



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Modulation of estrogen signaling in hepatic and vascular tissue

Krom, Y.D.

Citation

Krom, Y. D. (2006, November 7). *Modulation of estrogen signaling in hepatic and vascular tissue*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4967>

Version: Corrected Publisher's Version

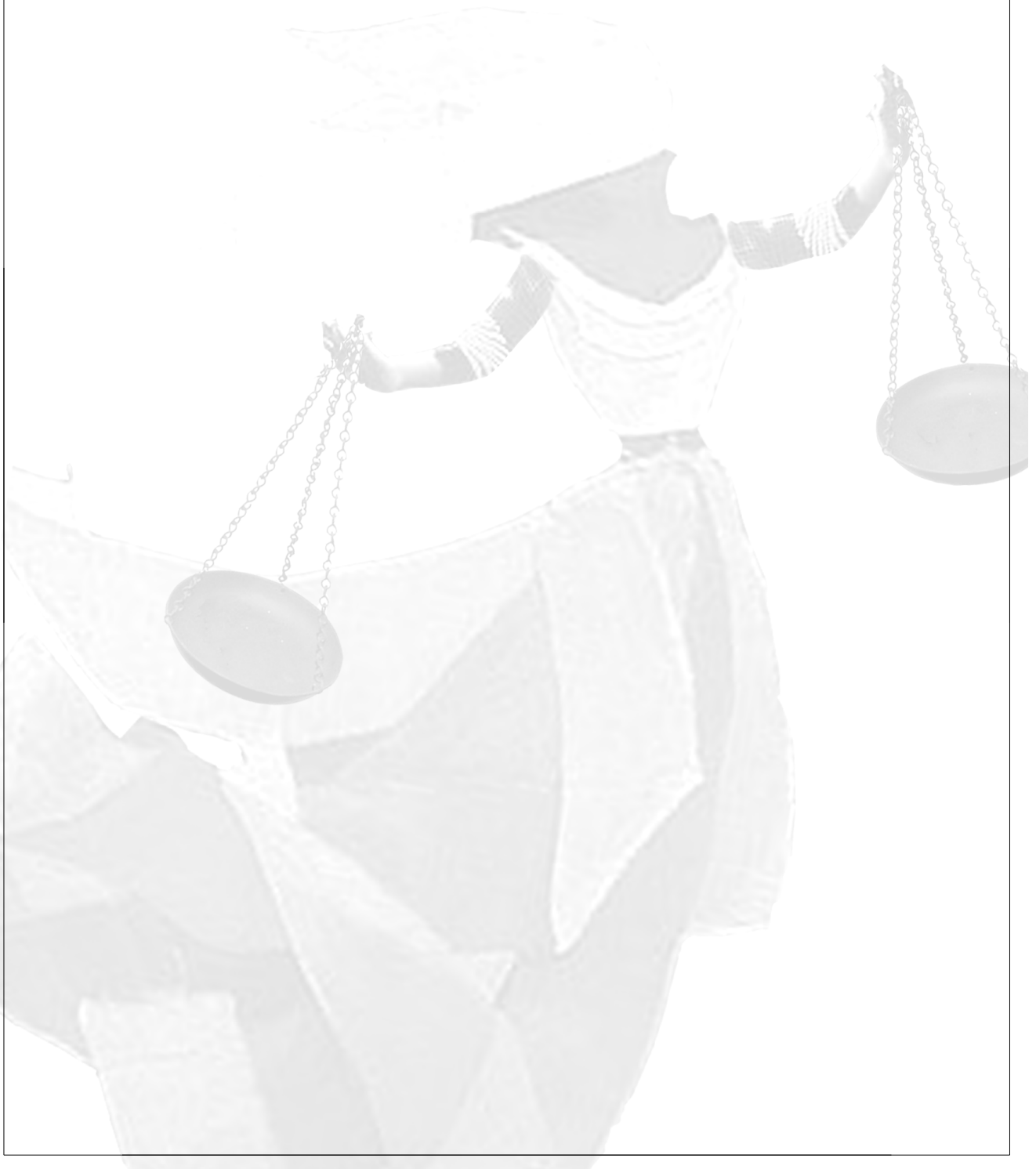
License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4967>

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

10.

Samenvatting



Samenvatting

Hart- en vaatziekten vormen de belangrijkste doodsoorzaak in de westerse wereld. Voor een groot deel is dit het gevolg van een sterke vernauwing van de bloedvaten (aderverkalking), bekend onder de term “atherosclerose”. Bij deze aandoening vormen zich zogenaamde plaques (opgehopen van cholesterol en cel materiaal) onder de beschermende laag van endotheelcellen aan de binnenkant van bloedvaten. De voornaamste factoren die de kans op het ontstaan van atherosclerose verhogen zijn weinig beweging, hoge bloeddruk, een hoge bloedsuiker spiegel en een hoog cholesterol gehalte.

Atherosclerose blijkt veel minder voor te komen in vrouwen voor de menopauze, in vergelijking met mannen van dezelfde leeftijd. Opmerkelijk is dat na de menopauze de incidentie van atherosclerose in vrouwen sterk stijgt. Deze stijging loopt parallel met metabole veranderingen, zoals gewichtsstijging, een verandering van de vetstofwisseling en verhoogde bloedsuikerspiegels. Kortom, na de menopauze ontstaat er een ongunstig risicofactor profiel. Deze observaties hebben tot de suggestie geleid dat oestradiol, het vrouwelijke sekshormoon, bescherming kan bieden tegen het ontstaan van atherosclerose.

Dierstudies hebben een direct bewijs geleverd voor de beschermende rol van oestradiol in het ontstaan van atherosclerose. In atherosclerose gevoelige muismodellen leidt toediening van oestradiol tot minder grote plaques [1-4]. Ondanks deze klaarblijkelijke positieve effecten moet men voorzichtig zijn met het gebruik van oestradiol als preventief geneesmiddel. Oestradiol kan namelijk ook nadelige processen activeren. Zo verhoogt het de kans op borstkanker, baarmoederkanker en galstenen. Bovendien leveren humane studies met betrekking tot het effect van toediening van extra oestradiol na de menopauze tegenstrijdige resultaten op [5-8]. Kortom, de uiteindelijke effecten van oestradiol op de vaatwand is complex en nog niet helemaal helder.

Om de nadelige effecten te vermijden en de voordelige effecten van oestradiol uit te buiten, is het van belang om precies te weten wat oestradiol wel en niet doet én in welk weefsel. De organen die in dit proefschrift de aandacht hebben gekregen, zijn vaatwand en lever. De vaatwand; door zijn directe betrokkenheid bij de ontwikkeling van atherosclerose. De lever; omdat dit orgaan een centrale rol speelt bij het op peil houden van de bloedsuikerspiegel en vet stofwisseling. En zoals hierboven beschreven, wanneer de bloedsuikerspiegel en vet stofwisseling verstoord zijn vormt dit een risico voor het ontstaan van atherosclerose. Beide organen, lever en vaatwand zijn ook potentiële doelwit organen van

oestradiol. Zij kunnen namelijk het in het bloed circulerende oestradiol herkennen doordat zij een specifieke receptor, de oestradiol receptor (ER) bevatten. De ER is een receptor die aanwezig is in de cel, welke na binding van oestradiol geactiveerd wordt. Een geactiveerde ER kan vele processen in de cel beïnvloeden. Tot dusver zijn er twee verschillende ER types bekend, ER α en ER β . Dit maakt de beoogde effecten van oestradiol complex. ER α en ER β kunnen namelijk verschillende processen activeren, soms zelfs leidend tot tegenovergestelde effecten. Daarom is het van belang om de ER α en ER β routes van elkaar te kunnen onderscheiden. Zeker in het geval wanneer beide receptoren aanwezig zijn, zal het specifiek moduleren van ofwel ER α ofwel ER β meer inzicht geven dan wanneer je oestradiol niveaus verandert en dus beide aanzet.

In **hoofdstuk 2** ^{t/m} **4** van dit proefschrift werd onderzocht of de lever een belangrijke rol speelt bij de effecten van oestradiol op de lipiden en glucose huishouding. Allereerst, is er in **hoofdstuk 2** een nieuwe techniek opgezet, genaamd 'RNA interference' (RNAi) om de ER α signaleringsroute uit te zetten. Deze techniek berust op het feit dat kleine, sequentie specifieke moleculen, short hairpin (sh)RNAs genaamd, binden aan een homologe sequentie om deze vervolgens af te breken. In verschillende cellijnen tonen we aan dat onze shRNAs gemaakt tegen de muis ER α (shER α) werkzaam zijn, ze verminderen de ER α activiteit met 80%. Vervolgens is dit shER α construct in een adenovirale (Ad) vector gezet. Deze Ad vector dient louter als transport vehikel om in de cel zijn bagage (lees shER α moleculen) af te leveren. Een bijkomend voordeel is dat Ad vectoren in de muis erg efficiënt en exclusief lever cellen infecteren, een van onze doelwit organen. Na injectie van Ad.shER α , laten we zien dat ER α niveaus en activiteit in de lever significant lager zijn. Kortom we laten zien dat Ad vectoren effectief zijn om shER α moleculen naar de lever te brengen, om daar het ER α gen af te breken.

De studie beschreven in **hoofdstuk 3** had ten doel om de functie van ER α in lever te bestuderen wat betreft het reguleren van lipid parameters. Met behulp van Ad.shER α was 60% van de ER α transcripten in de lever afgebroken. Desondanks waren de lipid parameters in bloed en lever en ook de glucose waardes niet veranderd. Deze resultaten laten zien dat ER α niveaus in de lever niet bepalend zijn om lipid parameters te reguleren.

Oestradiol lijkt ook betrokken te zijn bij glucose metabolisme en insuline gevoeligheid. Na de menopauze zijn er meer vrouwen die ongevoelig zijn voor insuline. Toevoeging van oestradiol lijkt geassocieerd met het verbeteren van insuline gevoeligheid. Maar, omdat de voordelige effecten van oestradiol op insuline gevoeligheid gepaard gaan met

een verandering in lichaamsgewicht, is de rol van oestradiol op het reguleren van de glucose huishouding onduidelijk. Om meer inzicht te krijgen in de directe capaciteiten van oestradiol in glucose metabolisme ten behoeve van insuline gevoeligheid, hebben wij in **Hoofdstuk 4** de onmiddellijke effecten van oestradiol op de lever insuline gevoeligheid bepaald. Muizen die ongevoelig zijn voor insuline zijn behandeld met oestradiol. Vervolgens is zes uur na oestradiol toediening de insuline gevoeligheid bepaald met behulp van een gevoelige techniek. Onze data laten zien dat in de muizen die met oestradiol waren behandeld de glucose productie sterk geremd wordt gedurende de hoog insuline conditie. Deze data impliceren een belangrijke rol voor oestradiol in het verbeteren van de insuline gevoeligheid van de lever.

Kort samengevat, deze studies waarin de oestradiol signalering route kort wordt veranderd, laten zien dat de lever een belangrijke rol speelt in het glucose metabolisme, maar niet in het lipid metabolisme. De voordelige effecten, zoals verminderde zwaarlijvigheid (obesitas) en ophoping van lipiden in lever en in het plasma die gevonden zijn na een langdurende oestradiol behandeling [9-12], zullen hoogst waarschijnlijk geïnduceerd zijn door effecten in andere organen en weefsels. Het zou ook goed mogelijk kunnen zijn dat de veranderingen in de lipid waarden een indirect gevolg zijn van de al snel door oestradiol geïnduceerde veranderingen op insuline gevoeligheid. Het is immers bekend dat regulatie van vet en glucose metabolisme met elkaar geassocieerd zijn.

Naast de voordelige effecten die oestradiol blijkt te hebben op het metabolisme, zijn er ook aanwijzingen die suggereren dat oestradiol een positieve rol speelt in de vaatwand. Zowel ER α als ER β zijn aanwezig in de cellen die de vaatwand bekleedt [13-18]. Maar er zijn nog veel onduidelijkheden over de effecten van oestradiol op de vaatwand. Oorzaak hiervoor is het feit dat de effecten complexer zijn dan in de lever. Je hebt in de vaatwand namelijk te maken met verschillende cel types die zowel ER α als ER β heeft, terwijl de lever alleen ER α bevat. Bovendien zijn er geen *in vivo* (muis) modellen beschikbaar waarin lokaal ER α en ER β gemoduleerd zijn. Met de studies uitgevoerd in hoofdstukken **5** t/m **8**, wilden we meer inzicht krijgen in de rol van ER α en ER β in de vaatwand. Om dit doel te bereiken hebben we constructen gemaakt waarmee de ER specifiek en op een fysiologische manier in de vaatwand kan worden veranderd.

Studies op geïsoleerde cellen (zogenaamde in vitro studies), zijn de makkelijkste manier om weefsel specifieke effecten te bestuderen. Het introduceren van genetisch materiaal zoals shER α of de ER zelf, is de manier om specifiek de functie van dit gen te onderzoeken. Helaas zijn de meeste vasculaire cellen moeilijk te transfecteren en infecteren. In **hoofdstuk 5** hebben we dit probleem aangepakt door de natuurlijke voorkeur van Ad vectoren te veranderen. Normaal gesproken komen Ad vectoren efficiënt de cel in doordat zij de coxsackie virus Ad receptor (CAR) herkennen die op het oppervlak van de desbetreffende cel zit. Helaas hebben vasculaire cellen vrijwel geen CAR op hun oppervlak. Daardoor zijn zij dus moeilijk te transfecteren. Om Ad toch als transport vehikel te kunnen gebruiken hebben we een ‘dubbelzijdig plakband’ construct gemaakt. Dit construct bestaat uit het Ad bindende domein van CAR aan de ene kant, en aan de andere kant een RGD peptide. Dit resulteert in een targeting construct wat de Ad vector bindt en affiniteit heeft voor integrines. We laten zien dat dit “targeting” construct in staat is om transfectie efficiëntie naar zowel endotheel als vasculaire spier cellen aanzienlijk te verhogen. Omdat dit targeting construct efficiënt werkt en te gebruiken is voor vrijwel elke willekeurige Ad vector, is dit systeem bijzonder geschikt om de functie van een gen in vasculaire cellen in vitro te onderzoeken.

Vervolgens hebben we bepaald of ons getarget virus ook toepasbaar is in een in vivo situatie. Ons doelwit orgaan was de halsslagader (carotis arterie) van de muis (**hoofdstuk 6**). Dit is een stuk moeilijker. Allereerst wordt transport naar de vaatwand belemmerd doordat Ad vectoren normaliter door de lever worden weg gevangen. Met ons construct hebben we deze eerste barrière overwonnen. Ad vectoren die gebonden waren aan CAR-cRGD werden niet opgenomen door de lever. Ondanks deze lever “de-targeting”, zagen we geen opname in de normale of zelfs beschadigde vaatwand. Dit kan verklaard kunnen worden doordat de Ad vector erg snel uit de bloedbaan was opgeruimd. Bovendien ligt de halsslagader niet op de meest toegankelijke positie en vormt het onbeschadigde niet-delende endotheel wellicht een ontoegankelijke barrière. Om deze barrières te omzeilen hebben we de Ad vector +/- cRGD, voor 10 minuten lokaal in de beschadigde halsslagader gebracht. Maar zelfs onder deze condities was het niet mogelijk om de genen de vaatwand in te transporteren. Mogelijkerwijs is het partikel te groot, en/of komt de dynamiek van integrine expressie niet overeen met de korte tijdsduur dat het virus aanwezig is. Deze studie samen met een aantal andere studies waarin het niet gelukt is om Ad vectoren naar vaatcellen in het levende dier te sturen, geeft aan dat ondanks het feit dat we veel van Ad vectoren weten, er toch nog essentiële kennis mist betreffende de regulatie van Ad opname in vivo.

Hoofdstuk 5 & 6 samenvattend, laten we zien dat gen overdracht naar vaatcellen via Ad vectoren in vitro goed mogelijk is. Alleen zijn er nog onbekende factoren in de in vivo situatie die gen overdracht voorkomen.

In **hoofdstuk 7**, hebben we het effect van oestradiol op de expressie van adhesie moleculen in endotheel cellen geanalyseerd. Een verhoogde aanwezigheid van leukocyt adhesie moleculen op het endotheel is een van de eerste reacties van het vat op schade. Deze adhesie moleculen zorgen ervoor dat ontstekingscellen naar het beschadigde gebied komen. Uit onze studie blijkt dat wanneer je oestradiol toedient voordat de expressie van adhesie factoren wordt geïnduceerd, deze expressie significant geremd wordt. Dus, oestradiol lijkt de ontstekingsreactie tegen te gaan. Verder hebben we onderzocht wat de rol van ER α niveaus is op dit oestradiol geïnduceerde effect. Het rationele voor deze studie is het feit dat ER α minder aanwezig is in een plaque in vergelijking tot 'normale' vaten en vaten waarin aderverkalking nog in een vroege fase is [16,19,20]. De vraag is of de actie van oestradiol verminderd is doordat er minder ER α aanwezig is. In de endotheel cellen hebben we de ER α niveaus en activiteit met 60% verminderd. Maar dit leidde niet tot een verandering in de respons op oestradiol. Oestradiol zorgde nog steeds voor een verminderde expressie van adhesie moleculen. Echter, wanneer we de ER α activiteit geheel uitschakelden, werd het effect van oestradiol wel geheel geblokkeerd. Deze data laten zien dat ER α noodzakelijk is voor het ontstekingsremmende effect van oestradiol, maar dat de hoeveelheid van de ER α niveaus geen bepalende factor is.

In vivo zijn zowel ER α als ER β aanwezig in de vaatwand. Omdat deze verschillende effecten kunnen induceren, zouden de uiteenopende resultaten na oestradiol behandeling verklaard kunnen worden door een verschil in hoeveelheid en balans tussen ER α en ER β . In **hoofdstuk 8**, hebben we de rol van beide receptoren in de vaatwand bestudeerd. Het proces waar we ons op hebben gericht heet neointima vorming. Neointima vorming wordt gekarakteriseerd door een continue deling van vasculaire gladde spiercellen die een vernauwing van het bloedvat tot gevolg heeft. In hoofdstuk 8, hebben we neointima geïnduceerd door om het bloedvat in het been van de muis (femoral arterie) een kleine cilindervormige plastic buis (cuff) te plaatsen. Daarbij is de cuff zo ontwikkeld dat je het kan vullen met geneesmiddelen die vervolgens ter plekke en gelijktijdig met het induceren van de neointima in de vaatwand vrijkomen. Op deze manier kun je testen of de geneesmiddelen

lokaal de groei van gladde spiercellen kan remmen. Om specifiek de rol van ER α en ER β op neointima vorming te onderzoeken hebben we de cuffs geladen met oestradiol of ER α en ER β specifieke activatoren. Onze data laten zien dat ER α en ER β andere, maar niet per se totaal tegenovergestelde routes induceren. De meest interessante bevinding is dat ER β aanwezig in de vaatwand een beschermende rol kan bieden tegen het ontstaan van neointima. Deze beschermende rol van ER β was dusver onbekend. Dit bevestigt dat onderzoek naar weefsel en ER α en ER β specifieke effecten van belang is.

Samengevat, kunnen we concluderen dat het nuttig is om modellen en constructen te creëren die het mogelijk maken om weefsel en ER specifieke effecten te bestuderen. Tot dusver hebben wij aangetoond dat ER α in de lever geen sterke rol speelt in het reguleren van lipid parameters, maar wel in het reguleren van glucose productie. In de vaatwand lijkt het erop dat naast ER α ook ER β neointima vorming tegen kan gaan.

References

1. Bourassa PA, Milos PM, Gaynor BJ, Breslow JL, Aiello RJ: **Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 10022-10027.
2. Elhage R, Bayard F, Richard V, Holvoet P, Duverger N, Fievet C, Arnal JF: **Prevention of fatty streak formation of 17beta-estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice.** *Circulation* 1997, **96**: 3048-3052.
3. Haarbo J, Leth-Espensen P, Stender S, Christiansen C: **Estrogen monotherapy and combined estrogen-progestogen replacement therapy attenuate aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol-fed rabbits.** *J Clin Invest* 1991, **87**: 1274-1279.
4. Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, Banka CL: **Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice.** *J Lipid Res* 1999, **40**: 893-900.
5. Barrett-Connor E, Bush TL: **Estrogen and coronary heart disease in women.** *JAMA* 1991, **265**: 1861-1867.
6. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J: **Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.** *JAMA* 2002, **288**: 321-333.
7. Roussel AM, Bureau I, Favier M, Polansky MM, Bryden NA, Anderson RA: **Beneficial effects of hormonal replacement therapy on chromium status and glucose and lipid metabolism in postmenopausal women.** *Maturitas* 2002, **42**: 63-69.

8. Waters DD, Alderman EL, Hsia J, Howard BV, Cobb FR, Rogers WJ, Ouyang P, Thompson P, Tardif JC, Higginson L, Bittner V, Steffes M, Gordon DJ, Proschan M, Younes N, Verter JI: **Effects of hormone replacement therapy and antioxidant vitamin supplements on coronary atherosclerosis in postmenopausal women: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2002, **288**: 2432-2440.
9. Erberich LC, Alcantara VM, Picheth G, Scartezini M: **Hormone replacement therapy in postmenopausal women and its effects on plasma lipid levels.** *Clin Chem Lab Med* 2002, **40**: 446-451.
10. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS: **Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**: 12729-12734.
11. Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Misso ML, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER: **Aromatase-deficient (ArKO) mice accumulate excess adipose tissue.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001, **79**: 3-9.
12. Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, Vidal O, Bohlooly M, Rudling M, Lindberg MK, Warner M, Angelin B, Gustafsson JA: **Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **278**: 640-645.
13. Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Jr., Lubahn DB, O'Donnell TF, Jr., Korach KS, Mendelsohn ME: **Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice.** *Nat Med* 1997, **3**: 545-548.
14. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME: **Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor.** *Circulation* 1994, **89**: 1943-1950.
15. Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW: **Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells.** *Circulation* 1996, **94**: 1402-1407.
16. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM: **Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women.** *Circulation* 1994, **89**: 1501-1510.
17. Register TC, Adams MR: **Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998, **64**: 187-191.
18. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE: **Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function.** *Circulation* 1996, **94**: 727-733.
19. Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, Tazawa C, Senzaki K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H: **Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens.** *Mol Cell Endocrinol* 2004, **219**: 17-26.
20. Wilson ME, Rosewell KL, Kashon ML, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Wise PM: **Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain.** *Mech Ageing Dev* 2002, **123**: 593-601.