



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel pathways in cholesterol metabolism to combat cardiometabolic diseases

Zhou, E.

Citation

Zhou, E. (2021, April 28). *Novel pathways in cholesterol metabolism to combat cardiometabolic diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3161375>

Version: 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/1887/3161375>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/3161375> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhou, E.

Title: Novel pathways in cholesterol metabolism to combat cardiometabolic diseases

Issue date: 2021-04-28

Samenvatting

Hart- en vaatziekten die ontstaan door slagaderverkalking, en niet-alcoholische leververvetting (NAFLD) dat kan leiden tot niet-alcoholische leverontsteking (NASH), zijn beide zogenaamde cardiometabole ziekten. Hoewel hart- en vaatziekten wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak vormen, kunnen de huidige geneesmiddelen slechts 25-45% van de klinische events zoals hartinfarcten en beroertes voorkomen. NAFLD/NASH is wereldwijd één van de meest voorkomende leverziekten, waarvoor goedgekeurde medicatie zelfs nog niet voorhanden is. Omdat verhoogd cholesterol en ontsteking beide risicofactoren zijn voor zowel hart- en vaatziekten als NAFLD/NASH, zijn nieuwe therapeutische strategieën om cholesterol te verlagen en ontsteking tegen te gaan noodzakelijk. Daarom hadden de studies die beschreven zijn in dit proefschrift als doel om meer inzicht te verkrijgen in nieuwe aanpakken om de cholesterolstofwisseling te verbeteren en ontstekingsprocessen te voorkomen, door de therapeutische mogelijkheden te onderzoeken van zowel bruin vet activatie als enkele transcriptiefactoren die bij beide processen betrokken zijn.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie over de cholesterolstofwisseling en de regulatie ervan door transcriptiefactoren zoals de *liver X receptor* (LXR) en de *farnesoid X receptor* (FXR). Tevens wordt de rol van verhoogde cholesterolniveaus in het ontstaan van hart- en vaatziekten en NAFLD/NASH uitgelegd, en worden de huidige therapeutische strategieën om deze ziekten aan te pakken en hiaten in onze kennis daarvan uitgelegd. Tenslotte worden bruin vet en transcriptiefactoren als veelbelovende therapeutische targets voor de behandeling van deze cardiometabole ziekten geïntroduceerd.

Eerdere studies van onze onderzoeksgroep met vrouwelijke *APOE*3-Leiden.CETP* (*E3L.CETP*) muizen, een goed gekarakteriseerd translationeel model voor menselijke cardiometabole ziekten, hebben aangetoond dat activatie van bruin vet leidt tot lipoproteïne lipase (LPL)-gemedieerde opname van vetzuren vanuit triglyceridenrijke lipoproteïnen (TRL) zoals het zeer lage-dichtheidslipoproteïne (VLDL), deeltjes die vetten en cholesterol in het bloed transporteren. Hierdoor worden TRL ontdaan van triglyceriden en relatief verrijkt met cholesterol, en vervolgens opgenomen door de lever na herkenning van het apoE in hun schil door de lage-dichtheidslipoproteïne receptor (LDLR) dat tot expressie wordt gebracht door hepatocyten in de lever. Tijdens dit proces wordt tevens een teveel aan schilcomponenten overgedragen aan het hoge-dichtheidslipoproteïne (HDL), wat leidt tot verhoging van HDL in de bloedsomloop. Als gevolg verlaagt activatie van bruin vet indirect het cholesterol door opname van TRL overblijfselen ('remnants') door de lever via de LDLR en verhoogt het ook de opname van cholesterol vanuit HDL door de lever via *scavenger receptor class B type 1* (SRB1). De opname van cholesterol uit de bloedsomloop door lever via zowel LDLR als SRB1 beschermt tegen ophoping van cholesterol in de wand van bloedvaten, en dus tegen slagaderverkalking.

Omdat activatie van bruin vet dus de LPL-afhankelijke lipolytische omzetting TRL stimuleert en daarmee de vorming van TRL remnants stimuleert, verwachtten wij dat bruin vet activatie het therapeutische effect van remming van het *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9) kan verbeteren, een relatief nieuwe strategie om cholesterol te verlagen en slagaderverkalking te remmen door de afbraak van LDLR in de lever te voorkomen en daarmee de opname van cholesterol uit het bloed te bevorderen. Daarom was het doel van de studies die beschreven staan in **Hoofdstuk 2** te onderzoeken of versnelde omzetting van VLDL door bruin vetactivatie (V)LDL-cholesterol verder kan verlagen en daarmee slagaderverkalking verder kan remmen dan door PCSK9 remming alleen. Hiertoe werden vrouwelijke *E3L.CETP* muizen behandeld met of zonder Alirocumab, een antilichaam gericht tegen PCSK9. Na twee

weken werden beide groepen muizen daarnaast behandeld met of zonder CL316,243, een selectieve agonist van de β 3-adrenerge receptor (β 3-AR) die bruin vet activeert. Inderdaad bleek de combinatie van bruin vet activatie en PCSK9 remming (V)LDL-cholesterol effectiever te verlagen dan alleen PCSK9 remming, wat kon worden verklaard door versnelde opname van VLDL-cholesterol door de lever. Tevens leidde gecombineerde behandeling tot meer overdracht van fosfolipiden vanuit de schil van VLDL naar HDL dan PCSK9 remming alleen, wat samenging met verhoging van het HDL-cholesterol en een verhoogde capaciteit van HDL om cholesterol vanuit cholesterolrijke cellen op te nemen. Als gevolg hiervan bleek gecombineerde behandeling zeer effectief om slagaderverkalking tegen te gaan. Samengevat verhoogt gelijktijdige activatie van bruin vet door β 3-AR agonisme het effect van PCSK9 remming op de cholesterolstofwisseling, waarmee de ontwikkeling van slagaderverkalking in het hart verder leek te worden verlaagd. De bevindingen die gepresenteerd worden in dit hoofdstuk tonen dus aan dat activatie van bruin vet het therapeutisch effect van PCSK9 met betrekking tot verlaging van het cholesterolniveau kan verbeteren.

Zoals hierboven uiteengezet was onze verwachting dat naast de LDLR, de SRB1 in de lever ook kan bijdragen aan de beschermende effecten van bruin vet activatie op slagaderverkalking door een rol te spelen in het reverse cholesterol transport. Om de specifieke rol van SRB1 in de beschermde effecten van bruin vet activatie te onderzoeken hebben we in **Hoofdstuk 3** gebruik gemaakt van een gemodificeerd verkoudheidsvirus dat in staat is om specifiek in de lever de expressie van SRB1 te verlagen in vrouwelijke *E3L.CETP* muizen terwijl zij werden behandeld met en zonder CL316,243. Tegen onze verwachting in bleek verlaging van de SRB1 expressie in de lever positief bij te dragen aan de effecten van β 3-AR agonisme op slagaderverkalking. Verlaging van de SRB1 expressie in de lever bleek namelijk niet alleen het HDL-cholesterol te verhogen, maar ook triglyceriden en VLDL niveaus in het bloed te verlagen, wat de verdere verlaging van slagaderverkalking kan verklaren. Mechanistische studies lieten zien dat dit het gevolg was van versnelde lipolytische omzetting van VLDL, gevolgd door versnelde opname door de lever, door de overdracht van schilcomponenten van VLDL naar HDL te faciliteren. Als we deze resultaten samennemen, dan kunnen we concluderen dat verlaging van de SRB1 expressie in de lever, tenminste in een humaan relevant muismodel met een intacte ApoE-LDLR as, slagaderverkalking in het hart verlaagt, en het beschermende effect van bruin vet activatie op slagaderverkalking zelfs verbetert, wat verklaard kan worden door versnelling van de lipolytische omzetting van VLDL met versnelde opname door de lever tot gevolg. De resultaten die beschreven staan in dit hoofdstuk laten dus zien dat activatie van bruin vet ook een effectieve strategie kan zijn om hart- en vaatziekten tegen te gaan in personen bij wie SRB1 slecht functioneert.

Activatie van bruin vet leidt dus tot een sterke toename van de flux van cholesterol vanuit TRL remnants en HDL naar de lever, en het was al bekend dit gekoppeld is aan een hogere omzetting van cholesterol in de lever tot galzuren die vervolgens via de gal naar de dunne darm worden geleid. Na kortdurende activatie van bruin vet wordt een aanzienlijk deel van deze galzuren uitgescheiden via de feces en ontsnapt op die manier aan de zogenaamde enterohepatische circulatie waarbij galzuren weer worden geabsorbeerd en via de bloedsomloop de lever bereiken. Dit verklaart waarom bruin vet activatie het revers cholesterol transport doet toenemen. In **Hoofdstuk 4** toonden we echter aan dat langdurende activatie van bruin vet door β 3-AR agonisme de uitscheiding van galzuren in de feces verlaagt, wat samenging met een aanzienlijke verhoging van galzuren in het bloed, accumulatie van cholesterol in de lever en een verlaging van de expressie van genen die betrokken zijn bij de vorming van galzuren in de lever. Onze hypothese was dat deze effecten verklaard kunnen worden door een sterk gestimuleerde enterohepatische circulatie van galzuren met

een negatieve terugkoppeling op de galzuursynthese in de lever tot gevolg waardoor het cholesterol dat door de lever wordt opgenomen niet meer kan worden verwerkt tot galzuren en dus ophoopt. Daarom onderzochten we vervolgens het gecombineerde effect van remming van de galzuurreabsorptie vanuit de darm met bruin vet activatie op de cholesterolstofwisseling en slagaderverkalking. Hiertoe werden vrouwelijke *E3L.CETP* muizen weer behandeld met de β 3-AR agonist CL316,243 om bruin vet te activeren, maar dan met of zonder de galzuurbinder Colesevelam om de galzuurreabsorptie vanuit de darm te voorkomen. Gelijktijdige behandeling met Colesevelam verhoogde de excretie van galzuren in de feces, normaliseerde de galzuurconcentratie in het bloed en normaliseerde het cholesterolniveau van de lever. Daarnaast leidde gelijktijdige behandeling van de galzuurbinder met β 3-AR agonisme, vergeleken met alleen β 3-AR agonisme, tot verdere cholesterolverlaging, een trend tot verdere verlaging van slagaderverkalking, en verhoging van het aantal kleppen zonder lesies in het hart. Samengenomen suggereren de gegevens uit dit Hoofdstuk dat combinatie van bruin vet activatie met galzuurbinding, dat al in de kliniek wordt toegepast voor cholesterolverlaging, een veelbelovende nieuwe therapie is om cholesterol verder te verlagen en cardiovasculaire ziekten verder terug te dringen.

Naast activatie van bruin vet richtten wij ons ook op de mogelijke therapeutische toepassing van de transcriptiefactoren LXR en FXR om de cardiometabole gezondheid te verbeteren. Omdat LXR een sleutelrol speelt bij de stofwisseling én ontsteking, staat LXR in de schijnwerpers als therapeutisch target voor de behandeling van cardiometabole ziekten. Ongewenste bijwerkingen van farmacologische LXR activatie, zoals verhoging van triglyceriden en een sterke verlaging van neutrofiële granulocyten, ook wel neutropenie genoemd, hebben tot dusver de klinische toepassing van LXR als target bemoeilijkt. De sterol desmosterol, dat door het enzym Δ 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24) wordt omgezet in cholesterol, is een endogeen LXR ligand dat de expressie van genen die betrokken zijn bij de triglyceridenproductie niet negatief beïnvloedt. In theorie is het verhogen van endogeen desmosterol door het remmen van DHCR24 dus een veelbelovende strategie om LXR-afhankelijke transcriptieprogramma's te activeren en zodoende hart- en vaatziekten en NAFLD/NASH te bestrijden. In **Hoofdstuk 5** onderzochten we eerst de mogelijkheid om door remming van DHCR24 ontsteking tegen te gaan, door gebruik te maken van SH42, een zelf ontworpen potente en selectieve remmer van DHCR24. We konden aantonen dat SH42 in staat was LXR in macrofagen te activeren, niet door direct aan LXR te binden en afhankelijk van de endogene synthese van cholesterol, en zonder de expressie te beïnvloeden van genen die betrokken zijn bij de triglyceridensynthese. DHCR24 remming door SH42 verhoogde desmosterol in het bloed dat gepaard ging met minder ontsteking, en verlaagde de influx van ontstekingscellen in een muismodel voor buikholteontsteking. Ook verhoogde SH42 de synthese van meervoudig onverzadigde vetzuren en beschermende vetmediatoren. Gebaseerd op deze bevindingen denken wij een conceptueel nieuwe strategie in handen te hebben om indirect LXR te activeren door desmosterol te verhogen via remming van DHCR24. We verwachten dat een dergelijke strategie ingezet kan worden in de kliniek voor de behandeling van zowel ontstekings- als cardiometabole ziekten, zonder te leiden tot een ongewenste hypertriglyceridemie.

Om die reden onderzochten we met studies die beschreven staan in **Hoofdstuk 6** of DHCR24 remming een therapeutische strategie kan zijn om LXR te activeren als behandeling van NAFLD, een metabole ontstekingsziekte van de lever. Hiertoe werden mannelijke *E3L.CETP* muizen gevoerd met een vet- en cholesterolrijk dieet dat leidt tot de ontwikkeling van menselijke NAFLD/NASH karakteristieken terwijl ze behandeld werden met of zonder SH42. Na acht weken behandeling konden we aantonen dat behandeling met SH42 de hoeveelheid

desmosterol in de lever en in het bloed aanzienlijk verhoogde. Daarnaast verlaagde SH42 de hoeveelheid vet in de lever, terwijl SH42 in het bloed zowel vetzuren als cholesterol verlaagde. SH42 wist ook leverontsteking te voorkomen, wat bleek uit verminderde activatie van Kupffercellen (levermacrofagen) en verminderde infiltratie van de voorlopers van macrofagen (monocyten) vanuit het bloed. De gunstige effecten van SH42 op vet en ontsteking in de lever werden geheel teniet gedaan in afwezigheid van LXR α . Vanuit deze gegevens concluderen wij dat remming van DHCR24 met SH42 tot een toename leidt van desmosterol dat leververvetting en leverontsteking geheel afhankelijk van LXR α kan voorkomen, en zonder hypertriglyceridemie te veroorzaken. Wij anticiperen dan ook dat farmacologische DHCR24 remming een nieuwe therapeutische strategie kan zijn voor de behandeling van NAFLD in de kliniek. Als uit toekomstige onderzoek blijkt dat SH42 ook in staat is om de ontwikkeling van atherosclerose tegen te gaan, dan zou SH42 een doorbraak kunnen betekenen voor de behandeling van cardiometabole ziekten door ontstekingsprocessen in macrofagen te voorkomen, wat een groot voordeel zou kunnen opleveren bovenop de huidige strategieën die zich vooral richten op cholesterolverlaging.

Naast LXR vormt ook de intracellulaire galzuurreceptor FXR een veelbelovend therapeutisch target voor de behandeling van cardiometabole ziekten. Omdat de effecten van farmacologische modulatie van galzuursignalering en stofwisseling op dyslipidemie nog onvoldoende opgehelderd waren, hebben we in **Hoofdstuk 7** de effecten van FXR activatie op diverse aspecten van metabole gezondheid onderzocht. Hiertoe werden mannelijke *E3L.CETP* muizen gedurende 6 weken een Westers dieet gevoerd om metabool syndroom te ontwikkelen waarna ze gedurende 4 weken behandeld werden met de niet-steroïde FXR agonist PX20606. Behandeling met PX20606 verlaagde de circulerende triglyceriden- en cholesterolniveaus, vooral door verlaging van ApoB-bevattende lipoproteïnen. Mechanistische studies toonden aan dat PX20606 leidde tot een meer hydrofiele galzuurpool, wat de cholesterolabsorptie vanuit de darm verlaagde en daarmee de cholesterol excretie in de feces verhoogde. Tevens verhoogde PX20606 behandeling de ApoC2/ApoB ratio in de circulatie, wat versnelde LPL-gemedieerde lipolyse van VLDL suggereert. Deze gezamenlijke studies tonen aan dat FXR stimulatie de cholesterol excretie in de feces sterk stimuleert en dyslipidemie corrigeert. Hoewel we voorzichtig moeten zijn met het extrapoleren van deze bevindingen naar mensen, vooral vanwege soortverschillen met betrekking tot de galzuurstofwisseling, zou farmacologische modulatie van de galzuurstofwisseling door FXR activatie dus mogelijk therapeutisch toegepast kunnen worden voor de behandeling van dyslipidemie-geassocieerde cardiometabole ziekten.

In **Hoofdstuk 8** worden tenslotte de resultaten van de studies die beschreven staan in dit proefschrift bediscussieerd, als ook de mogelijkheid om cardiometabole ziekten te behandelen met veelbelovende nieuwe strategieën bovenop de huidige standaardbehandelingen, zoals activatie van bruin vet en remming van DHCR24. Samengenomen hebben de studies die beschreven staan in dit proefschrift ons inzicht vergroot in de regulatie van de cholesterolstofwisseling en ontsteking door respectievelijk bruin vet en nucleaire receptoren, en veelbelovende aangrijpingspunten geïdentificeerd voor de innovatieve behandeling van cardiometabole ziekten waaronder bruin vet activatie en remming van DHCR24 met SH42.