



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cholesterol and phospholipid transporters in atherosclerotic lesion development

Pennings, M.

Citation

Pennings, M. (2008, September 16). *Cholesterol and phospholipid transporters in atherosclerotic lesion development*. Division of Biopharmaceutics of the Leiden/Amsterdam Center for Drug Research|Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13099>

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/1887/13099>

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

Nederlandse samenvatting

Nederlandse Samenvatting

In dit proefschrift wordt de rol en interactie van verschillende cholesterol en fosfolipiden transporters besproken. Deze transporters zijn erg belangrijk voor het bewaren van een goede cholesterol huishouding in het lichaam. Een verstoring van de cholesterol huishouding kan leiden tot hart- en vaatziekten.

Hart- en vaatziekten zijn, ondanks de toepassing van cholesterol verlagende medicijnen, nog steeds de meest voorkomende doodsoorzaak in de westerse wereld, en manifesteren zich onder andere door hartinfarcten en hersenbloedingen. Naast een verstoord cholesterol metabolisme zijn ook andere risicofactoren bekend, waaronder: roken, suikerziekte en een hoge bloeddruk. Voordat de klinische kenmerken zich manifesteren is een proces van, in de regel, tientallen jaren vooraf gegaan, waarbij een langzame ophoping van cholesterol in de vaatwand uiteindelijk leidt tot een afsluiting van het vat. Deze afsluiting is vaak het gevolg van een stolsel of een scheurtje in de atherosclerotische plaque. De vaatwand wordt in een gezonde situatie beschermd door een laag van zogenaamde endotheelcellen. Deze cellen kunnen door een verscheidenheid aan factoren geactiveerd raken, waardoor ontstekingscellen, zoals monocytten, uit het bloed worden aangetrokken. De monocytten migreren in de vaatwand en differentiëren tot macrofagen, welke proberen het lokale overschot aan cholesterol op te ruimen. Een macrofaag die veel cholesterol heeft opgenomen verandert in een zogenaamde schuimcel. De ophoping van cholesterol beladen schuimcellen in de bloedvatwand wordt gezien als het eerste kenmerk van een atherosclerotische plaque. Naarmate de ophoping van cholesterol en de ontstekingsprocessen voortduren, migreren gladde spiercellen door de atherosclerotische plaque om een barrière te vormen tussen de plaque en het bloed. Vervolgens ontstaat een kern van afstervende cellen en extracellulaire cholesterol kristallen, en de gladde spiercelbarrière wordt dunner. Als deze barrière scheurt komen er vele stollingsfactoren vrij, leidend tot de vorming van een bloedstolsel welke het vat afsluit, resulterend in zuurstof deprivatie van het achterliggende weefsel met alle gevolgen van dien.

Eén van de factoren die endotheelcellen kunnen activeren is een verstoring van het cholesterol-evenwicht van het lichaam. Cholesterol, en ook fosfolipiden zijn essentieel voor de opbouw van celmembranen, maar ook voor de synthese van bijvoorbeeld hormonen. Een evenwichtige cholesterol huishouding is dus niet alleen belangrijk voor het hele lichaam maar ook voor individuele cellen. Dit evenwicht

wordt, in een gezonde situatie, in stand gehouden door een strak gereguleerde balans tussen de opname van cholesterol uit het voedsel en *de novo* cholesterol synthese. Cholesterol wordt uit het voedsel opgenomen door de darmen en verpakt in fosfolipiden bevattende triglyceride-rijke chylomicronen. De triglyceriden in de chylomicronen worden in de bloedsomloop afgebroken en de resulterende chylomicronen “remnants” worden afgevoerd naar de lever. De lever scheidt, op zijn beurt, VLDL (very-low-density) lipoproteïne deeltjes uit in de bloedsomloop. De VLDL lipoproteïne deeltjes worden omgevormd tot LDL (low-density) lipoproteïne deeltjes, welke kunnen worden opgenomen door perifere weefsels of weer door de lever. De lever en darm scheiden ook vetarm ApoAI in de bloedsomloop uit. Vetarm ApoAI is de voorloper van het HDL (high-density) lipoproteïne deeltje, dat door cholesterol en fosfolipiden op te nemen wordt gevormd.

In *hoofdstuk 2* wordt een gedetailleerde beschrijving van de regulatie van het cholesterol evenwicht in een specifieke cel, de macrofaag, gegeven. Dit evenwicht wordt gereguleerd door zogenaamde ABC-transporters. Macrofagen kunnen via verschillende receptoren cholesterol opnemen, maar ook via macropinocytose. Bij macropinocytose stulpt het celmembran in, waarbij een blaasje met vloeistof uit de omgeving van de cel wordt gevormd en dat vervolgens door de cel wordt opgenomen. Omdat macrofagen de opname van cholesterol niet kunnen reguleren, zijn deze cellen afhankelijk van zogenaamde efflux mechanismen, waarbij het cholesterol uit de cellen wordt getransporteerd. ABC-transporters, waaronder ABCA1 en ABCG1 spelen hierbij een grote rol. ABCA1 wordt verantwoordelijk gehouden voor de efflux van cholesterol en fosfolipiden naar vetarm ApoAI, terwijl ABCG1 verantwoordelijk is voor de efflux van cholesterol en fosfolipiden naar HDL. In dit hoofdstuk wordt ook het belang van ABC-transporters voor de opbouw van celmembranen besproken. Celmembranen zijn asymmetrisch opgebouwd: de buitenkant bevat meer choline-bevattende fosfolipiden, terwijl de binnenkant meer bestaat uit glycerofosfolipiden. Dit verschil wordt gehandhaafd door zogenaamde flippases en floppases, enzymen die de verschillende fosfolipiden actief van de ene kant naar de andere kant van het membraan flippen, om op deze manier de membraan asymmetrie in stand te houden. Verschillende familieleden van de ABC-transporter familie worden gerekend tot de floppases. ABCB4 is bijvoorbeeld een selectieve fosfatidylcholine floppase en speelt dus een rol in membraan asymmetrie. Macropinocytose is sterk afhankelijk van

deze asymmetrie. Omdat ABC-transporters de asymmetrie van celmembranen kunnen beïnvloeden door fosfolipiden van de binnenkant naar de buitenkant te transporteren, hebben wij de hypothese geformuleerd dat deze transporters niet alleen belangrijk zijn voor de efflux van cholesterol en fosfolipiden uit macrofagen, maar ook de opname van cholesterol en fosfolipiden kunnen beïnvloeden.

De functie van de ABC-transporter ABCB4 in de cholesterol en fosfolipiden huishouding van macrofagen, en de implicaties voor de ontwikkeling van atherosclerose zijn bestudeerd in *hoofdstuk 3*. Het was reeds bekend dat de afwezigheid van ABCB4 in het lichaam leidt tot een verstoring van fosfolipiden in de gal, en dat ook de cholesterol uitscheiding naar de gal is geblokkeerd. Dit wijst erop dat ABCB4 een rol speelt in de cellulaire lipiden efflux. Deze rol voor ABCB4 in de vethuishouding van cellen en de aangetoonde aanwezigheid van ABCB4 op macrofagen bracht ons er toe om de functie van ABCB4 in de vorming van atherosclerose te onderzoeken. Door middel van een beenmergtransplantatie zijn er muizen gecreëerd die specifiek ABCB4 op uit het beenmerg afkomstige cellen, waaronder macrofagen, missen. Door voeding van een zogenaamd westers type dieet, een dieet met veel cholesterol en vet, wordt de ontwikkeling van atherosclerose geïnduceerd in deze muizen. Serum cholesterol niveaus waren echter significant lager dan de serum cholesterol niveaus in muizen getransplanteerd met normaal beenmerg. Ondanks verlaging in serum cholesterol ontwikkelden deze muizen toch een 1.8 keer grotere atherosclerotische lesie. Ook werd aangetoond dat *in vitro* de schuimcel vorming was toegenomen doordat het verwijderen van ABCB4 op macrofagen leidde tot een verhoging van de cholesterol opname, terwijl de efflux van cholesterol en fosfolipiden niet was veranderd. Dit alles wijst erop dat ABCB4 een belangrijke rol speelt in de bescherming tegen de vorming van atherosclerotische plaques, waarschijnlijk door de in *hoofdstuk 2* voorgestelde rol voor ABC-transporters in de opname van cholesterol.

Circulerend HDL neemt cholesterol en fosfolipiden op uit perifere cellen, en brengt het naar de lever, waar de overmaat cholesterol kan worden afgevoerd uit het lichaam via de gal in de faeces. Dit proces wordt 'reverse cholesterol transport' genoemd. De ABC-transporter ABCA1 en de scavenger receptor SR-BI reguleren de efflux van cholesterol uit cellen. Daarnaast is ABCA1 op de lever en in mindere mate in de darm belangrijk voor de productie van HDL, terwijl SR-BI op de lever de hoeveelheid HDL

cholesterol in het bloed reguleert door de selectieve opname van cholesterol esters. De belangrijke rol van deze eiwitten als spelers in het 'reverse cholesterol transport' proces wordt uitgebreid behandeld in *hoofdstuk 4*.

SR-BI komt voornamelijk tot expressie in organen welke belangrijk zijn voor cholesterol metabolisme, zoals de lever, maar ook in organen welke belangrijk zijn voor de hormoonsynthese, zoals de testis, ovaria en bijniere. ABCA1 wordt voornamelijk aangetroffen in de lever, de darm, de placenta en de longen. Het belang van SR-BI voor het cholesterol metabolisme werd duidelijk na studies in muizen waarbij met behulp van adeno-virussen de hoeveelheid SR-BI in de lever werd verhoogd. Deze overexpressie in de lever resulteerde in een sterke daling van het serum HDL cholesterol. In SR-BI knock out muizen, muizen die het gen voor SR-BI missen, werd vervolgens de rol van SR-BI als HDL-receptor bevestigd. In het bloed van deze muizen stapelden zich abnormaal grote HDL lipoproteïne deeltjes op. Daarnaast hebben beenmergtransplantatie studies duidelijk gemaakt dat SR-BI op macrofagen een beschermde functie heeft in gevorderde plaques in muismodellen voor de ontwikkeling van atherosclerose (ApoE en LDLr knock out muizen). SR-BI op macrofagen kan echter de ontwikkeling van vroege plaques, de zogenaamde fatty streaks, stimuleren. De rol van SR-BI op macrofagen in atherosclerose lijkt dus af te hangen van het stadium waarin de atherosclerose verkeert. Het belang van ABCA1 in 'reverse cholesterol transport' werd voor de eerste keer duidelijk door de ontdekking dat de ziekte van Tangier, die wordt veroorzaakt door een mutatie in het gen dat codeert voor ABCA1. Uitschakeling van ABCA1 in muizen heeft het belang van ABCA1 voor de vorming van HDL aangetoond. Deficiëntie van ABCA1 in muizen leidt tot de afwezigheid van serum HDL-cholesterol. In het klassieke 'reverse cholesterol transport' model transporteert ABCA1 cholesterol vanuit macrofagen naar HDL. Beenmergtransplantatie studies, waarbij ABCA1 specifiek op macrofagen werd uitgeschakeld, lieten echter geen daling van het serum HDL niveaus zien. Specifieke deletie van ABCA1 in de lever daarentegen leidde wel tot een scherpe daling van de HDL niveaus in het serum. De lever speelt dus een essentiële rol voor de productie van HDL. Mensen met een heterozygote mutatie in het ABCA1 gen hebben een verhoogde kans op de vroegtijdige ontwikkeling van atherosclerose. Beenmergtransplantaties van ABCA1 deficiënt beenmerg naar een muismodel voor atherosclerose hebben bevestigd dat ABCA1 op macrofagen een beschermende rol speelt in atherosclerose.

Omdat SR-BI en ABCA1 elk een essentiële rol spelen aan begin en eind van het 'reverse cholesterol transport' proces, is een synergie tussen beide eiwitten denkbaar. Om deze hypothese te testen zijn er zogenaamde dubbele knock out muizen ontwikkeld met een deficiëntie in zowel het gen voor SR-BI, als het gen voor ABCA1. In *hoofdstuk 5* wordt de karakterisatie van deze dubbele knock out muizen besproken. Het blijkt dat uitschakeling van het gen voor zowel SR-BI als ABCA1 resulteert in een zeer laag serum HDL-cholesterol niveau, een niveau dat vergelijkbaar is met dat van muizen die alleen ABCA1 missen. Ondanks deze enorme verlaging in het serum cholesterol, was er geen verschil in de hoeveelheid cholesterol in de lever van deze muizen in vergelijking met normale muizen. Ook werd er geen effect gevonden op het galzouten en fosfolipiden gehalte van de gal. De hoeveelheid cholesterol in de gal was echter wel verlaagd, een bevinding die eerder ook werd geconstateerd in muizen die alleen SR-BI missen. Dit alles wijst erop dat ABCA1 en SR-BI onafhankelijk van elkaar functioneren. ABCA1 lijkt het belangrijkste voor de efflux van cholesterol uit cellen, terwijl SR-BI voornamelijk een rol speelt bij de opname van cholesterol door de lever en het uitscheiden van cholesterol naar de gal. Beide eiwitten kunnen dus therapeutisch worden gebruikt om het 'reverse cholesterol transport' te stimuleren.

De beschermende rol van HDL in de voorkoming van de vorming van atherosclerotische plaques wordt voornamelijk toegeschreven aan de functie van HDL in het faciliteren van 'reverse cholesterol transport' vanuit de macrofaag naar de lever. In *hoofdstuk 6* worden de resultaten van een beenmergtransplantatie studie naar de gecombineerde rol van ABCA1 en SR-BI in atherosclerose gepresenteerd. ABCA1 deficiënt beenmerg in LDLr knock out muizen leidt tot een verhoging van atherosclerose, terwijl de functie van SR-BI in beenmerg afhangt van het stadium waarin de plaque ontwikkeling verkeerd. Transplantatie van SR-BI en ABCA1 dubbel deficiënt beenmerg naar LDLr knock out muizen resulteerde in een 2.3-voudige vergroting van de atherosclerotische plaque in vergelijking met muizen die getransplanteerd waren met controle beenmerg. Tevens was de plaque groter (1.4 en 1.5 keer) dan plaques van muizen die getransplanteerd waren met beenmerg van muizen waarin alleen ABCA1 of SR-BI was uitgeschakeld. Zowel ABCA1 als SR-BI in macrofagen spelen dus een belangrijke rol bij de bescherming tegen de ontwikkeling van atherosclerose. Hiermee wordt de onafhankelijke rol van beide

proteïne voor de vorming van atherosclerose gedemonstreerd en wordt tevens duidelijk dat therapeutische interventie zich op beide eiwitten zou kunnen richten.

Om hart- en vaatziekten te voorkomen vormen op dit moment de statines het meest voorgeschreven medicament. Statines remmen *de novo* cholesterol synthese, waardoor de circulerende cholesterol niveaus worden verlaagd, en de opname van al dan niet geoxideerd LDL door macrofagen wordt verlaagd.

Het cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) transporteert cholesteryl esters van HDL naar VLDL en LDL, en speelt daarmee een belangrijke rol in cholesterol metabolisme. Dit is tevens een eiwit dat afwezig is in muizen, mogelijk bijdragend tot de relatieve resistentie van muizen voor hart- en vaatziekten. De ontwikkeling van geneesmiddelen die de activiteit van CETP remmen, zoals Torcetrapib, leidt tot een verhoging van HDL niveaus in het bloed te verhogen, terwijl de LDL niveaus werden verlaagd: in principe een effect waarmee de ontwikkeling van atherosclerose zal worden verminderd. Helaas hebben recente klinische studies aangetoond dat het middel de bloeddruk verhoogt en daardoor niet leidt tot een betere levensverwachting. Desalniettemin blijft verhoging van de hoeveelheid HDL cholesterol in het bloed een interessante therapeutische strategie om de ontwikkeling van atherosclerose in de toekomst verder te verminderen. Ook verhoging van het transport van cholesterol vanuit de vaatwand naar de lever door verandering van de expressie van SR-BI en ABC-transporters kan worden beschouwd als een belangrijke nieuwe target voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor de voorkoming en behandeling van atherosclerose in patiënten met hart- en vaatziekten. In dit proefschrift hebben we niet alleen aangetoond dat SR-BI en ABCA1 een belangrijke rol bij 'reverse cholesterol transport', maar ook dat deze transporteiwitten onafhankelijk van elkaar functioneren. Therapeutische modulatie van het 'reverse cholesterol transport' moet zich niet richten op één specifiek gen/eiwit, maar er dient gestreefd te worden naar een simultane activatie van cholesterol transporteiwitten wat zou kunnen leiden tot een optimale bescherming tegen vaatvernauwing en dientengevolge hart- en vaatziekten.