



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Protein arginine methyltransferases as modulators of lipid metabolism and inflammation and the relevance for atherosclerosis**

Zhang, Y.

### **Citation**

Zhang, Y. (2022, December 15). *Protein arginine methyltransferases as modulators of lipid metabolism and inflammation and the relevance for atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3497656>

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/1887/3497656>

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

# Nederlandse samenvatting

Acute cardiovasculaire aandoeningen zoals een myocardinfarct en een herseninfarct vormen de belangrijkste doodsoorzaak in de Westerse wereld. Deze pathologieën zijn voornamelijk het gevolg van atherosclerose, een progressieve aandoening die wordt gekenmerkt door de ophoping van lipiden, immuuncellen en fibreuze elementen in de wand van grote slagaders [1][2]. De pathogenese van atherosclerose omvat complexe interacties tussen een grote verscheidenheid aan cellen, zoals monocytten, macrofagen, neutrofielen en lymfocyten (zoals in detail besproken in Hoofdstuk 1). Aangezien hyperlipidemie een belangrijke risicofactor is voor de ontwikkeling van atherosclerotische laesies, zijn de huidige cardiovasculaire therapieën (b.v. behandeling met statines) voornamelijk gericht op het verlagen van de plasma lipiden-niveaus. Helaas verminderen statines de atherosclerose-gerelateerde mortaliteit met slechts 25% [3]. Het is daarom essentieel om nieuwe therapeutische targets te identificeren om het resterende risico op atherosclerotische hart- en vaatziekten bij huidige en toekomstige patiënten te verminderen.

Recente studies hebben gesuggereerd dat leden van de proteïne arginine methyltransferase (PRMT)-familie mogelijk kunnen dienen als nieuwe therapeutische targets vanwege hun regulerende rol in ontsteking en metabolisme [4][5][6][7][8]. Om de bijdrage van PRMT's aan de progressie van atherosclerose te valideren, hebben we in de studies beschreven in dit proefschrift het effect van remming van PRMT-functionaliteit op atherosclerosegevoeligheid onderzocht in verschillende atherosclerotische muismodellen. Eerdere studies hebben aangetoond dat muizen met een genetische deletie van PRMT's ernstig geremde

groei en/of overlevingsproblemen vertonen. Shibata et al. toonden bijvoorbeeld aan dat genetische deletie van PRMT1 in muizen leidt tot embryonale mortaliteit [9]. Deletie van PRMT4 bij muizen leidt ook tot ontwikkelingsstoornissen in het ademhalingssysteem en neonatale sterfte [10]. Als zodanig werd verwacht dat het genereren van hypercholesterolemische muizen met een genetisch defect in één of meer PRMTs erg moeilijk of zelfs onmogelijk zou zijn. Om de rol van PRMT's in de pathogenese van atherosclerose te bestuderen, hebben we daarom gebruik gemaakt van specifieke PRMT remmers die tot nu toe voornamelijk zijn toegepast voor de behandeling van kanker: TC-E 5003 voor PRMT1 remming, TP-064 voor PRMT4 remming en GSK3326595 voor PRMT5 remming.

### **Het effect van behandeling met PRMT remmers op de gevoeligheid voor atherosclerose**

Eerdere klinische onderzoeken hebben aangetoond dat hogere plasmaspiegels van de methyleringsproducten asymmetrische dimethylarginine (ADMA) en monomethylarginine (MMA), onafhankelijk correleren met een verhoogd risico op hart- en vaatziekten [11][12][13][14]. Dit suggereert dat PRMT's mogelijk het risico op atherosclerotische hart- en vaatziekten kunnen moduleren. Ongeveer 90% van de ADMA-genererende methylering wordt uitgevoerd door het type I methyltransferase PRMT1 [15]. Dhar et al. hebben zodoende eerder aangetoond dat verlies van PRMT1 activiteit door genetische deletie de ADMA-aminozuurniveaus aanzienlijk verlaagt [16]. PRMT1 komt ook tot overexpressie in het myocardweefsel van patiënten met coronaire hartziekte [17], wordt opgereguleerd in levers van muizen die een vetrijk dieet krijgen [18] en is geïdentificeerd als een essentiële modulator van het hepatische lipidenmetabolisme [19][20]. Op basis van deze bevindingen, veronderstelden we dat PRMT1 een promotor kan

## Chapter 6

zijn van de ontwikkeling van atherosclerose. In Hoofdstuk 2 hebben we aangetoond dat farmacologische remming van PRMT1 door toediening van TC-E 5003 aan muizen geassocieerd is met een verscheidenheid aan systemische effecten, waaronder verminderde hepatische triglyceridenaccumulatie, verminderde hyperlipidemie en een verminderde monocyt-activatie in de context van verhoogde T-cel activering. Verder hebben we gevonden dat de hoeveelheid macrofagen in de aorta significant verlaagd wordt in met TC-E 5003 behandelde muizen, wat een lagere gevoeligheid voor atherosclerose suggereert als reactie op PRMT1 remming. Er kan dus worden geconcludeerd dat PRMT1 (1) een rol speelt bij het reguleren van zowel inflammatoire als metabole activiteiten in vivo en (2) de ontwikkeling van atherosclerose stimuleert.

Net als PRMT1 is PRMT4 (CARM1) een type I PRMT waarvan is vastgesteld dat het tot overexpressie komt in witte bloedcellen van patiënten met coronaire hartziekte [21]. PRMT4 is een co-activator van de nucleaire factor kappa-light-chain-enhancer van geactiveerde B-cellen (NF- $\kappa$ B), een transcriptiefactor die ontstekingsactiviteiten reguleert [60]. Omdat verhoogde ontsteking theoretisch de ontwikkeling van atherosclerotische laesies kan bevorderen, veronderstelden we dat remming van PRMT4 door zijn specifieke remmer TP-064 de chronische ontstekingsreactie tijdens de ontwikkeling van atherosclerose kan dempen en daardoor de plaquelast kan verminderen. In Hoofdstuk 4 hebben we echter laten zien dat TP-064-gemedieerde PRMT4 remming de gevoeligheid voor vroege ontwikkeling van atherosclerotische laesies bij mannelijke hyperlipidemische apolipoproteïne E (APOE) knockout muizen niet significant verandert.

PRMT5 is een type II PRMT familielid dat ook in verband is gebracht met inflammatoire en metabole activiteiten [7][22]. Opregulatie van PRMT5 in bloedcellen of downregulatie van PRMT5 in cardiomyocyten zijn eerder gecorreleerd met een verhoogde ontwikkeling van hart- en vaatziekten [23][24]. Als zodanig is het momenteel niet duidelijk wat de exacte impact van PRMT5 op

de gevoeligheid voor atherosclerose is. Voor dit doel hebben we in de studie beschreven in Hoofdstuk 5 lagedichtheidslipoproteïne (LDL) receptor knockout muizen behandeld met de PRMT5 remmer. Helaas vonden we dat farmacologische PRMT5 remming de algemene inflammatoire toestand of gevoeligheid voor atherosclerose in onze experimentele setting niet veranderde. Remming van PRMT5 was echter wel geassocieerd met een onverwachte toename van accumulatie van hepatische triglyceriden.

Over het algemeen laten onze gecombineerde bevindingen zien dat farmacologische remming van PRMT1, PRMT4 of PRMT5 geen grote invloed heeft op de gevoeligheid voor atherosclerose bij muizen met hypercholesterolemie. Er moet echter worden opgemerkt dat we in al onze verschillende experimenten het effect van PRMT remming op de vroege ontwikkeling van atherosclerose hebben bestudeerd, zoals wordt benadrukt door de kleine laesies die werden gevonden in onze experimentele muizen (laesiegroottes  $<200 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ). De suggestie van PRMT's als potentiële targets voor atherosclerose in de klinische setting bij de mens werd gedaan vanuit data van patiënten die al vergevorderde stadia van atherosclerotische laesies vertoonden [17][25][21][23][24]. Het kan dus niet worden uitgesloten dat PRMT's eerder bijdragen aan atherosclerose in latere stadia van de ziektepathologie. Het is daarom de moeite waard om de rol van deze specifieke PRMT's verder te bestuderen in vergevorderde atherosclerotische settings en experimentele modellen voor atherotrombose.

### **Het effect van behandeling met PRMT remmers op ontstekingen**

Ontsteking is een sleutelproces in de pathogenese van atherosclerose. Dit proces wordt voornamelijk aangedreven door activering van toll-like receptoren

## Chapter 6

(TLR's) die zich in verschillende immuuncellen bevinden [26]. TLR's werken door rekrutering van signaaleiwitten die de transcriptiefactoren NF-kB, AP-1 en IRF aansturen [27]. PRMT's worden beschouwd als modulatoren van ontstekingsreacties via NF-kB-signalering [7]. Lipopolysaccharide (LPS) wordt veel gebruikt om TLR-gemedieerde NF-kB-activering en de daarmee gepaard gaande cytokineproductie te bestuderen [28]. Daarom hebben we het effect van de verschillende PRMT remmers op LPS-geïnduceerde NF-kB-gedreven macrofaagpolarisatie en pro-inflammatoire cytokineproductie onderzocht. In Hoofdstuk 3 lieten we zien dat farmacologische PRMT4 remming met behulp van TP-064 de LPS-geïnduceerde macrofaagpolarisatie en pro-inflammatoire cytokineproductie significant verminderde in zowel door thioglycolaat opgewekte peritoneale macrofagen als in de RAW264.7 macrofaagcellijn. Zowel in Hoofdstuk 3 als Hoofdstuk 4 lieten onze ex vivo studies ook zien dat de productie van het inflammatoire cytokine TNF-alfa op een dosisafhankelijke manier was verminderd als reactie op in vivo TP-064 behandeling van LPS-gestimuleerde monocytten. Er kan dus worden gesuggereerd dat PRMT4 inderdaad een regulerend doelwit is voor polarisatie en activatie van inflammatoire monocytten / macrofagen. Dit is in lijn met de bevindingen van Covic et al. waaruit blijkt dat PRMT4 werkt als een transcriptionele co-activator van NF-kB [29].

Kanker-gerelateerde studies hebben aangetoond dat PRMT5 ook een activator is van de NF-kB-afhankelijke ontstekingsreactie [30]. Echter werden er geen duidelijke effecten op macrofaagpolarisatie waargenomen na behandeling met de PRMT5 remmer GSK3326595, noch in de basale toestand noch na LPS-stimulatie (zie Hoofdstuk 5). Interessant is dat remming van PRMT5 de polarisatie van macrofagen tot een pro-inflammatoire toestand verhoogde wanneer IFN-gamma aan de cellen werd toegevoegd. Dit is in lijn met de suggestie van Fan et al. dat PRMT5 een cellulaire sensor is die stressstimuli (zoals IFN-gamma) verbindt met nucleaire transcriptionele activiteiten [31]. Uit onze studies blijkt

## Summary, General discussion and Perspectives

dus dat door PRMT5 remming geïnduceerde veranderingen in inflammatoire macrofaagpolarisatie meer afhankelijk zijn van een verandering in IFN-gamma-signalering dan van een verschil in LPS-geïnduceerde NF-kB-signalering. Bovendien benadrukken deze bevindingen dat elk van de PRMT-familieleden specifieke regulerende routes beïnvloedt.

Hoewel de in vitro studies beschreven in dit proefschrift duidelijk aantoonde dat PRMT's regulatoren zijn van macrofaagpolarisatie en hun ontstekingsreacties, was de uitkomst van de in vivo studies complex en toonde aan dat PRMT remmers zowel pro- als anti-inflammatoire effecten induceren in verschillende ontstekingscellen. In Hoofdstuk 2 werd een minder pro-inflammatoir monocyt fenotype, gepresenteerd door een verschuiving van een Ly6C<sup>hi</sup> naar een meer Ly6C<sup>low</sup> monocyt populatie, gevonden in milten van muizen die werden behandeld met de PRMT1 remmer TC-E 5003. Daarentegen leidde PRMT1 remming tot een meer inflammatoir T-cel fenotype, zoals beoordeeld aan de hand van de verschoven polarisatie van CD4<sup>+</sup>- en CD8<sup>+</sup>-T-cellen van het naïeve fenotype naar een pro-inflammatoir effector fenotype. In Hoofdstuk 3 en Hoofdstuk 4 hebben we laten zien dat ook PRMT4 remming geassocieerd was met zowel pro- als anti-inflammatoire effecten. Meer specifiek vonden we dat PRMT4 remming geen invloed had op het totale aantal monocyt in vivo, maar wel de LPS-gestimuleerde secretie van het pro-inflammatoir cytokine TNF-alfa door bloedmonocyt verminderde. Bovendien werd neutrofilie geïnduceerd door behandeling met PRMT4 remmer in zowel wild-type als APOE knockout muismodellen (op een dosisafhankelijke manier).

De basale activatietoestand van macrofagen in het buikvlies werd niet veranderd door behandeling met PRMT5 remmer, noch werd het fenotype van T-cel populaties in verschillende T-cel rijke compartimenten zoals bloed, milt en buikholte beïnvloed, zoals blijkt uit Hoofdstuk 5. Het feit dat we geen enkel effect van PRMT5 remming op T-cel activatie hebben waargenomen, is onverwacht.

## Chapter 6

In tegenstelling tot onze bevindingen, heeft een eerdere studie van Gerhart et al. heeft aangegeven dat het blokkeren van de PRMT5-functie bij muizen de differentiatie van CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> geheugen T-cellen ernstig onderdrukt [32][33]. Er moet echter worden opgemerkt dat de verschillen in de responsresultaten te wijten kunnen worden aan de relatief lage dosis GSK3326595 die we in ons onderzoek gebruikten in vergelijking met dat van Gerhart et al. [34].

Al met al impliceren onze bevindingen dat remming van PRMT's zowel ontstekingsstimulerende als remmende effecten kan uitoefenen. Het feit dat sommige van de in vitro bevindingen niet worden vertaald in vergelijkbare in vivo effecten kan hoogstwaarschijnlijk worden verklaard door 1) de interactie tussen de verschillende celtypes die in vitro ontbreekt en 2) de dosis die aan de muizen is toegediend, aangezien verschillende doseringen specifiek de activiteit van bepaalde cellen beïnvloeden.

### **Het effect van behandeling met PRMT remmers op de ontwikkeling van leververvetting**

Naast hun rol bij het reguleren van ontstekingen, zijn PRMT's ook betrokken bij metabole signalering tijdens kankertherapie [6]. Daarom is het waardevol om te onderzoeken of PRMT's ook nieuwe targets kunnen zijn voor de behandeling van metabole ziekten, zoals niet-alcoholische leververvetting (NAFLD). NAFLD is een metabool syndroom met hoge incidentie dat wordt gedefinieerd door een verhoogde ophoping van vet, voornamelijk triglyceriden (TG's), in hepatocyten. NAFLD is nauw verwant aan diabetes omdat de pathogenese ervan gepaard gaat met insulineresistentie in de lever en overmatige hepatische lipogenese [35]. Aangezien patiënten met NAFLD een 3-voudig verhoogde hepatische de novo-lipogenese vertonen in vergelijking met gezonde indivi-



## Summary, General discussion and Perspectives

duen [3][17], kan de hypothese worden aangenomen dat afnemende hepatische lipogenese een therapeutisch doelwit zou kunnen zijn voor de behandeling van NAFLD. Dienovereenkomstig hebben we in Hoofdstuk 2 aangetoond dat de PRMT1 remmer TC-E 5003 in staat is om de triglyceridenspiegels in de lever te verlagen in LDL receptor knockout muizen op een Westers dieet, waarschijnlijk door de expressie van de hepatische lipogenese-genen SREBP1 en FASN te verlagen. In overeenstemming met de algemene veronderstelling dat een afname van hepatische lipogenese de productie en secretie van lipoproteïnen met zeer lage dichtheid door de lever zal verminderen, vonden we ook dat behandeling met de PRMT1 remmer de hyperlipidemie verminderde. PRMT1 lijkt dus een belangrijke regulator van hepatische lipogenese en systemisch lipidenmetabolisme te zijn. In een eerder studie heeft onze onderzoeksgroep gevonden dat remming van PRMT3 door SGC707-behandeling ook de leverlipideniveaus en plasma triglycerideniveaus verlaagt [38][39]. De door PRMT3 remmer geïnduceerde verlaging van leververvetting en hyperlipidemie correleerde met verminderde transcriptie van hepatische lipogenese genen die worden gereguleerd door de nucleaire receptor lever X-receptor (LXR), een belangrijke transcriptionele regulator van het cholesterolmetabolisme van macrofagen en hepatische lipogenese [40]. Gezien het feit dat remming van PRMT1 of PRMT3 vergelijkbare effecten vertoonde in muismodellen, kan worden verondersteld dat PRMT1 en PRMT3 met elkaar interageren om leverlipideniveaus te moduleren. Wanneer de twee onderzoeksresultaten kritisch worden vergeleken, lijkt het er echter op dat PRMT1 niet precies hetzelfde doet als PRMT3, aangezien niet alle LXR-doelgenen worden beïnvloed door behandeling met PRMT1 remmer. Bovendien moet worden opgemerkt dat een tegenstrijdige studie van Xu et al., aantoonde dat deletie van lever-PRMT1 leversteatose induceert bij muizen die een vetrijk dieet kregen via een verandering in PRMT1/HNF-4 $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$ -signaling [41]. Verdere mechanistische studies zijn daarom nodig om de exacte mechanismen bloot

## Chapter 6

te leggen waardoor PRMT1 (systemische) lipideniveaus moduleert.

In tegenstelling tot de bevindingen met betrekking tot remming van PRMT1 en PRMT3, hebben we in Hoofdstuk 5 laten zien dat behandeling met de PRMT5 remmer GSK3326595 de expressie van genen die betrokken zijn bij hepatische lipogenese en verhoogde triglyceridenaccumulatie in de lever juist opreguleert. Meer specifiek toonden onze genexpressiemetingen in levers van de LDL receptor knockout muizen aan dat GSK3326595 de expressieniveaus van CD36, betrokken bij de opname van vetzuren, en de hepatische lipogene genen SREBF1 en FASN opreguleerde. We verwachten dat deze effecten mogelijk werden geïnduceerd via remming van het eiwit SHP, aangezien een eerdere studie heeft aangetoond dat de activiteit van SHP wordt verhoogd door posttranslationele methylering op Arg-57 door PRMT5 [42]. Ter verdere ondersteuning van deze hypothese hebben Kanamaluru et al. ontdekt dat gebrekkige methylering van SHP leidt tot een hoger triglyceridengehalte in de lever [42].

Al met al impliceren onze metabolisme-gerelateerde bevindingen dat remming van verschillende PRMT familieleden de ontwikkeling van leververvetting verschillend beïnvloedt. Hoewel er meer mechanistische studies nodig zijn om de regulerende rol van PRMTs in het lever lipidenmetabolisme verder te specificeren, benadrukken onze bevindingen duidelijk het potentieel van PRMT1 en PRMT3 als therapeutische targets voor NAFLD-gedreven geneesmiddelontwikkeling.

### **Het effect van behandeling met PRMT remmers op andere metabole complicaties**

Er is eerder gesuggereerd dat PRMT's ook een rol spelen bij de ontwikkeling van andere stofwisselingsstoornissen, zoals obesitas en diabetes [43][44][45]. Studies van Qiao et al. hebben aangetoond dat PRMT's tot expressie worden

## Summary, General discussion and Perspectives

gebracht in alle belangrijke metabole weefsels, inclusief bruin en wit vetweefsel [46]. De studies gepresenteerd in dit proefschrift hebben het belang van PRMT-familieleden in de regulatie van de ontwikkeling van vetweefsel / fenotype en het therapeutische potentieel van PRMT's bij de behandeling van obesitas of diabetes benadrukt. In Hoofdstuk 4 hebben we bijvoorbeeld gevonden dat remming van PRMT4 door TP-064 de mRNA-expressieniveaus van het adipogene targetgen PPAR $\gamma$  in wit vetweefsel van APOE knockout muizen significant verlaagde. Als moelijk gevolg werd ook de toename van het lichaamsgewicht van deze APOE knockout muizen op een TP-064-dosisafhankelijke manier verminderd. Remming van PRMT4 kan dus een potentieel doelwit zijn voor het beperken van het adipogene proces bij challenge met een obesogeen dieet. We ontdekten echter ook dat remming van PRMT4 geassocieerd is met een verminderde insulineproductie en veranderde insulinesignalering, wat diabetes kan veroorzaken. De ontwikkeling van obesitas en diabetes zijn over het algemeen sterk gecorreleerd [47][48]. Het is daarom moeilijk te voorspellen of remming van PRMT4 echt nuttig kan zijn voor het voorkomen van stofwisselingsstoornissen. Het zal dus belangrijk zijn om de specifieke rol van PRMT4 bij obesitas en diabetes verder te onderzoeken in meer toegewijde experimentele ziektemodellen zoals de leptine deficiënte ob/ob-muizen of leptine receptormutant pre-diabetische db/db-muizen [49][50] [51].

Eerdere studies hebben gesuggereerd dat PRMT5 een belangrijke activator van adipogenese is. Meer specifiek vermindert de deletie van PRMT5 in adipocyten in kweek de differentiatie van adipocyten en de biogenese van lipidendruppels [22][52]. Daarom hebben we ook het effect bestudeerd van behandeling met PRMT5 remmer op vetweefsel van onze LDL receptor knockout muizen. Zoals bechreven in Hoofdstuk 5, werden er geen verschillen gevonden in de ontwikkeling van het lichaamsgewicht, noch in de morfologie of het triglyceridengehalte van perigonadale witte vetweefsel en subcutane bruine vetdepots. Echter,

## Chapter 6

aangezien eerdere studies ook hebben waargenomen dat PRMT5 een rol speelt bij het in stand houden van de bètacelfunctie, d.w.z. de insulineproductie moduleert [53], en onze studies suggereren dat PRMT5 de activiteit van de insulinesignaleringsregulator SHP [54] kan moduleren, zullen verdere studies naar de rol van PRMT5 in de context van obesitas en diabetes duidelijk nodig zijn.

### **Perspectieven**

In dit proefschrift hebben we het effect van farmacologische remming van de PRMT-activiteit op de ontwikkeling van atherosclerose, ontsteking en metabole processen bestudeerd. Onze studies benadrukken dat de gecombineerde in vitro en vivo toepassing van specifieke remmers van PRMT's een goede experimentele benadering is voor het bestuderen van de rol van deze eiwitten in processen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van ziekte. We hebben echter ook aangetoond dat PRMT remmers systemisch meerdere effecten kunnen induceren die elkaar kunnen compenseren en dat de toegepaste behandelingsdosering van PRMT remmers in sommige gevallen te laag was om in vivo functionele effecten in sommige van de doelweefsels te induceren. Het is daarom belangrijk om het effect van deze remmers bij verschillende doseringen in ziektemodellen te testen. Met name speciale hulpmiddelen voor medicijnafgifte, zoals liposomen, kunnen nuttig zijn om de effectiviteit van de behandeling met PRMT remmers te verbeteren. Liposomen zijn het meest onderzochte leveringssysteem voor op fagocyten gerichte therapieën (inclusief monocyt en macrofagen), gezien hun lage immunogeniciteit, goede biocompatibiliteit en celspecificiteit [55]. Een recent onderzoek door onze groep heeft bijvoorbeeld onthuld dat incorporatie van de LXR-agonist GW3965 in Lyp-1-bevattende liposomen de afgifte van deze compound aan macrofagen in atherosclerotische plaques ver-

## Summary, General discussion and Perspectives

hoogde zonder ongewenste systemische bijwerkingen in de lever te veroorzaken [56] ]. Naast het feit dat liposomen zich effectief richten op macrofagen, verwachten we ook dat liposomen kunnen worden gebruikt om andere specifieke cellen en weefsels te bereiken, zoals bijvoorbeeld adipocyten [58]. Incorporatie van bijvoorbeeld de PRMT4 remmer TP-064 in deze specifieke klasse van targeting vehikels zou bijvoorbeeld kunnen leiden tot een meer specifieke afgifte en efficiënte verlaging van de inflammatoire macrofaagpolarisatie, pro-inflammatoire cytokineproductie en adipogenese.

Een belangrijk aspect dat uit onze studies naar voren is gekomen, is dat PRMT's kunnen werken in samenwerking of via vergelijkbare mechanismen. Remming van PRMT1 of PRMT3 induceert bijvoorbeeld een vergelijkbaar effect op de lever lipidenstatus. Eerdere studies hebben ook aangetoond dat PRMT1 en PRMT5 beide werken als NF- $\kappa$ B-co-activatoren bij ontstekingen [55] [56]. Het is daarom van belang om verder te onderzoeken of de verschillende gezinsleden samenwerken of dat ze mogelijk aanvullende rollen hebben. Dit kan worden getest door toediening van een cocktail van twee of meer PRMT remmers in specifieke ziektemodellen. Omdat we ontdekten dat individuele remming van PRMT1, PRMT3 of PRMT4 geassocieerd is met verminderde hepatische lipidenaccumulatie of hyperlipidemie, kan worden aangenomen dat gecombineerde remming van deze type 1 PRMT's nog effectiever is. Er moet echter rekening mee worden gehouden dat de toediening van meerdere remmers gepaard kan gaan met geneesmiddelinteracties, wat kan leiden tot verminderde werkzaamheid en/of toxiciteit. Het vereist uitgebreide studies naar de effecten van verschillende doseringen die worden toegepast voor de cocktailbehandeling om de therapeutische effecten en ongewenste bijwerkingen in evenwicht te brengen. Met name omdat type 1 PRMT remmers al zijn toegepast als antitumormiddelen [56], is het ook interessant om de effecten van cocktailbehandeling in kanker verder te onderzoeken.

### **Algemene conclusie**

In dit proefschrift hebben we het effect van verschillende PRMT remmers in atherosclerotische muismodellen bestudeerd. We hebben gevonden dat PRMT1, PRMT4 en PRMT5 remming geen duidelijke veranderingen in de grootte of samenstelling van atherosclerotische laesies veroorzaakt. Onze studies hebben echter aangetoond dat elk van deze drie PRMT's een significante rol speelt bij verschillende ziekten die gepaard gaan met inflammatoire en/of metabole ontregeling. De routes die PRMT remmers moduleren, zijn afhankelijk van de specifieke toegepaste remmer en de bestudeerde weefsels of celtypen. Bovendien benadrukken de bevindingen in dit proefschrift dat medicijnafgiftemethoden nodig zijn om weefsel-specifieke targeting te bereiken om het gebruik van PRMT remmers voor toekomstige behandeling van ziekten te optimaliseren.

### References:

- [1] R. Ross, "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s," *Nature*, vol. 362, no. 6423, pp. 801–809, 1993.
- [2] B. Hu et al., "Nanomedicine Approaches for Advanced Diagnosis and Treatment of Atherosclerosis and Related Ischemic Diseases," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 16, p. 2000336, 2020.
- [3] R. Kones, "Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 5, p. 325, 2011.
- [4] Y. Yang and M. T. Bedford, "Protein arginine methyltransferases and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 1, pp. 37–50, 2013.
- [5] E. Guccione and S. Richard, "The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation," *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 20, no. 10, pp. 642–657, 2019.
- [6] J. W. Hwang, Y. Cho, G.-U. Bae, S.-N. Kim, and Y. K. Kim, "Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy," *Exp. Mol. Med.*, vol. 53, no. 5, pp. 788–808, 2021.
- [7] J. H. Kim, B. C. Yoo, W. S. Yang, E. Kim, S. Hong, and J. Y. Cho, "The role of protein arginine methyltransferases in inflammatory responses," *Mediators Inflamm.*, vol. 2016, 2016.
- [8] H.-S. Han, D. Choi, S. Choi, and S.-H. Koo, "Roles of protein arginine methyltransferases in the control of glucose metabolism," *Endocrinol. Metab.*, vol. 29, no. 4, pp. 435–440, 2014.
- [9] Y. Shibata, M. Okada, T. C. Miller, and Y.-B. Shi, "Knocking out histone methyltransferase PRMT1 leads to stalled tadpole development and lethality in *Xenopus tropicalis*," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.*, vol. 1864, no. 3, p. 129482, 2020.
- [10] K. B. O'Brien et al., "CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells," *Development*, vol. 137, no. 13, pp. 2147–2156, 2010.
- [11] M. Di Franco, B. Lucchino, F. Conti, G. Valesini, and F. R. Spinelli, "Asymmetric dimethyl arginine as a biomarker of atherosclerosis in rheumatoid arthritis," *Mediators Inflamm.*, vol. 2018, 2018.
- [12] L. Dowsett, E. Higgins, S. Alanazi, N. A. Alshuwayer, F. C. Leiper, and J. Leiper, "ADMA: a key player in the relationship between vascular dysfunction and inflammation in atherosclerosis," *J. Clin. Med.*, vol. 9, no. 9, p. 3026, 2020.
- [13] J. T. Kielstein, J. C. Froëlich, H. Haller, and D. Fliser, "ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease?," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 16, no. 9, pp. 1742–1745, 2001.

## Chapter 6

- [14] P. Willeit et al., “Asymmetric dimethylarginine and cardiovascular risk: systematic review and meta-analysis of 22 prospective studies,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 4, no. 6, p. e001833, 2015.
- [15] M. T. Bedford, “Arginine methylation at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. 24, pp. 4243–4246, 2007.
- [16] S. Dhar et al., “Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging by other PRMTs,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–6, 2013.
- [17] K. Murata et al., “PRMT1 deficiency in mouse juvenile heart induces dilated cardiomyopathy and reveals cryptic alternative splicing products,” *Iscience*, vol. 8, pp. 200–213, 2018.
- [18] Y. Ma et al., “A critical role for hepatic protein arginine methyltransferase 1 isoform 2 in glyce-mic control,” *FASEB J.*, vol. 34, no. 11, pp. 14863–14877, 2020.
- [19] M.-J. Park et al., “Thioredoxin-interacting protein mediates hepatic lipogenesis and inflam-mation via PRMT1 and PGC-1 $\alpha$  regulation in vitro and in vivo,” *J. Hepatol.*, vol. 61, no. 5, pp. 1151–1157, 2014.
- [20] D. Choi et al., “Protein arginine methyltransferase 1 regulates hepatic glucose production in a FoxO1-dependent manner,” *Hepatology*, vol. 56, no. 4, pp. 1546–1556, 2012.
- [21] Y. Wang, C. Ju, J. Hu, K. Huang, and L. Yang, “PRMT4 overexpression aggravates cardiac re-modeling following myocardial infarction by promoting cardiomyocyte apoptosis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 520, no. 3, pp. 645–650, 2019.
- [22] Z. Jia et al., “Protein Arginine Methyltransferase PRMT5 Regulates Fatty Acid Metabolism and Lipid Droplet Biogenesis in White Adipose Tissues,” *Adv. Sci.*, vol. 7, no. 23, p. 2002602, 2020.
- [23] B. Tan et al., “Low expression of PRMT5 in peripheral blood may serve as a potential independ-ent risk factor in assessments of the risk of stable CAD and AMI,” *BMC Cardiovasc. Disord.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, 2019.
- [24] M. Chen, B. Yi, and J. Sun, “Inhibition of cardiomyocyte hypertrophy by protein arginine meth-yltransferase 5,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 35, pp. 24325–24335, 2014.
- [25] X. Chen et al., “Expression of nitric oxide related enzymes in coronary heart disease,” *Basic Res. Cardiol.*, vol. 101, no. 4, pp. 346–353, 2006.
- [26] M. Falck-Hansen, C. Kassiteridi, and C. Monaco, “Toll-like receptors in atherosclerosis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 7, pp. 14008–14023, 2013.
- [27] L. Li, “Regulation of innate immunity signaling and its connection with human diseases,” *Curr. Drug Targets-Inflammation Allergy*, vol. 3, no. 1, pp. 81–86, 2004.
- [28] C. Pramod, S. Nair, and J. Harindran, “IN-VITRO ANALYSIS OF GENISTEIN ISOLATED FROM LABLAB PURPUREUS LINN INHIBITED ON LPS INDUCED INFLAMMATION IN HPBMCS CELLS VIA A TLR MEDIATED NF-KB PATH WAY AND OXIDATIVE STRESS CONDITION,” 2020.



## Summary, General discussion and Perspectives

- [29] M. Covic et al., “Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF- $\kappa$ B-dependent gene expression,” *EMBO J.*, vol. 24, no. 1, pp. 85–96, 2005.
- [30] H. Wei et al., “PRMT5 dimethylates R30 of the p65 subunit to activate NF- $\kappa$ B,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 33, pp. 13516–13521, 2013.
- [31] Z. Fan et al., “The arginine methyltransferase PRMT5 regulates CIITA-dependent MHC II transcription,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gene Regul. Mech.*, vol. 1859, no. 5, pp. 687–696, 2016.
- [32] L. Alinari et al., “Selective inhibition of protein arginine methyltransferase 5 blocks initiation and maintenance of B-cell transformation,” *Blood, J. Am. Soc. Hematol.*, vol. 125, no. 16, pp. 2530–2543, 2015.
- [33] L. M. Webb et al., “PRMT5-selective inhibitors suppress inflammatory T cell responses and experimental autoimmune encephalomyelitis,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 4, pp. 1439–1451, 2017.
- [34] S. V Gerhart et al., “Activation of the p53-MDM4 regulatory axis defines the anti-tumour response to PRMT5 inhibition through its role in regulating cellular splicing,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018.
- [35] V. T. Samuel et al., “Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 31, pp. 32345–32353, 2004.
- [36] J. E. Lambert, M. A. Ramos-Roman, J. D. Browning, and E. J. Parks, “Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease,” *Gastroenterology*, vol. 146, no. 3, pp. 726–735, 2014.
- [37] K. L. Donnelly, C. I. Smith, S. J. Schwarzenberg, J. Jessurun, M. D. Boldt, and E. J. Parks, “Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1343–1351, 2005.
- [38] M. Hoekstra, J. E. Nahon, L. M. de Jong, M. J. Kröner, L. R. de Leeuw, and M. Van Eck, “Inhibition of PRMT3 activity reduces hepatic steatosis without altering atherosclerosis susceptibility in apoE knockout mice,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.*, vol. 1865, no. 6, pp. 1402–1409, 2019.
- [39] L. M. de Jong et al., “PRMT3 inhibitor SGC707 reduces triglyceride levels and induces pruritus in Western-type diet-fed LDL receptor knockout mice,” *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2022.
- [40] J. E. Nahon, C. Groeneveldt, J. J. Geerling, M. van Eck, and M. Hoekstra, “Inhibition of protein arginine methyltransferase 3 activity selectively impairs liver X receptor-driven transcription of hepatic lipogenic genes in vivo,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 175, no. 15, pp. 3175–3183, 2018.
- [41] L. Xu et al., “Hepatic PRMT1 ameliorates diet-induced hepatic steatosis via induction of PGC1 $\alpha$ ,” *Theranostics*, vol. 12, no. 6, p. 2502, 2022.
- [42] D. Kanamaluru et al., “Arginine methylation by PRMT5 at a naturally occurring mutation site is

## Chapter 6

- critical for liver metabolic regulation by small heterodimer partner,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1540–1550, 2011.
- [43] Y. Li et al., “Protein arginine methyltransferase 4 regulates adipose tissue lipolysis in type 1 diabetic mice,” *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. targets Ther.*, vol. 13, p. 535, 2020.
- [44] H. Kim et al., “PRMT1 is required for the maintenance of mature  $\beta$ -cell identity,” *Diabetes*, vol. 69, no. 3, pp. 355–368, 2020.
- [45] G. Sesti, M. Federici, M. L. Hribal, D. Lauro, P. Sbraccia, and R. Lauro, “Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders,” *FASEB J.*, vol. 15, no. 12, pp. 2099–2111, 2001.
- [46] X. Qiao et al., “Protein Arginine Methyltransferase 1 Interacts With PGC1  $\alpha$  and Modulates Thermogenic Fat Activation,” *Endocrinology*, vol. 160, no. 12, pp. 2773–2786, 2019.
- [47] D. J. O’Gorman and A. Krook, “Exercise and the treatment of diabetes and obesity,” *Med. Clin. North Am.*, vol. 95, no. 5, pp. 953–969, 2011.
- [48] A. Boles, R. Kandimalla, and P. H. Reddy, “Dynamics of diabetes and obesity: epidemiological perspective,” *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.*, vol. 1863, no. 5, pp. 1026–1036, 2017.
- [49] C. P. O’Donnell, C. G. Tankersley, V. P. Polotsky, A. R. Schwartz, and P. L. Smith, “Leptin, obesity, and respiratory function,” *Respir. Physiol.*, vol. 119, no. 2–3, pp. 163–170, 2000.
- [50] V. R. Drel et al., “The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity,” *Diabetes*, vol. 55, no. 12, pp. 3335–3343, 2006.
- [51] B. Jayaram et al., “Astrocytic leptin-receptor knockout mice show partial rescue of leptin resistance in diet-induced obesity,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 114, no. 6, pp. 734–741, 2013.
- [52] S. E. LeBlanc et al., “Protein arginine methyltransferase 5 (Prmt5) promotes gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) and its target genes during adipogenesis,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 26, no. 4, pp. 583–597, 2012.
- [53] J. Ma et al., “Islet-specific Prmt5 excision leads to reduced insulin expression and glucose intolerance in mice,” *J. Endocrinol.*, vol. 244, no. 1, pp. 41–52, 2020.
- [54] F. Lizotte, B. Denhez, A. Guay, N. Gévry, A. M. Côté, and P. Geraldes, “Persistent insulin resistance in podocytes caused by epigenetic changes of SHP-1 in diabetes,” *Diabetes*, vol. 65, no. 12, pp. 3705–3717, 2016.
- [55] C. Kelly, C. Jefferies, and S.-A. Cryan, “Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages,” *J. Drug Deliv.*, vol. 2011, 2011.
- [56] N. Benne et al., “Complement receptor targeted liposomes encapsulating the liver X receptor agonist GW3965 accumulate in and stabilize atherosclerotic plaques,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 9, no. 10, p. 2000043, 2020.

## Summary, General discussion and Perspectives

- [57] Z. Yan et al., “LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: a carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor,” *J. Control. release*, vol. 157, no. 1, pp. 118–125, 2012.
- [58] D. Shen et al., “Liposome-encapsulated peptide PDBSN ameliorates high-fat-diet-induced obesity and improves metabolism homeostasis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 533, no. 1, pp. 181–187, 2020.
- [59] P. O. Hassa, M. Covic, M. T. Bedford, and M. O. Hottiger, “Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF- $\kappa$ B-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1,” *J. Mol. Biol.*, vol. 377, no. 3, pp. 668–678, 2008.
- [60] X. Chai, X. Wu, L. He, and H. Ding, “Protein arginine methyltransferase 5 mediates THP-1-derived macrophage activation dependent on NF- $\kappa$ B in endometriosis,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 22, no. 3, pp. 1–9, 2021.