCR3. Dit blijkt ook uit onze studies, aangezien incubatie van CCL18 op witte bloedcellen uit dezelfde patiënten *in vitro* een duidelijk effect heeft op CCR3 genexpressie. Daarnaast blijken patiënten die de hoogste waardes van CCL5 en CCL18 hebben ook een hogere kans maken om nieuwe cardiovasculaire problemen binnen 18 maanden na inclusie in de studie te ontwikkelen. Met name de bevindingen rond CCL18 als een voorspellende marker zijn nieuw. In de toekomst zou dit gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van een diagnostische test om patiënten met een verhoogd toekomstig cardiaal risico identificeren. Daarnaast zouden therapieën ontwikkeld kunnen worden die aangrijpen op CCL18, omdat dit chemokine ook van invloed lijkt te zijn bij de ontwikkeling van atherosclerose. Dit wordt onderzocht in **hoofdstuk 4**. Hierin kijken we naar het effect van CCL18 op de progressie van reeds aanwezige atherosclerotische plaques op twee manieren. Eerst wordt het effect van systemische toediening van een gesynthetiseerd CCL18 eiwit op een al aanwezige atherosclerotische plaque geanalyseerd. Toediening van CCL18 leidt tot een grotere plaque, met daarin relatief minder macrofagen. Verrassend genoeg worden er weinig systemische effecten van CCL18 toediening na 2 weken gezien. Daarna bekijken we het effect van lokale overexpressie van CCL18 met een virale vector in de atherosclerotische plaque zelf. Hieruit blijkt dat CCL18 overexpressie leidt tot een toename van het aantal T-lymfocyten in de atherosclerotische plaque. Er worden geen andere veranderingen in de plaques gezien, wat suggereert dat onze incubatie periode wellicht te kort is om significante

effecten op plaque samenstelling ten gevolge van een toegenomen aantal T-cellen te zien. Een genetische expressie analyse van humaan materiaal, welke aantoonde dat gevorderde plaques meer CCL18 tot expressie brengen, kan deze hypothese ondersteunen. Het causale verband blijft echter lastig te onderzoeken, aangezien een muis van nature geen CCL18 bezit.

Hoofdstuk 5 beschrijft de resultaten van een tweede multiplex chemokine screening, ditmaal in een cohort van patiënten met een acuut myocard infarct (hartinfarct). In deze sub-populatie van de MISSION! studie, welke is opgezet om de zorg rond patiënten met een hartinfarct zo veel mogelijk volgens de huidige richtlijnen te laten verlopen, werden in totaal 10 chemokines gemeten in patiënten en vergeleken met een controlegroep. Bij patiënten met een acuut myocard infarct werden verhoogde waarden van CCL3, CCL5 en CXCL8 en verlaagde waarden van CXCL10 gevonden. Verhoogde waarden van CCL3 ten tijden van cardiale ischemie worden ook aangetroffen na prospectieve analyse van de APRAIS studie. Tevens blijkt CCL3, in dit relatief kleine cohort, ook voorspellende waarde te hebben voor het optreden van toekomstige acute coronaire syndromen, zodat ook aan dit chemokine een voorspellende waarde kan worden toegekend. In een controle experiment blijkt dat CCL3 ook verhoogd is in het bloed bij muizen met een hartinfarct. CCL3 zou dus wellicht in de toekomst als biomarker kunnen gaan dienen bij patiënten met een hartinfarct. Er dient echter wel opgemerkt te worden dat zowel de voorspellende rol van CCL3 als die van CCL18 verder dient te worden onderzocht in veel grotere prospectief opgezette populatie studies. De rol van CCL3 in atherosclerose wordt vervolgens verder uitgediept in een proefdiermodel, beschreven in **hoofdstuk 6**. Muizen die een beenmergtransplantatie ondergaan met CCL3 deficiënt beenmerg vertonen significant minder atherosclerose ten opzichte van controles. Bovendien vertonen deze muizen na injectie met lipopolysaccharide (LPS) een sterk onderdrukt aantal circulerende neutrofiële granulocyten. Deze studie toont het belang van neutrofiële granulocyten bij het ontstaan van atherosclerose aan. Bovendien laat deze studie ook zien dat CCL3 een belangrijke rol speelt bij de migratie van neutrofiële granulocyten naar de atherosclerotische plaque in een milieu met een verhoogd cholesterol en verhoogde inflammatie. Beiden zijn voedingsbodems voor atherosclerose in de menselijke situatie.

Het eerste deel van dit proefschrift wordt afgesloten in **hoofdstuk 7** waarin de expressie van het cholesterol ester transfer proteïne (CETP) in witte bloedcellen van patiënten met een ACS wordt bestudeerd in de APRAIS populatie. De CETP remmer Torcetrapib was ontwikkeld om het High Density Lipoproteïne (HDL) cholesterol te verhogen, maar in 2007 werd dit medicijn van de markt gehaald toen bleek dat patiënten die dit innamen een hoger mortaliteitsrisico hadden ten opzichte van de controle groep. Het effect van Torcetrapib werd onderzocht in de ILLUMINATE trial en in deze studie werd onder andere gezien dat er meer infecties voorkwamen in de behandelde groep. Het is bekend dat witte bloedcellen CETP aanmaken, maar het effect en de invloed van het CETP metabolisme op cardiale ischemie is onduidelijk. Aangezien witte bloedcellen van belang zijn bij het ontstaan en het verloop van het ACS speelt CETP hierin dus mogelijk een rol. Deze link onderzoeken wij in dit hoofdstuk. Inderdaad laten patiënten ten tijde van een ACS een verminderde expressie zien van CETP in vergelijking met een controle groep,

zowel op RNA als eiwit niveau. De verlaagde CETP expressie hangt samen met een algemene verhoogde inflammatoire status in deze patiënten. Deze data zijn interessant genoeg ook gereproduceerd in een muizen myocard infarct model. De ontstekingsreactie die dus ontstaat ten tijde van een ACS hangt samen met een verminderde CETP expressie in witte bloedcellen. De opheldering van het mechanisme hierachter zal niet alleen consequenties hebben voor het begrip van de invloed van witte bloedcellen in een ACS. Ook kan dit leiden tot verheldering van het effect van medicijnen die CETP remmen met betrekking tot de functie van witte bloedcellen in het algemeen.

Het tweede deel van dit proefschrift betreft de analyse van twee genen in hun invloed op het optreden van restenose en van plaque destabilisatie. Dit laatste betreft het verstopping van een stent in een kransslagader na een eerdere percutane coronaire interventie (PCI, ook wel dotterprocedure genoemd). Deze genen lenen zich voor deze studies, aangezien duidelijk is geworden dat mutaties hierin enerzijds de kans op het optreden van een acuut hartinfarct vergroot en anderzijds het optreden van restenose na een dotterbehandeling beïnvloed.

In **hoofdstuk 8** wordt eerst onderzocht wat de rol van veroudering is bij het optreden van atherosclerose in LDL-receptor deficiënte muizen, een stam die veel wordt gebruikt in atherosclerose onderzoek. Oudere muizen die op hetzelfde moment als jonge muizen op het vetrijk dieet werden geplaatst ontwikkelen minder atherosclerose, zonder dat er verschillen worden gezien in de samenstelling van de plaque. De leeftijd van de muizen heeft dus effect op de hoeveelheid atherosclerose welke zij ontwikkelen. Tevens vertonen de oudere muizen een verminderde vasculaire adaptatie op de aanwezige atherosclerose. Vervolgens wordt een microarray verricht om te zien welke genen verschillend gereguleerd zijn in de halsslagader door het proces van veroudering. Deze array toont ongeveer 40 genen die differentieel tot expressie komen ten gevolge van veroudering. Met name de verhoogde expressie van het Quaking gen valt op, een gen wat invloed heeft de embryonale vasculaire ontwikkeling. Dit suggereert dat Quaking mogelijk een rol speelt bij vasculaire veroudering en/of atherosclerose. Om dit verder uit te zoeken zijn aanvullende studies verricht. In **hoofdstuk 9** wordt de functie van Quaking in restenose onderzocht. Er zijn in de Genetic Determinants of Restenosis (GENDER) studie, een cohort van meer dan 3.000 patiënten, 7 verschillende genetische polymorfismen aangetroffen die een verhoogde of juist verlaagde kans op restenose geven. Vervolgens wordt de relatie van Quaking met restenose verder onderzocht in allereerst een muizenmodel. Muizen welke het Quaking gen sterk verminderd tot expressie brengen vertonen een significant verminderde restenose respons, wat voor een zeer groot deel terug te voeren valt op een verminderde proliferatie van gladde spiercellen. Daarnaast tonen *in vitro* proeven aan dat gladde spiercellen, afkomstig uit deze muizen, veel minder goed groeien en prolifereren ten opzichte van controle cellen. Het Quaking gen blijkt dus een behoorlijke invloed uit te oefenen op de functie van gladde spiercellen, zowel in een gezond bloedvat als in bloedvaten die zijn aangetast door

atherosclerose en/of restenose. Mogelijk heeft een afwijkende Quaking gen-expressie via dit mechanisme dus grote invloed op het optreden van restenose na een PCI-procedure.

Hoofdstuk 10 beschrijft de invloed het MEF2 gen in atherosclerose en plaque stabiliteit. Genmutaties in het MEF2A gen zijn geassocieerd met een grotere kans op het optreden van hartinfarcten. Hoe dit echter precies in zijn werk gaat is niet geheel duidelijk. Met behulp van adenovirussen waarin het gehele MEF2 gen wordt onderdrukt of juist extra wordt geactiveerd proberen wij hier helderheid in te krijgen. Met het collar model wordt bij ApoE deficiënte muizen ter hoogte van de halsslagader een atherosclerotische plaque ontwikkeld, waarna operatief de adenovirussen lokaal worden toegediend. Twee weken later worden er met name verschillen gezien in de hoeveelheid endotheelcellen op de plaque. De groep waar MEF2 wordt onderdrukt heeft significant minder endotheelcellen vergeleken met controles. Daarnaast wordt een opvallende trend naar een verhoogd aantal bloedingen in de plaque gezien in deze groep. Ook wordt er *in vitro* een verminderde endotheelfunctie waargenomen. Geconcludeerd kan worden dat een verminderde expressie en werking van het MEF2 gen, via verminderde endotheelfunctie, leidt tot een verhoogde kans op plaque bloedingen en wellicht plaque ruptuur. Hiermee wordt een verklaring gegeven voor de eerder vastgestelde associatie tussen mutaties in het MEF2A gen en de verhoogde kans op een hartinfarct.

Samenvattend geeft dit proefschrift een verbeterd inzicht in de homeostase van chemokines ten tijde van cardiale ischemie. CCL3, CCL5 en met name CCL18 zijn naar voren gekomen als chemokines die patiënten met een verhoogd risico kunnen identificeren, los van andere risicofactoren. Dit kan leiden tot de toepassing van chemokine screening in patiënten met een ACS, om zo tot een gerichter individueel risicoprofiel te komen. Dit dient echter wel in grotere prospectieve trials onderzocht te worden. De eerste stappen hiervoor zijn reeds gezet. Daarnaast is voor het eerst de functie van CCL3 en CCL18 onderzocht in atherosclerotische proefdiermodellen. CCL3 heeft duidelijke invloed op de aanwezigheid van neutrofiële granulocyten in de plaque, terwijl CCL18 op zijn beurt met name T-cellen richting de plaque dirigeert. Dit biedt mogelijke therapeutische aangrijpingspunten voor toekomstige plaque-stabiliserende therapieën. Met betrekking tot dit laatste lijkt Quaking zeker ook een aantrekkelijk therapeutisch doelwit voor anti-restenotische, maar mogelijk ook anti-atherosclerotische therapieën. Dit gen blijkt een grote invloed uit te oefenen op de functie van gladde spiercellen. Daarnaast zou een genetische screening op verschillende polymorfismen van dit gen patiënten kunnen identificeren met een verhoogd risico op het optreden van restenose. Ook het screenen van geselecteerde patiënten populaties op mutaties in het MEF2A gen kan helpen bij het identificeren van hoog-risico patiënten, aangezien verminderde MEF2 functie leidt tot verstoorde endotheelfunctie. Echter, het verband tussen MEF2A mutaties en ACS is recentelijk met wisselend succes gereproduceerd door andere studies. Het is zeer interessant hoe deze discussie zich ontwikkelt. Welke kant het ook op gaat, onze studie draagt in ieder geval een steentje bij aan de verklaring van het onderliggende mechanisme.