

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/34976> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Wierda, Rutger J.

**Title:** On epigenetic regulation in atherosclerosis pathology

**Issue Date:** 2015-09-03

MI



**Nederlandse Samenvatting**

---

## Nederlandse Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn momenteel doodsoorzaak nummer één in ontwikkelde westerse landen. De primaire oorzaak van coronair vaatlijden en hartinfarct is atherosclerose. In de volksmond, onterecht, wellicht beter bekend als aderverkalking. De klinische manifestatie van atherosclerose is het ontstaan van zogenaamde plaques in de vaatwand. Het ontstaan van deze plaques wordt waarschijnlijk veroorzaakt door geoxideerd LDL cholesterol (OxLDL). Onder invloed van deze stof migreren een bepaald type cellen (monocyten) uit het bloed de vaatwand in. Daar differentiëren deze cellen in macrofagen, die proberen de OxLDL op te ruimen. Macrofagen kunnen OxLDL echter niet verteren, maar blijven deze stof wel continu opnemen. Hierdoor ontstaan opgezwollen macrofagen, vol met OxLDL; de zogenaamde schuimcellen. De aanwezigheid van deze schuimcellen is wat de plaques vormt in de vaatwand. Monocyten en macrofagen zijn onderdeel van ons immuunsysteem. De voortdurende activatie van het immuunsysteem door OxLDL zorgt voor een chronische ontsteking in de vaatwand. De vaatwand zal onder druk van de groter wordende plaque initieel verwijden, maar uiteindelijk vernauwd de vaatwand zich. Als een vat te sterk vernauwd is, of door het scheuren van een plaque verstopt, stopt de bloedsomloop hetgeen een infarct veroorzaakt.

Het ontstaan van atherosclerose wordt gekenmerkt door vele omgevingsfactoren, zoals voeding en roken. Daarom wordt gedacht dat epigenetische regulatie een belangrijke rol speelt in het ontstaan van plaques, de klinische manifestatie van atherosclerose. Epigenetische regulatie is een proces dat cellen gebruiken om genexpressie te reguleren. In tegenstelling tot vele andere manieren van regulatie is epigenetische regulatie stabiel en blijft het behouden door celdivisies heen, maar zelfs door generaties heen kunnen epigenetische kenmerken bewaard blijven. Epigenetische regulatie bestaat uit het aanbrengen van chemische modificaties (methylgroepen) op het DNA, zonder dat daarbij de DNA-sequentie veranderd wordt. Daarnaast worden de eiwitten waaromheen het DNA opgewonden zit (histonen) voorzien van chemische modificaties. Of een gen tot expressie komt of niet wordt bepaald door de (combinatie van) modificaties die zijn aangebracht. In dit proefschrift wordt gekeken naar de invloed van epigenetische genregulatie op het ontstaan van atherosclerose.

**Hoofdstuk 2** van dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar de aanwezigheid van epigenetische modificaties in plaque-materiaal. Dit materiaal is verkregen van orgaandonoren en vervolgens in dunne (4µm dik) plakjes gesneden. Door middel van immunohistochemie is het mogelijk de chemische modificaties van histonen,

---

die de basis vormen van epigenetische regulatie, aan te kleuren. Door middel van de computertechniek beschreven in **hoofdstuk 2** werden het aantal cellen met en zonder epigenetische kenmerken geteld. Daarna is een correlatie gemaakt tussen het plaque stadium (1=vroeg tot 6=laat stadium). Er werd een zwakke, maar significante correlatie gevonden in één van de epigenetische markers (H3K27Me3). De eiwitten die deze modificatie lezen, aanbrengen of verwijderen laten echter geen veranderingen in expressie zien. Hierbij moet echter aangemerkt worden dat deze resultaten mogelijk vertekend zijn door de gebruikte technieken en de gevoeligheid daarvan.

In **hoofdstuk 3** wordt de differentiatie van monocytten in andere celtypen op moleculair niveau beschreven. Monocytten, geïsoleerd uit het bloed van gezonde vrijwilligers, worden *in vitro* gedifferentieerd tot dendritische cellen en macrofagen (type 1 en type 2). Door middel van kwantitatieve PCR is in deze cellen gekeken naar de RNA transcriptieniveaus van 59 genen betrokken bij epigenetische regulatie. Het blijkt dat van de vier verschillende klassen van enzymen er drie verschillen in transcriptie tussen monocytten en gedifferentieerde monocytten: KMTs, KDMs en HDACs. Van alle bekeken genen is er alleen bij *KMT1C* sprake van significant verschillende transcriptie. Wanneer tijdens de differentiatie van monocytten naar dendritische cellen (DCs) dit enzym geblokkeerd wordt door BIX-01294, wordt de transcriptie van *DC-SIGN* (typerend voor DCs) verlaagd. Op eiwitniveau heeft BIX-01294 geen effect op *DC-SIGN* transcriptie. Echter wanneer KMT-activiteit in het algemeen geremd wordt door DZNep is er ook minder DC-SIGN aanwezig op het celoppervlak. Dit effect wordt versterkt wanneer DZNep en BIX-01294 gecombineerd worden. Dit toont aan dat KMT1c een rol speelt bij de differentiatie van monocytten naar DCs.

In **hoofdstuk 4** wordt in detail beschreven hoe epigenetische regulatie de expressie van een gen beïnvloed. Het *CCR5* gen, wat betrokken is bij het ontstaan van atherosclerose komt in verschillende niveaus tot expressie in verschillende celtypen. Klassieke genregulatie, door middel van transcriptiefactoren die binden op het DNA kan deze verschillen niet verklaren. *CCR5* wordt slechts door de transcriptiefactor CREB-1 gereguleerd, maar deze transcriptie factor is vrijwel continu aanwezig in alle cellen. Het verschil kan wel verklaard worden door de 'epigenetische status' van het *CCR5* gen. In cellen waar *CCR5* niet tot expressie komt zit het gen ook epigenetisch 'op slot', waarbij in cellen die *CCR5* tot expressie brengen de epigenetische status daartoe ook gunstig is. Dit is compleet in lijn met de huidige theorie over epigenetische regulatie. Wat echter opvalt, is dat de epigenetica hier ook de mate van transcriptie bepaald, iets wat tot nu toe maar in een paar gevallen

beschreven is. Belangrijk bij het bestuderen van epigenetische regulatie is dus om alle factoren zowel, positief als negatief regulerend, in ogenschouw te nemen.

In **hoofdstuk 5** wordt een zogenaamd polymorfisme in de promotor van een epigenetisch gen beschreven: *PCAF*. In een eerdere studie werd dit polymorfisme gecorreleerd met een grotere vatbaarheid voor atherosclerose. In diezelfde studie werd eveneens aangetoond dat op de plek van het polymorfisme eiwitten kunnen binden en dat deze binding afhankelijk is van de aanwezige base in het DNA. In het onderzoek beschreven in dit hoofdstuk is vervolgens gekeken of deze eiwitbinding ook leidt tot een verschil in expressie. Deze expressie is gecontroleerd in cellen die aanwezig zijn in de vaatwand (HUVECs) en in de eerder beschreven monocytten. Er kon geen verschil aangetoond worden in expressie tussen de verschillende genotypen van het polymorfisme. Het verschil in vatbaarheid voor atherosclerose moet dus op een andere manier verklaard worden dan door een verschil in expressie van het *PCAF* gen.

Tot slot worden de gevonden resultaten in **hoofdstuk 6** samengevat en bediscussieerd. Aan het einde van dit hoofdstuk worden aanbevelingen gedaan voor toekomstig onderzoek. Met name wordt aanbevolen om meer epigenetisch gereguleerde loci te vinden middel van CHIP-Sequencing en de uitkomsten hiervan combineren met mechanistische studies.

