



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Preclinical validation of putative targets in cardiovascular and metabolic disease

Nahon, J.E.

Citation

Nahon, J. E. (2018, November 15). *Preclinical validation of putative targets in cardiovascular and metabolic disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66799>

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/1887/66799>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66799> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Nahon, J.E.

Title: Preclinical validation of putative targets in cardiovascular and metabolic disease

Issue Date: 2018-11-15



Universiteit
Leiden

<http://hdl.handle.net/###>

Nederlandse Samenvatting

INTRODUCTIE

Hart- en vaatziekten zijn de nummer één doodsoorzaak in de wereld [1]. In Europa wordt 45% van alle mortaliteit veroorzaakt door de klinische consequenties zoals hartinfarcten en beroertes [2]. De belangrijkste risicofactor is dyslipidemie, maar een ongezonde leefstijl en gerelateerde aandoeningen zoals metabool syndroom, gekarakteriseerd door overgewicht, insuline resistentie, leververvetting en ontsteking van vetweefsel, dragen ook bij aan het risico op klinische manifestatie van de ziekte [3,4]. De omschakeling van patiënten naar een gezondere leefstijl zoals stoppen met roken en meer lichamelijke beweging vormt een uitdaging. De vorderingen op dit gebied zorgen slechts voor een kleine vermindering van de toenemende incidentie van hart- en vaatziekten in patiënten [3]. Echter wordt dit effect tenietgedaan door de stijgende incidentie van type 2 diabetes en het toenemende overgewicht in de algemene bevolking [1]. De huidige farmacologische behandelstrategieën richten zich op verlaging van cholesterol in het bloed met behulp van statines. Helaas verminderen statines de mortaliteit gerelateerd aan hart- en vaatziekten maar met ongeveer 25% [5]. Identificatie van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten is van groot belang teneinde het restrisico verder te kunnen verlagen. We hebben potentiële therapeutische aangrijpingspunten geselecteerd op basis van vakliteratuur en een combinatie aan beschikbare genetische data en genexpressie- en eiwit profileringsdata. In dit proefschrift hebben we deze potentiële aangrijpingspunten gevalideerd in een preklinische context.

POTENTIËLE AANGRIJPINGSPUNTEN IN HART- EN VAATZIEKTEN

Stabilin-1 als potentieel therapeutisch aangrijpingspunt

Om effectieve nieuwe therapieën te ontwikkelen, is het van groot belang om de pathologische processen onderliggend aan de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, namelijk slagaderverkalking oftewel atherosclerose, beter te begrijpen. Atherosclerose is een pathologische conditie van de bloedvaten dat zich ontwikkelt in de tijd. Een complex samenspel tussen dyslipidemie en chronische ontsteking resulteert in de ontwikkeling van atherosclerotische laesies in de vaatwand van medium tot grote arteriën [6]. De ophoping van (gemodificeerd) cholesterol en immuuncellen vernauwt en verstijft het bloedvat lokaal, wat tot klinische problemen kan leiden. Als deze laesies uiteindelijk scheuren kunnen er bovendien bloedstolsels ontstaan die kleinere bloedvaatjes van het hart of in de hersenen blokkeren en daarmee resulteren in een hart- of herseninfarct. Macrofagen, specifieke immuuncellen, veranderen in schuimcellen door overmatige opname van deze gemodificeerde cholesterol deeltjes in hun omgeving. Dit cholesterol kunnen ze vervolgens niet meer afstaan aan extracellulaire ontvangers door middel van gemedieerde efflux [7]. Speciale opname receptoren op het oppervlak van macrofagen mediëren de opname van vetten en daarmee de vorming van schuimcellen [8]. Voor dit

proefschrift hebben we de opname receptor Stabilin-1 (Stab-1) geselecteerd voor validatie als mogelijk nieuw therapeutisch aangrijpingspunt voor validatie. Deze selectie is gebaseerd op gen expressie data die laten zien dat Stab-1 expressie is gereguleerd tijdens de ontwikkeling van atherosclerose in laesies en ex vivo schuimcellen. Daarnaast waren variaties in het gen dat voor Stab-1 codeert gevonden tijdens stamboomonderzoek in een familie met een extreem fenotype: premature atherosclerose (J.C. van Capelleveen, G.M. Dallinga-Thie en K.G. Hovingh, AMC Amsterdam, ongepubliceerde data). In hoofdstuk 2 hebben we het effect van uitschakeling van Stab-1 in macrofagen onderzocht op de ontwikkeling van atherosclerose in muizen. Afwezigheid van Stab-1 op macrofagen had, opmerkelijk genoeg, geen effect op de ontwikkeling van schuimcellen in deze muizen. Als logische consequentie was de gevoeligheid voor het ontwikkelen van atherosclerotische laesies ook niet veranderd. Hoewel onze genetische en transcriptie gerelateerde data een mogelijke rol voor Stab-1 in de pathogenese van atherosclerose suggereren, hebben we dit dus niet kunnen aantonen in ons muismodel voor de ziekte. Deze discrepantie zou ofwel het gevolg kunnen zijn van de aanpak om het aangrijpingspunt te identificeren of het zou intrinsiek kunnen zijn aan de biologische functie van het aangrijpingspunt. Bij het analyseren van genexpressie profileringsdata is het belangrijk om bewust te zijn van de hoge frequentie vals-positieve uitkomsten als gevolg van een statistisch fenomeen: het veelvuldig statistische testen. Het onderzoeksveld van de bio-informatica dat zich bezig houdt met dit type statistiek doet pogingen om de snelle ontwikkelingen in de genetica bij te houden [9]. Hiervoor moet het tools aanbieden om op een correcte wijze de enorme datasets die worden vergaard te analyseren en interpreteren. De ontwikkeling van nieuwe rekenmodellen voor het analyseren van genexpressie profileringsdata zal in de toekomst bijdragen aan het reduceren van vals-positieve uitslagen [9,10]. Vanuit een biologisch perspectief, is het belangrijk om op te merken dat al is aangetoond dat macrofaag opname receptoren vaak overlappende functies hebben in de herkenning van liganden, bijvoorbeeld scavenger receptor type A I en CD36. Hierdoor zijn de effecten van uitschakeling van één of meerdere opname receptoren tegelijkertijd op atherosclerose ontwikkeling in muismodellen controversieel [11]. Bovendien vormen de overlappende functies een uitdaging voor de ontwikkeling van therapeutische behandelstrategieën gericht op remming van de opname van gemodificeerde vetten door dit soort receptoren.

Proteoglycaan 4 als potentieel therapeutisch aangrijpingspunt

Een voorbeeld dat laat zien dat genetische studies en genexpressie- en eiwitprofilering een belangrijke voorspellende waarde hebben voor het aantonen van causaliteit is proteoglycaan 4 (Prg4). In onze gen expressie analyse op bloedvaten met ontwikkelende atherosclerotische laesies, vonden we een sterke verhoging van Prg4 expressie. Dit vormde de basis van de selectie van dit proteoglycaan als potentieel aangrijpingspunt ter validatie. Een interessante bevinding was dat in een familie met premature atherosclerose variaties zijn gevonden in het gen voor Prg4 die associëren met de ziekte (J.C. van Capelleveen, G.M. Dallinga-Thie en K.G.

Hovingh, AMC Amsterdam, ongepubliceerde data). Proteoglycanen zijn macromoleculen die betrokken zijn bij de retentie van gemodificeerd cholesterol in de vaatwand en bij de interactie van cholesterol-vervoerende deeltjes en cellen in de circulatie [12,13]. In hoofdstuk 3 van dit proefschrift hebben we het effect onderzocht van beenmerg-specifieke Prg4 deficiëntie in de processen van schuimcelvorming, transport van cholesterol uit cellen en de ontwikkeling van atherosclerose in een muismodel. Uit de experimenten blijkt dat Prg4 deficiëntie in macrofagen leidt tot een verhoogde gevoeligheid voor het ontwikkelen van schuimcellen in vergelijking met wild-type macrofagen. Het lijkt er verder op dat dit effect veroorzaakt wordt door een positief effect van dit proteoglycaan op het transport van cholesterol uit de cel. De verminderde cholesterol efflux in de Prg4 deficiënte macrofagen was zichtbaar in aanwezigheid van HDL en apolipoproteïne A als de ontvangers van het cholesterol, mogelijk door de verlaagde expressie van de genen scavenger receptor type BI en ATP-binding cassette transporter A1, maar ook zonder toevoeging van deze extracellulaire cholesterol ontvangers. Een endogeen geproduceerde cholesterol ontvanger is apolipoproteïne E (ApoE) [14]. Lucas en collega's hebben laten zien dat een substantiële hoeveelheid van het ApoE dat wordt geproduceerd door macrofagen, wordt verzameld in een extracellulair netwerk van proteoglycanen [15]. Daarnaast is bekend dat extracellulair ApoE de efflux van sterolen vanuit macrofagen kan faciliteren zowel in de aanwezigheid als in de afwezigheid van andere ontvangers [16]. Een theorie zou kunnen zijn dat Prg4 betrokken is bij deze processen en daarmee de macrofaag cholesterol efflux beïnvloed. Het is belangrijk op te merken dat het effect niet heel groot was en dat de ontwikkeling van atherosclerose in muizen waarin Prg4 specifiek was uitgeschakeld in beenmerg-afgeleide cellen bovendien niet anders was. Naast deze effecten op cellulaire cholesterol regulatie, hebben we ook kleine effecten op de immuunrespons van macrofagen gevonden in Prg4 deficiënte muizen. Gebaseerd op deze pleiotrope effecten en het feit dat Prg4 door een veelvoud aan celtypen wordt uitgescheiden, verwachten we dat de totale bijdrage van beenmerg-afgeleid Prg4 aan het totale serum Prg4 niveau minimaal is. Dit leidde tot de hypothese dat de beschikbaarheid en niet persé de bron van Prg4 productie de bepalende factor is voor het effect van Prg4 op de ontwikkeling van atherosclerose. In overeenstemming met deze hypothese hebben wij in dit proefschrift aangetoond dat muizen die totaal geen Prg4 produceren een verhoogde aanleg hebben voor atherosclerose ontwikkeling (beschreven in hoofdstuk 4). De onderliggende mechanismen hiervan dienen echter nog nader onderzocht te worden. Een belangrijke conclusie is dat het bestuderen van de rol van gesecreteerde eiwitten in de pathogenese atherosclerose zeer complex is, onder andere omdat de ontwikkeling van atherosclerotische laesies het resultaat is van zowel lokale ziekteprocessen als systemische verstoringen.

De processen die betrokken zijn bij hart- en vaatziekten en metabool syndroom zijn nauw met elkaar verbonden. Dit wordt benadrukt door het feit dat Prg4 positief is geassocieerd met gewichtstoename, toegenomen dyslipidemie en toegenomen HOMA-IR (een maat voor

insuline gevoeligheid) in mensen met obesitas [17–19]. In hoofdstuk 5 van dit proefschrift laten we zien dat onder obese en diabetische omstandigheden, Prg4 deficiënte muizen een verlaagd niveau van plasma vetten, een betere glucose tolerantie en een sterke tendens richting een verbeterde insuline gevoeligheid hebben ten opzichte van muizen met normale Prg4 niveaus. Dit komt overeen met de associaties die in mensen zijn gevonden, wat de translationele waarde van dit aangrijpingspunt benadrukt. Eén van de karakteristieke klinische aspecten van metabool syndroom, is leververvetting als gevolg van de ophoping van triglyceriden [20]. Er is een sterke associatie gevonden tussen insuline resistentie en leververvetting die suggereert dat de vervetting een consequentie is van een verstoorde insuline regulatie [21,22]. Daarnaast is insuline resistentie ook geopperd als oorzaak van de ontsteking van vetweefsel [23]. In onze experimenten laten we zien dat Prg4 deficiënte muizen een verbeterde glucose tolerantie hadden, verminderde leververvetting en minder ontsteking van het vetweefsel. Deze effecten zouden gemedieerd kunnen zijn door onafhankelijke processen. Echter, het zou ook zo kunnen zijn dat de verbeterde insuline gevoeligheid de onderliggende factor is die alle andere processen verbindt. Het onderliggende mechanisme dat laat zien hoe Prg4 dit bewerkstelligt moet echter nog verder uitgezocht worden.

Samenvattend, met de experimenten beschreven in dit proefschrift hebben we nieuwe, pleiotrope effecten van Prg4 deficiëntie gevonden in meerdere weefsels. De data verkregen in muizen die Prg4 in alle weefsels missen, laten de complexiteit zien van het bestuderen van de invloed van een uitgescheiden factor met pleiotrope effecten op de ontwikkeling van een multifactoriële aandoening zoals hart- en vaatziekten en metabool syndroom. Totdat de processen onderliggend aan de effecten van Prg4 op deze ziekteprocessen bekend zijn, blijft Prg4 een lastig therapeutisch aangrijpingspunt. Daarnaast moet benadrukt worden dat hoewel Prg4 deficiëntie metabool syndroom vermindert, de ontwikkeling van atherosclerose juist wordt verergerd. Het is daarom belangrijk om vervolgstudies voor de validatie van dit aangrijpingspunt uit te voeren in een (muis) model waarin de effecten op metabool syndroom en de comorbiditeit atherosclerose simultaan bestudeerd kunnen worden.

Proteïne arginine methyl transferase 3 als potentieel therapeutisch aangrijpingspunt

Proteïne arginine methyl transferase 3 (PRMT3) was geselecteerd als een potentieel therapeutisch aangrijpingspunt op basis van de gereguleerde genexpressie tijdens de ontwikkeling van macrofaag-schuimcellen in vitro en tijdens de ontwikkeling van atherosclerotische laesies in muizen. In de literatuur hadden we gevonden dat PRMT3 een interactie aangaat met de lever X receptor (LXR) waarbij het de activiteit van LXR-gemedieerde transcriptie moduleert als een cofactor [24]. Omdat LXR een zeer bekend aangrijpingspunt is in zowel hart- en vaatziekten als in metabool syndroom [25], hebben we de effecten van PRMT3 inhibitie in de context van beide ziekteprocessen onderzocht in hoofdstuk 7 van dit proefschrift. LXR is een nucleaire transcriptiefactor die macrofaag cholesterol efflux stimuleert via de positieve regulatie van de

ATP-binding cassette transporters A1 en G1 betrokken bij dit proces. Om deze reden worden LXR agonisten uitgebreid onderzocht als potentiële therapeutische aangrijpingspunten voor de behandeling van cholesterol gedreven ziekten zoals atherosclerose [26,27]. Echter, LXR reguleert tegelijkertijd de de novo productie van triglyceriden in de lever via de activatie van de transcriptie factor sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) [28–30]. Deze activatie, gestimuleerd door de LXR agonisten leidt tot ongewenste leververvetting [31,32]. Dit effect heeft de ontwikkeling van LXR agonisten voor klinisch/therapeutisch gebruik in mensen ernstig verhinderd. Tijdens de experimenten beschreven in hoofdstuk 7, ontwikkelden de hyperlipidemische ApoE deficiënte muizen, een standaard muizenras dat gebruikt wordt voor het onderzoeken van atherosclerose, ook leververvetting onder invloed van een Westers dieet dat rijk is in cholesterol. Remming van PRMT3 verminderde deze leververvetting, zonder een effect te laten zien op de gevoeligheid voor het ontwikkelen van atherosclerose. Dit onderzoek suggereert dat middels remming van PRMT3 het LXR-gedreven negatieve effect op lipogenese en gunstige cholesterol modulerende effect ontkoppeld kunnen worden. In hoofdstuk 6 hebben we bovendien laten zien dat de vermindering van de leververvetting een direct effect is van PRMT3 remming op LXR-gereguleerde transcriptie in de lever. We hebben specifiek laten zien dat C57Bl/6 muizen behandeld met de PRMT3 inhibitor zijn beschermd tegen de ontwikkeling van leververvetting door opregulatie van de LXR target genen die betrokken zijn bij lipogenese te onderdrukken. Deze bevindingen worden ondersteund door andere publicaties die hebben laten zien dat LXR een rol speelt in leververvetting [33]. Echter, aanvullend onderzoek is nodig om de onderliggende mechanismen van leververvetting en de rol voor PRMT3 in dit proces verder te ontrafelen. LXR komt ook hoog tot expressie in wit vetweefsel en er is een lokale rol voor LXR in dit weefsel gesuggereerd in de aanmaak van vet door vetcellen [34]. Stimulatie van LXR in vetcellen met behulp van LXR agonisten, verhoogde ophoping van vetten in deze cellen [35]. In de experimenten, beschreven in hoofdstuk 7, laten we zien dat remming van PRMT3 leidt tot een verminderde gewichtstoename van de muizen. De vetcellen in de behandelde muizen hadden de tendens om kleiner te zijn met een geringe vet inhoud. Dit suggereert dat LXR in vetweefsel ook kan worden gemoduleerd door de PRMT3 inhibitor. Samenvattend, uit de data beschreven in hoofdstuk 6 en 7 kunnen we concluderen dat PRMT3 remming in combinatie met LXR stimulatie een waardevolle therapeutische aanpak kan zijn om de leververvetting als gevolg van LXR activatie te voorkomen zonder de gunstige effecten van LXR op verlaging van de atherosclerose ontwikkeling aan te tasten. Bovendien kan de PRMT3 inhibitie-geïnduceerde weerstand tegen gewichtstoename een additioneel therapeutisch effect hebben op de huidige therapeutisch strategie.

CONCLUSIE

In dit proefschrift heeft onze zoektocht naar nieuwe therapeutische aangrijpingspunten om de ontwikkeling van hart- en vaatziekten tegen te gaan laten zien dat verscheidene aangrijpingspunten niet alleen de pathogenese van atherosclerose beïnvloeden maar ook de gevoeligheid voor de ontwikkeling van metabool syndroom. Veel van de karakteristieken van deze multifactoriële ziekten overlappen. De resultaten van het onderzoek naar Prg4 als een potentieel therapeutisch aangrijpingspunt bevestigen dit, aangezien Prg4 deficiëntie effect heeft op zowel atherosclerose als metabool syndroom. Grote patiënten populaties hebben nog steeds een verhoogd risico op atherosclerose-gerelateerde klinische complicaties ondanks statine gebruik [36,37]. Dit restrisico zou verlaagd kunnen worden door middel van aanvullende behandelingsstrategieën. Idealiter zouden leefstijl interventies de risicofactoren onderliggend aan zowel de ontwikkeling van hart- en vaatziekten als metabool syndroom moeten verminderen. Echter zijn deze leefstijlinterventies tot nu toe nog niet heel succesvol gebleken [38]. Als alternatief zou een combinatie van cholesterol-verlagende therapie zoals statines gecombineerd kunnen worden met geneesmiddelen die metabool syndroom-geassocieerde factoren verbeteren. Behandeling met een combinatie van de statine atorvastatin en het anti-diabetische geneesmiddel metformine hebben in experimenten in een diermodel al veelbelovende resultaten geboekt waarbij atherosclerose ontwikkeling extra verminderd was na combinatiebehandeling [39]. Naast een combinatie van al bestaande geneesmiddelen, zou de zoektocht naar nieuwe therapeutische aangrijpingspunten kunnen worden uitgebreid naar aangrijpingspunten die effecten laten zien op zowel hart- en vaatziekten als metabool syndroom.

In conclusie, in de studies beschreven in dit proefschrift zijn 3 potentiële nieuwe aangrijpingspunten in hart- en vaatziekten en metabool syndroom onderzocht, waaronder Prg4, PRMT3 en Stab-1. Deze studies hebben een rol aangetoond voor Prg4 en PRMT3 in de ontwikkeling van atherosclerose en metabool syndroom. Bovendien laten de resultaten zien dat (1) beide multifactoriële aandoeningen zeer complex zijn en dat er overlappende mechanismen bestaan en (2) integratie van onderzoek naar de effecten op hart- en vaatziekten en metabool syndroom voordelig kan zijn voor therapeutische aangrijpingspunt identificatie en validatie.

REFERENTIES

- [1] Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., 2017. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update. vol. 135.
- [2] Wilkens, E., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Burns, R., et al., 2017. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. European Heart Network, Brussels.
- [3] Huffman, M.D., Capewell, S., Ning, H., Shay, C.M., Ford, E.S., Lloyd-Jones, D.M., 2012. Cardiovascular Health Behavior and Health Factor Changes (1988 –2008) and Projections to 2020: Results From the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Circulation* 125(22): 2595–602, Doi: 10.1037/a0018493.Understanding.
- [4] Galassi, A., Reynolds, K., He, J., 2006. Metabolic Syndrome and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis. *American Journal of Medicine* 119(10): 812–9, Doi: 10.1016/j.amjmed.2006.02.031.
- [5] Kones, R., 2011. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey. *Drug Design, Development and Therapy* 5: 325–80, Doi: 10.2147/DDDT.S14934.
- [6] Ross, R., 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340(2): 115–26, Doi: 10.1056/NEJM199901143400207.
- [7] Moore, K.J., Tabas, I., 2011. The Cellular Biology of Macrophages in Atherosclerosis. *Cell* 145(3): 341–55, Doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
- [8] Moore, K.J., Sheedy, F.J., Fisher, E. a., 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology* 13(10): 709–21, Doi: 10.1038/nri3520.
- [9] Pawitan, Y., Michiels, S., Koscielny, S., Gusnanto, A., Ploner, A., 2005. False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics* 21(13): 3017–24, Doi: 10.1093/bioinformatics/bti448.
- [10] Dudoit, S., Yang, Y.H., Callow, M.J., Speed, T.P., 2002. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Stat. Sinica* 12: 111–39, Doi: 10.1.1.117.9702.
- [11] Moore, K.J., Freeman, M.W., 2006. Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(8): 1702–11, Doi: 10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43.
- [12] Ji, Z.S., Brecht, W.J., Miranda, R.D., Hussain, M.M., Innerarity, T.L., Mahley, R.W., 1993. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *Journal of Biological Chemistry* 268(14): 10160–7.
- [13] Madonna, R., Caterina, R. De., 2014. Potential roles of vessel wall heparan sulfate proteoglycans in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology* 62(3): 120–2, Doi: 10.1016/j.vph.2014.05.002.
- [14] Mazzone, T., 1996. Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr Opin Lipidol.* 7(5): 303–7.
- [15] Lucas, M., Mazzone, T., 1996. Cell surface proteoglycans modulate net synthesis and secretion of macrophage apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry* 271(23): 13454–60, Doi: 10.1074/jbc.271.23.13454.
- [16] Lin, C.-Y., Huang, Z.H., Mazzone, T., 2001. Interaction with proteoglycans enhances the sterol efflux produced by endogenous expression of macrophage apoE. *The Journal of Lipid Research* 42(7): 1125–33.

- [17] Geyer, P.E., Wewer Albrechtsen, N.J., Tyanova, S., Grassl, N., Iepsen, E.W., Lundgren, J., et al., 2016. Proteomics reveals the effects of sustained weight loss on the human plasma proteome. *Molecular Systems Biology* 12(12): 901, Doi: 10.15252/msb.20167357.
- [18] Oller Moreno, S., Cominetti, O., Núñez Galindo, A., Irincheeva, I., Corthésy, J., Astrup, A., et al., 2018. The differential plasma proteome of obese and overweight individuals undergoing a nutritional weight loss and maintenance intervention. *Proteomics - Clinical Applications* 12(1): 1–11, Doi: 10.1002/prca.201600150.
- [19] Ortega, F.J., Mercader, J.M., Moreno-Navarrete, J.M., Nonell, L., Puigdecenet, E., Rodriquez-Hermosa, J.I., et al., 2015. Surgery-induced weight loss is associated with the downregulation of genes targeted by MicroRNAs in adipose tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(11): E1467–76, Doi: 10.1210/jc.2015-2357.
- [20] Den Boer, M., Voshol, P.J., Kuipers, F., Havekes, L.M., Romijn, J.A., 2004. Hepatic Steatosis: A Mediator of the Metabolic Syndrome. *Lessons from Animal Models. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(4): 644–9, Doi: 10.1161/01.ATV.0000116217.57583.6e.
- [21] Cömert, B., Mas, M.R., Erdem, H., Dinc, A., Saglamkaya, U., Cigerim, M., et al., 2001. Insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis. *Digest Liver Dis* 33(1): 353–8.
- [22] Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., et al., 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120(5): 1183–92, Doi: 10.1053/gast.2001.23256.
- [23] Shimobayashi, M., Albert, V., Woelnerhanssen, B., Frei, I.C., Weissenberger, D., Meyer-Gerspach, A.C., et al., 2018. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 128(4): 1538–50, Doi: 10.1172/JCI96139.
- [24] Kim, D., Park, M., Lim, S., Park, J., Yoon, K., Han, H., et al., 2015. PRMT3 Regulates Hepatic Lipogenesis Through Direct Interaction With LXRA. *Diabetes* 64(January): 60–71, Doi: 10.2337/db13-1394.
- [25] Geyeregger, R., Zeyda, M., Stulnig, T.M., 2006. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(5): 524–39, Doi: 10.1007/s00018-005-5398-3.
- [26] Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K.E., Wang, G., 2017. Ligands of Therapeutic Utility for the Liver X Receptors. *Molecules* 2(2): 1–24, Doi: 10.3390/molecules22010088.
- [27] Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J., Baron, S., 2012. Molecular and Cellular Endocrinology Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health ? *Molecular and Cellular Endocrinology* 351(2): 129–41, Doi: 10.1016/j.mce.2011.08.036.
- [28] Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., et al., 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277(13): 11019–25, Doi: 10.1074/jbc.M111041200.
- [29] Talukdar, S., Hillgartner, F.B., 2006. The mechanism mediating the activation of acetyl- coenzyme A carboxylase- a gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *Journal of Hepatology* 47, Doi: 10.1194/jlr.M600276-JLR200.
- [30] Cha, J.Y., Repa, J.J., 2007. The Liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *Journal of Biological Chemistry* 282(1): 743–51, Doi: 10.1074/jbc.M605023200.
- [31] Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., et al., 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes and Development*: 2831–8, Doi: 10.1101/gad.850400.On.

- [32] Grefhorst, A., Elzinga, B.M., Voshol, P.J., Plo, T., Kok, T., Bloks, V.W., et al., 2002. Stimulation of Lipogenesis by Pharmacological Activation of the Liver X Receptor Leads to Production of Large , Triglyceride-rich Very Low Density Lipoprotein Particles *. *The Journal of Biological Chemistry* 277(37): 34182–90, Doi: 10.1074/jbc.M204887200.
- [33] Postic, C., Girard, J., 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *Journal of Clinical Investigation* 118(3): 829–38, Doi: 10.1172/JCI34275.
- [34] Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 459–81.
- [35] Juvet, L.K., Andresen, S.M., Schuster, G.U., Dalen, K.T., Tobin, K.A.R., Hollung, K., et al., 2003. On the Role of Liver X Receptors in Lipid Accumulation in Adipocytes. *Molecular Endocrinology* 17(2): 172–82, Doi: 10.1210/me.2001-0210.
- [36] Kataoka, Y., St. John, J., Wolski, K., Uno, K., Puri, R., Tuzcu, E.M., et al., 2015. Atheroma progression in hyporesponders to statin therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35(4): 990–5, Doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304477.
- [37] Waters, D.D., Brotons, C., Chiang, C.W., Ferrières, J., Foody, J., Jukema, J.W., et al., 2009. Lipid treatment assessment project 2: A multinational survey to evaluate the proportion of patients achieving low-density lipoprotein cholesterol goals. *Circulation* 120(1): 28–34, Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.838466.
- [38] Alpert, W., Hospital, M., 2013. Cardiovascular Effects of Intensive Lifestyle Intervention in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 369(2): 145–54, Doi: 10.1056/NEJMoa1212914.
- [39] Luo, F., Guo, Y., Ruan, G.Y., Long, J.K., Zheng, X.L., Xia, Q., et al., 2017. Combined use of metformin and atorvastatin attenuates atherosclerosis in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Scientific Reports* 7(1): 1–10, Doi: 10.1038/s41598-017-02080-w.