



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cholesterol metabolism and hematopoiesis interaction in atherothrombosis

Ouweneel, A.B.

Citation

Ouweneel, A. B. (2019, March 21). *Cholesterol metabolism and hematopoiesis interaction in atherothrombosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/70039>

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/1887/70039>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/70039> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ouweneel, A.B.

Title: Cholesterol metabolism and hematopoiesis interaction in atherothrombosis

Issue Date: 2019-03-21



Nederlandse samenvatting

INTRODUCTIE

Hart- en vaatziekten zijn de meest voorkomende doodsoorzaak wereldwijd. De primaire onderliggende oorzaak van hart- en vaatziekten is atherosclerose. Atherosclerose is een chronische, multifactoriële ziekte, die wordt gekarakteriseerd door een ontstekingsreactie op cholesterol afzettingen in de arteriële vaatwand, wat resulteert in de vorming van een atherosclerotische plaque. Atherosclerose ontwikkelt zich voornamelijk asymptomatisch gedurende het leven. Ruptuur of erosie van een atherosclerotische plaque kan echter zorgen voor de vorming van een bloedprop die het bloedvat verstopt (atherotrombose). Atherotrombose is de primaire oorzaak van cardiovasculaire aandoeningen zoals een hartinfarct of beroerte.

De voornaamste risicofactoren voor het ontwikkelen van atherosclerose zijn defecten in het cholesterol metabolisme, zoals bijvoorbeeld het hebben van hypercholesterolemie. Deze factoren beïnvloeden echter niet alleen de ontwikkeling van een atherosclerotische plaque, maar beïnvloeden ook de productie van bloedcellen (hematopoëse), waaronder witte bloedcellen (leukopoëse) en de productie en karaktereigenschappen van bloedplaatjes (thrombopoëse), cellen die allen een belangrijke rol spelen in het ontstaan van atherotrombose. Aangezien hematopoëse voornamelijk plaatsvindt in het beenmerg compartiment, is het cholesterol metabolisme in het beenmerg een potentieel interessant aangrijpingspunt in het voorkomen van hart- en vaatziekten, en atherotrombose in het bijzonder. Dit proefschrift beschrijft nieuwe interacties tussen cholesterol metabolisme en de productie van immuuncellen en bloedplaatjes, en het effect van deze interactie op de ontwikkeling van atherosclerotische plaques en het ontstaan van atherotrombose.

NIEUWE INZICHTEN IN DE RELATIE TUSSEN CHOLESTEROL METABOLISME EN HEMATOPOËSE

Effecten van modulatie van het cholesterol metabolisme op megakaryopoëse en de productie van bloedplaatjes

Bloedplaatjes zijn kleine cellen in het bloed die snel reageren op verlies van de integriteit van het endotheel en de daarmee samenhangende blootstelling van bloed aan het onderliggende weefsel. Zodoende spelen zij een belangrijke rol in de ontwikkeling van atherotrombose. Veranderingen in de karakteristieke eigenschappen van bloedplaatjes, zoals de dichtheid en volume, zijn geassocieerd met een direct effect op het risico op acute hart- en vaatziekten.

Bloedplaatjes worden geproduceerd door megakaryocyten in het beenmerg. Dyslipidemie beïnvloedt het functioneren van megakaryocyten, en modulatie van

het cholesterol metabolisme in megakaryocyten kan daarom een potentieel aangrijpingspunt vormen voor het verminderen van het risico op atherotrombose. Eerdere studies hebben reeds aangetoond dat het verlies van de functie van de receptor voor hogedichtheidslipoproteïnen (HDL), scavenger receptor BI (SR-BI), in muizen resulteert in de ontwikkeling van trombocytopenie. Er is gesuggereerd dat dit wordt veroorzaakt door ophoping van vrij cholesterol in bloedplaatjes en een daarmee samenhangende versnelde klaring van bloedplaatjes. In hoofdstuk 3 van dit proefschrift is met behulp van zogenaamde SR-BI knockout muizen onderzocht of SR-BI deficiëntie mogelijk ook het megakaryopoëse proces en de productie van bloedplaatjes beïnvloedt. Het is gebleken dat de megakaryocyten in SR-BI knockout muizen een verhoogde concentratie vrij cholesterol hebben, wat is geassocieerd met kleine veranderingen in megakaryopoëse. De vorming van voorlopers van bloedplaatjes (proplatelets) was echter sterk verminderd in SR-BI knockout muizen, wat mogelijk deels kan verklaren waarom afwezigheid van SR-BI is geassocieerd met de ontwikkeling van trombocytopenie. Door middel van het uitvoeren van beenmerg transplantaties in muizen is aangetoond dat de effecten van SR-BI deficiëntie op megakaryopoëse en proplatelet formatie niet veroorzaakt worden door het ontbreken van SR-BI op specifiek de megakaryocyten, maar secundair zijn aan de SR-BI deficiëntie-geassocieerde verhoging van de concentraties vrij cholesterol in het bloed.

Eerder onderzoek heeft gesuggereerd dat het manipuleren van de efflux van cholesterol uit cellen ook invloed kan hebben op de productie van bloedplaatjes. In hoofdstuk 4 is daarom onderzocht of het genetisch verwijderen van de cholesterol transport eiwitten ABCA1 en ABCG1 een invloed zou hebben op de productie van bloedplaatjes. Het is gebleken dat inactivatie van de functie van zowel ABCA1 als ABCG1 geen effect heeft op megakaryopoëse. Het ontbreken van ABCA1 of ABCG1 bleek echter contrasterende effecten op het functioneren van de megakaryocyten en de productie van bloedplaatjes in het bijzonder te hebben. ABCA1 deficiëntie remt de productie van proplatelets, terwijl het ontbreken van ABCG1 juist een sterke verhoging van de proplatelet productie tot gevolg heeft. Ondanks dat onze eerdere studies in macrofagen hebben aangetoond dat afwezigheid van beide transporters een significant effect kan hebben op de intracellulaire cholesterol hoeveelheid, was de afwezigheid van beide eiwitten verassend genoeg niet geassocieerd met accumulatie van vrij cholesterol in de megakaryocyten. Deze resultaten suggereren dat ABCA1 en ABCG1 geen grote rol van betekenis spelen in het reguleren van de intracellulaire cholesterol concentratie in megakaryocyten, maar dat deze eiwitten mogelijk wel belangrijk zijn voor de regulatie van de laatste stappen in het productieproces van bloedplaatjes.

Deze nieuwe bevindingen onderstrepen het belang van cholesterol metabolisme in megakaryocyten voor de productie van bloedplaatjes. Meer onderzoek is nodig om te begrijpen hoe veranderingen in het cholesterol metabolisme de functie van megaka-

ryocyten en de productie van bloedplaatjes specifiek beïnvloedt. Daarnaast is het zeer interessant om meer inzicht te krijgen in de klinische relevantie van onze bevindingen in het kader van diagnose en mogelijke genezing van atherotrombose-gerelateerde aandoeningen.

Het effect van apolipoproteïne A1 deficiëntie op de productie van immuuncellen

In mensen is de plasma apolipoproteïne A1 (ApoA1) concentratie negatief gecorreleerd met het risico op de ontwikkeling van atherosclerotische plaques. ApoA1 is het meest voorkomende en belangrijkste eiwit op HDL deeltjes. Het eiwit wordt gemaakt in hepatocyten in de lever en enterocyten in de darm. Na uitscheiding door deze cellen gaat ApoA1 een interactie aan met ABCA1 om fosfolipiden en cholesterol te vergaren voor de vorming van HDL deeltjes. ApoA1 is ook essentieel voor de anti-inflammatoire eigenschappen van HDL. In lijn met deze laatste functie is ApoA1 deficiëntie geassocieerd met veranderingen in de functie van immuuncellen onder hypercholesterolemische condities. Het wordt verondersteld dat zowel de verstoring van de cholesterolopname door HDL als veranderingen in het functioneren van immuuncellen bijdragen aan het verhoogde risico voor atherosclerose geassocieerd met ApoA1 deficiëntie.

Het belangrijkste orgaan dat immuuncellen produceert is het beenmerg, waar de hematopoëtische stamcellen zich bevinden. Het is aangetoond dat ApoA1, naast een direct effect op volwassen immuuncellen, ook de deling van hematopoëtische stamcellen remt en de hematopoëse richting bepaalde celtypen kan dirigeren. Op deze manier kan ApoA1 een directe invloed uitoefenen op het aantal en type circulerende immuuncellen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat hypercholesterolemie ook het functioneren van hematopoëtische stamcellen kan beïnvloeden. Meer specifiek laten stamcellen in hypercholesterolemische muizen een verhoogde proliferatie snelheid zien. Dit wordt gedreven door lange-termijn veranderingen in de stamcellen, aangezien de hypercholesterolemie-geïnduceerde veranderingen in stamcelfunctie behouden blijven na beenmergtransplantatie. In het onderzoek beschreven in hoofdstuk 5 hebben we gepoogd, in een atherosclerotische context, de directe effecten van ApoA1 deficiëntie op circulerende immuuncellen los te koppelen van indirecte effecten op hun functioneren als gevolg van een effecten van de afwezigheid van ApoA1 op beenmergfunctie. Om dit te onderzoeken hebben we beenmerg van wild-type en ApoA1 knockout muizen getransplanteerd naar hypercholesterolemische lage-dichtheidslipoproteïne receptor (LDLr) knockout muizen met normale apoA1 concentratie in het bloed. Plasma cholesterolwaarden en de grootte van en collageen hoeveelheid in de atherosclerotische plaques was gelijk in ontvangers van wild-type en ApoA1 knockout beenmerg. Ondanks dat de atherosclerosegevoeligheid niet veranderd was, lieten LDLr knockout muizen getransplanteerd met ApoA1 knockout beenmerg wel lymphocytose zien als

gevolg van een sterke toename in het aantal circulerende CD4-positieve helper T cellen. Dit ging gepaard met een sterke toename in het totaal aantal cellen in de milt en een relatieve toename van het aantal naïeve T cellen in zowel de milt als de circulatie. Een toename in het gewicht van de thymus en de parallelle verhoging in relatieve thymus CCR9 genexpressie van de ApoA1 beenmerg ontvangers suggereerden dat de productie van T cellen in deze muizen verhoogd was. Verder onderzoek heeft aangetoond dat dit gedreven wordt door een verhoogd aantal hematopoëtische stamcellen en T cel voorlopers in het beenmerg van ApoA1 knockout muizen ten opzichte van wild-type muizen. ApoA1 deficiëntie beïnvloedt het beenmerg dus zodanig dat het de productie van naïeve T cellen door de thymus stimuleert. De resultaten van dit onderzoek ondersteunen de hypothese dat het effect van een specifieke interventie op beenmerg stamcellen een lange-termijn en transplanteerbaar effect kan hebben op de hematopoëse. Daarnaast heeft dit onderzoek nieuw bewijs geleverd dat het effect van ApoA1 deficiëntie op het beenmerg geen onderliggende oorzaak is van de verhoogde atherosclerotische plaque vorming die geassocieerd is met ApoA1 deficiëntie.

Remming van de productie van Proteïne C als nieuwe methode om atherotrombose in muizen te induceren

De hoge mortaliteit die geassocieerd is met hart- en vaatziekten is voornamelijk het resultaat van de vorming van een bloedprop op een geruptureerde of geërodeerde atherosclerotische plaque. Het begrijpen van moleculaire en cellulaire mechanismen die destabilisatie of erosie van atherosclerotische plaques veroorzaken is een belangrijk speerpunt van het huidige cardiovasculaire onderzoek. Ondanks vele jaren onderzoek naar de pathofysiologie van atherosclerose is het echter nog steeds zeer lastig te voorspellen welke plaques mogelijk gevaar geven op het ontstaan van atherotrombose. Zoals beschreven in hoofdstuk 6 wordt de voortgang van het wetenschappelijk onderzoek naar plaque destabilisatie, ruptuur en erosie sterk geremd door een gebrek aan geschikte muismodellen om het atherotromboseproces te bestuderen. Er zijn veel muismodellen beschikbaar voor het bestuderen van atherosclerose. Deze muismodellen ontwikkelen echter geen spontane atherotrombose. De exacte oorzaak van het ontbreken van atherotrombose in muizen is onbekend, maar mogelijk vormen verschillen tussen muizen en mensen in de samenstelling van het bloed de onderliggende oorzaak. De anticoagulatie activiteit is sterker in muizen dan in mensen. Het inhiberen van de anticoagulatie vormt daarom een mogelijke strategie om atherotrombose te induceren in muizen. Hoofdstuk 7 beschrijft een proof-of-principle studie die laat zien dat small interfering RNA (siRNA)-gemedieerde remming van het anticoagulatie-eiwit Proteïne C leidt tot spontane vorming van atherotrombose in het gebied van hart waar zich de aortakleppen bevinden in atherosclerotische apolipoproteïne E knockout muizen. Hoewel de atherotrombose incidentie laag was (14%) in deze experimentele setting, is dit wel de

eerste keer dat spontane atherotrombose in de aortakleppen kon worden aangetoond. In hoofdstuk 8 hebben we (1) onderzocht of verschillende karaktereigenschappen van de atherosclerotische plaques of specifieke factoren in de circulatie van invloed zijn op de gevoeligheid voor de ontwikkeling van atherotrombose in dit diersmodel en (2) geprobeerd atherotrombose te induceren op een tweede anatomische locatie, door middel van het plaatsen van een perivasculaire collar om de halsslagader. Spontane atherotrombose incidentie in deze studie was 23% in de aortakleppen en 2.6% in de halsslagader. Verhoging van de bloeddruk had op beide locaties geen invloed op de incidentie van atherotrombose. Atherosclerotische plaques die geassocieerd waren met een trombus hadden gemiddeld een lagere hoeveelheid collageen en macrofagen. Daarnaast hadden muizen met atherotrombose relatief meer bloedplaatjes in de circulatie. Bovendien kwam atherotrombose significant meer voor in de rechter coronaire sinus van de aortakleppen, wat suggereert dat mogelijk het stromingsprofiel van het bloed een rol speelt bij de ontwikkeling van atherotrombose.

Bloedplaatjes spelen een belangrijke rol bij atherotrombose ontwikkeling. Zoals hierboven beschreven hebben SR-BI knockout muizen minder bloedplaatjes. Echter de bloedplaatjes in SR-BI knockout circuleren wel in een geactiveerde staat. Dit laatste fenotype is geassocieerd met een hogere gevoeligheid voor schade-geïnduceerde arteriële trombose. Dit heeft geleid tot de hypothese dat modulatie van SR-BI functionaliteit mogelijk de incidentie van atherotrombose kan veranderen. Hoofdstuk 9 beschrijft het toepassen van het siRNA-gemedieerde remming van Proteïne C in wild-type en SR-BI knockout muizen na het voeren van een atherogeen dieet. Wild-type muizen op een atherogeen dieet ontwikkelden beginnende plaques. Echter, zoals verwacht waren deze beginnende plaques niet gevoelig voor de ontwikkeling van atherotrombose. Ondanks een reductie van 50% in de productie van Proteïne C, werd in wild-type muizen geen atherotrombose gevonden. SR-BI knockout muizen op een atherogeen dieet ontwikkelden wel geavanceerde plaques. Verassend genoeg werd echter ook geen atherotrombose aangetroffen in deze muizen. Uit analyse van de genexpressie in de levers van SR-BI knockout muizen bleek dat de gebruikte Proteïne C siRNA in deze experimentele groep niet de verwachte vermindering gaf, maar zelfs een verhoging van de Proteïne C productie veroorzaakte. Daarom kan uit deze studie geen conclusie worden getrokken wat betreft de vatbaarheid voor atherotrombose van SR-BI knockout muizen.

De studies beschreven in dit proefschrift, tezamen met het onderzoek gedaan door andere onderzoeksgroepen, laten zien dat er twee strategieën zijn om atherotrombose te induceren in muizen: plaque destabilisatie en inductie van hypercoagulatie van het bloed. Hoewel beide strategieën afzonderlijk atherotrombose kunnen induceren met een lage incidentie, zullen toekomstige inspanningen zich moeten richten op een combinatie van beide strategieën om een atherotrombose muismodel te creëren.

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Atherotrombose vormt een belangrijke doodsoorzaak wereldwijd. Atherotrombose is een complex proces, waarin atherosclerose ontwikkeling, plaque destabilisatie en de vorming van een arteriële trombus de belangrijkste aangrijpingspunten zijn om het ontstaansrisico te verlagen.

De studies beschreven in dit proefschrift onderstrepen dat modulatie van cholesterol metabolisme, en in het bijzonder HDL functionaliteit, niet alleen een drijvende kracht is achter de reeds bekende risicofactoren voor atherotrombose, zoals atherosclerose ontwikkeling, plaque (de-)stabiliteit, immuuncel functie, endotheel functie, coagulatie, en bloedplaatjes functie), maar dat HDL ook een effect heeft op de productie van immuuncellen en de functie van megakaryocyten. Als zodanig zijn verstoringen in cholesterol metabolisme betrokken bij alle onderliggende mechanismen die de ontwikkeling van atherotrombose beïnvloeden. Om het risico op atherotrombose effectief te kunnen verlagen is echter meer inzicht nodig in welk aspecten van het HDL metabolisme de meeste therapeutische potentie heeft. In het afgelopen decennium is de kennis over HDL, zowel de compositie als de functie, sterk gegroeid. Over de consequenties van veranderingen in compositie op de biologische activiteit van HDL is helaas nog steeds zeer weinig bekend. Meer kennis over de effecten van wijzigingen in de compositie van HDL op de daarmee samenhangende functionaliteit zal het therapeutische potentieel van HDL sterk vergroten. Bovendien zullen deze nieuwe inzichten bijdragen aan het ontrafelen van de onbekende factoren in de interactie tussen cholesterol metabolisme en de productie van immuuncellen en bloedplaatjes, zoals beschreven in dit proefschrift, en de effecten op atherosclerose en atherotrombose ontwikkeling. Vergroting van de kennis over de werking van HDL zal daarom, mijns inziens, een zeer belangrijk thema moeten blijven voor het cardiovasculaire onderzoeksveld.

