Universiteit Leiden
The Netherlands

Application of zebrafish and murine models in lipoprotein metabolism and atherosclerosis research

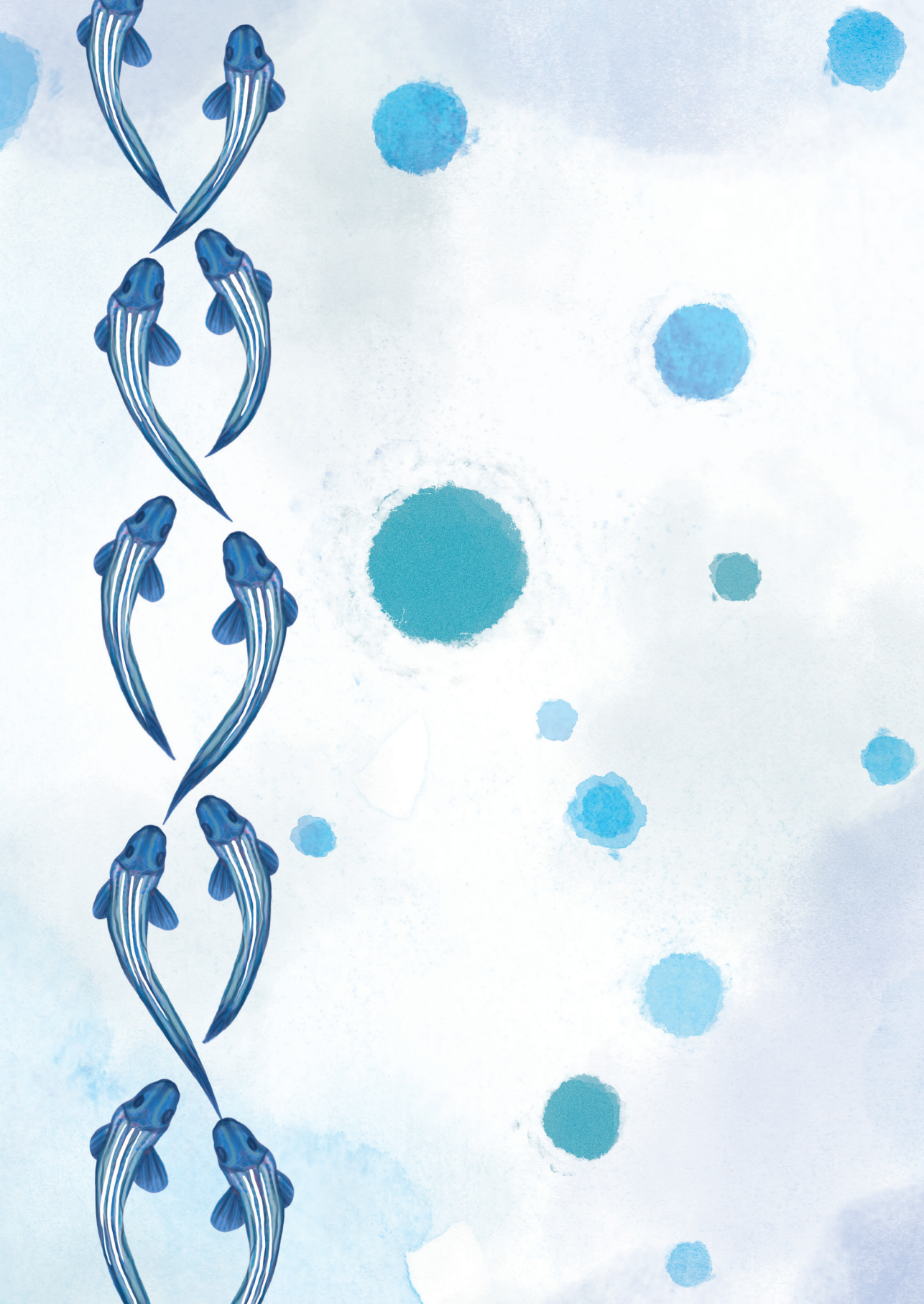
Verwilligen, R.A.F.

Citation

Verwilligen, R. A. F. (2023, April 19). *Application of zebrafish and murine models in lipoprotein metabolism and atherosclerosis research*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3594430

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/1887/3594430

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



APPENDIX

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Nederlandse samenvatting

Introductie

Slagaderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd, is een ingewikkelde ziekte die leidt tot vernauwing van bloedvaten. Atherosclerose ligt ten grondslag aan veel hart- en vaatziekten en wereldwijd is atherosclerose nog steeds de voornaamste ziekte- en doodsoorzaak[1]. Verschillende gezondheidsrisicofactoren, waaronder roken en beperkte lichaamsbeweging, dragen bij aan de ontwikkeling van atherosclerose, maar dyslipidemie is de belangrijkste risicofactor. Huidige therapieën zijn vooral gericht op verlaging van het plasmacholesterolgehalte. Studies hebben namelijk laten zien dat 1mmol/L verlaging van het 'slechte cholesterol', ook wel low-density lipoproteïne (LDL) genoemd, kan leiden tot een 20% reductie van het risico op toekomstige cardiovasculaire events[2,3]. Doordat cholesterolverlagende medicijnen alleen het risico op cardiovasculaire events verlagen en niet in staat zijn de ziekte te genezen, is het nog steeds van belang om goed onderzoek te doen naar de pathofysiologie van atherosclerose. Op deze manier kunnen er nieuwe targets worden gevonden die mogelijk kunnen leiden tot een nieuw geneesmiddel tegen atherosclerose. Voor de identificatie van nieuwe therapeutische targets voor atherosclerose is preklinisch onderzoek met behulp van cellijnen en diermodellen erg belangrijk. Elk model heeft zijn eigen voor- en nadelen. Het selecteren van het juiste model om bepaalde aspecten van atherosclerose te bestuderen of om nieuwe potentiële targets te identificeren en te valideren is essentieel voor de uitkomsten en betrouwbaarheid van de studie.

In dit proefschrift (1) is het gebruik van de zebravis als diermodel in cholesterol metabolisme en atherosclerose onderzoek gevalideerd, (2) is de rol van bepaalde klassen van scavenger receptoren in cholesterol opname en het cholesterol metabolisme bestudeerd en (3) zijn twee immunologische therapeutische targets onderzocht voor de behandeling van atherosclerose.

De zebravis als diermodel voor onderzoek naar het cholesterol metabolisme en atherosclerose

De zebravis is een veel gebruikt diermodel voor biomedisch onderzoek. Doordat deze kleine tropische vissen makkelijk te onderhouden zijn, ze transparante larven hebben en vele zebravis genen een hoge gelijkenis hebben met genen van de mens, zijn zebravissen een interessant diermodel om verschillende soorten ziekten te bestuderen, waaronder kanker en hart- en vaatziekten.

De ontwikkeling van het cardiovasculaire systeem is goed geconserveerd tussen organismen. Hoewel zebravissen in het begin vooral werden gebruikt omvraagstukken in de ontwikkelingsbiologie op te lossen, worden zebravissen tegenwoordig ook ingezet om de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen van vaatziekten, waaronder atherosclerose te onderzoeken.

Terwijl wild-type muizen resistent zijn voor atherosclerose, liet Stoletov *et al.* zien dat het gebruik van zebravissen nieuwe mogelijkheden kan bieden voor cardiovasculair onderzoek[4]. Stoletov en zijn collega's (2009) waren de eersten die de mogelijkheid beschreven om lipide ophoping (beginstadium van atherosclerose) te induceren bij wild-type zebravissen. Zij toonden aan dat het voeren van volwassen zebravissen met een 4% w/w hoog cholesteroldieet kan leiden tot de ontwikkeling van lipide ophoping. Hoewel Stoletov *et al.* en verscheidene andere onderzoeksgroepen hebben laten zien dat atherosclerose kan worden geïnduceerd in wild-type zebravislarven, hebben wij aangetoond dat wild-type zebravissen niet zo vatbaar zijn voor de ontwikkeling van atherosclerose zoals eerder werd gesuggereerd (**hoofdstuk 2**). De onderliggende redenen voor deze tegenstrijdige resultaten zijn nog onduidelijk. Meerdere factoren kunnen invloed hebben op de ontwikkeling van atherosclerose, zelfs de kleinste verschillen in bijvoorbeeld de zebravisfaciliteit kunnen effecten hebben op het microbioom en daardoor ook op de vatbaarheid van zebravissen voor het ontwikkelen van atherosclerose.

In onze zebravis studie hebben wij beginnende atherosclerose gedefinieerd als ophoping van met lipiden beladen macrofagen (de zogenaamde foam cellen). Door gebruik te maken van een macrofaag-specifieke transgene zebravislijn (een zebravis lijn waarin de macrofagen fluorescent zijn) hebben we aangetoond dat zebravis larven op een hoog cholesterol dieet geen lipiden ophopen in macrofagen. In de studie van Stoletov *et al.* is de opname van lipiden door macrofagen niet onderzocht en hebben ze alleen vasculaire lipiden-ophoping aangetoond. Daarnaast hebben andere studies, die een transgene zebravis lijn hebben gebruikt waarin alleen myeloïde cellen (alle witte bloedcellen behalve lymfocyten) fluorescent zijn, aangetoond dat myeloïde cellen lipiden kunnen opnemen en atherosclerose ontwikkeling beïnvloeden[5–7]. Omdat deze transgene lijn niet macrofaag specifiek is, kan er niet met zekerheid worden vastgesteld dat de ophoping is veroorzaakt door lipiden-beladen macrofagen en bv niet door lipide-beladen neutrofielen. Voordat de zebravis als standaard diermodel voor atherosclerose kan worden geïntroduceerd, is het belangrijk om de definitie van zebravis atherosclerose vast te stellen. Verschillende definities kunnen namelijk leiden tot verschillende conclusies.

Atherosclerose bij zebravissen komt vooral voor in de staartader en niet in de aorta, waar de atherosclerotische laesies in zoogdieren zich bevinden. Al bovenstaande punten tezamen beschouwend, roept de vraag op: hoe relevant zijn de bevindingen in wild-type zebravissen voor deze ziekte in de mens en dus hoe nuttig is atherosclerose onderzoek in zebravissen?

Mede door deze vraag is er meer onderzoek nodig om de pathofysiologie van atherosclerose in de zebravis volledig te begrijpen. Voor onderzoek naar lipoproteïne distributie en cholesterolmetabolisme lijkt de zebravis een geschikt model. De meeste genen die betrokken zijn bij het metabolisme van lipoproteïnen zijn sterk geconserveerd[8]. Een voorbeeld hiervan is apolipoproteïne E dat twee zebravis-orthologen heeft namelijk *apoea* en *apoeb*. Daarnaast heeft menselijk apoB drie zebravis-orthologen: *apoBa*, *apoBb1* en *apoBb2*, waarvan de eiwitstructuur voor respectievelijk 51,6%, 42,5% en 27,5% identiek is aan het eiwit in de mens[9,10].

Desalniettemin zijn er ook verschillen tussen zebravissen en mensen met betrekking tot bepaalde metabolische routes waar rekening mee moet worden gehouden. De lipoproteïnesamenstelling is anders in zebravissen dan in mensen. Zebravissen produceren alleen chylomicronen met apoB100 als structureel apolipoproteïne en niet zowel apoB100 als apoB48. Dit zou mogelijk invloed kunnen hebben op de klaring van deze lipoproteïnen door de lever[11].

Een belangrijke familie van receptoren die onder andere epitopen met een negatieve lading, zoals de gemodificeerde apolipoproteïnen op lipoproteïnen, kan herkennen, zijn scavenger receptoren. Als gevolg zijn scavenger receptoren belangrijk voor het verwijderen van gemodificeerde lipoproteïnen uit de bloedcirculatie. Onderzoek heeft aangetoond dat scavenger receptoren de ontwikkeling en progressie van atherosclerose in belangrijke mate beïnvloeden door de pro-inflammatoire signalering in immuuncellen en de ophoping van gemodificeerde lipoproteïnen, zoals oxLDL te stimuleren[12]. Er zijn verschillende scavenger receptoren klassen. Elke klasse heeft zijn eigen functie en kan afhankelijk van de receptor structuur en eigenschappen, verschillende liganden binden. In dit proefschrift hebben we de functie van 2 verschillende klassen van scavenger receptoren onderzocht door gebruik te maken van genetisch gemodificeerde zebravissen die deficiënt zijn voor ofwel klasse H scavenger receptor stabiline 1 (STAB1) en stabiline 2 (STAB2) (**hoofdstuk 3**) of klasse B scavenger receptor SCARB1 (**hoofdstuk 4**).

De rol van de klasse H receptoren STAB1 en 2 in het cholesterolmetabolisme en de ontwikkeling van atherosclerose *in vivo* is grotendeels onbekend. *In vitro* studies met getransfecteerde HEK-cellen en geïsoleerde lever endotheelcellen door Li *et al.* hebben laten zien dat STAB1 en 2 een essentiële rol spelen bij de opname van lipoproteïnen, waaronder de opname van oxLDL[13]. In onze studie hebben we aangetoond dat STAB1 en 2 *in vivo* de opname van apoB-bevattende lipoproteïnen, die betrokken zijn bij de ontwikkeling van atherosclerose kan beïnvloeden. Deze resultaten komen overeen met de resultaten van de *in vitro* studie van Li *et al.*

Totale deficiëntie van deze twee receptoren resulteerde in een verhoogde klaring van apoB-bevattende lipoproteïnen door macrofagen in de staartader van zebravissen. Dit hebben we kunnen aantonen door fluorescente apoB-bevattende lipoproteïnen te injecteren in zebravissen en de opname door macrofagen te meten. Doordat we een verhoogde opname zagen in zebravissen deficiënt voor STAB1 en 2, was de verwachting dat deze genetisch gemodificeerde zebravissen vatbaarder zouden zijn voor de opstapeling van lipiden in de macrofagen en dus de ontwikkeling van atherosclerose. Tot onze verrassing, bleek dit niet het geval te zijn. Een verklaring kan zijn dat STAB1 en 2 niet alleen op macrofagen maar ook op endotheelcellen tot expressie komen. Nahon *et al.* hebben reeds aangetoond dat macrofaag-specifieke STAB1-deficiëntie in muizen de gevoeligheid van LDLr$^{-/-}$ muizen voor de ontwikkeling van atherosclerose niet verandert. De recente studie van Manta *et al.* laat echter zien dat totale uitschakeling of inhibitie van STAB1 (en ook STAB2) tot een verminderde atherosclerose ontwikkeling leidt[14]. De expressie van STAB1 (en STAB2) op endotheelcellen heeft dus mogelijk een beschermende rol tegen de ontwikkeling van atherosclerose[15]. De wisselwerking tussen endotheelcellen en macrofagen tijdens de klaring van geoxideerde lipoproteïnen, zoals oxLDL, uit de bloedcirculatie kan mogelijk van invloed zijn op de gevoeligheid voor atherosclerose. Hetzelfde geldt voor lever endotheelcellen (LSECs) en Kupffer cellen. Zebravissen hebben deze specifieke cellen niet, maar wel cellen die erop lijken. De staartader van zebravis embryo's is bekleed met dit speciale type endotheelcellen (SECs), die onder andere (gemodificeerde) lipoproteïnen uit de bloedcirculatie kunnen verwijderen. Onze studie heeft laten zien dat zebravissen een goed model zijn om de functie van SEC's te bestuderen. Echter, om de individuele rol van STAB1 en 2 in het lipoproteïne metabolisme en de rol van deze receptoren in de ontwikkeling van foam cellen verder te onderzoeken, zou het interessant zijn dit te onderzoeken in endotheel-specifieke en/of macrofaag-specifieke *stab1* en *stab2* knock-out zebravissen.

Een andere belangrijke scavenger receptor voor het cholesterolmetabolisme van zowel muizen als mensen is de high-density lipoproteïne (HDL) receptor SCARB1. HDL is een lipoproteïne dat ook wel wordt ook gezien als 'het goede cholesterol' en speelt samen met SCARB1 een belangrijke rol in het reverse transport waarbij cholesterol vanuit perifere weefsels naar de lever in zoogdieren wordt getransporteerd.

In studies met mensen is aangetoond dat verstoring van de interactie tussen HDL en SCARB1 kan leiden tot een verhoogd risico op atherosclerose en zelfs tot fertiliteitsproblemen[16–18]. Hoewel de rol van SCARB1 in mensen en muizen vergelijkbaar is, is er verder niks bekend over de evolutie en de functie van dit gen in zebravissen. Terwijl SCARB1 goed geconserveerd is tussen verschillende organismen, is een specifiek deel van het gen dat belangrijk is voor de opname van cholesterol, niet geconserveerd in zebravissen. In hoofdstuk 4 hebben we onderzoek gedaan naar de functie van SCARB1 in zebravissen en hoe deze functie geëvolueerd is gedurende de tijd. Om dit te onderzoeken hebben wij een *scarb1* knock-out zebravis lijn gegenereerd. Onze studie heeft laten zien dat SCARB1 in zebravissen nog geen grote rol speelde in het cholesterol metabolisme. Deze functie is dus waarschijnlijk tijdens evolutie van zoogdieren belangrijk geworden. De verwachting was dat afwezigheid van SCARB1 in zebravissen zou leiden tot verhoogde cholesterol levels en verminderde productie van steroïde hormonen. Dit bleek niet het geval te zijn, wat suggereert dat waarschijnlijk andere scavenger receptoren in zebravissen een prominente rol spelen in deze processen. Omdat we hebben aangetoond dat stabiline 1 en 2 niet betrokken zijn bij het HDL-metabolisme, zou het interessant zijn om te onderzoeken of de LDL-receptor betrokken zou kunnen zijn bij de opname van HDL in de zebravis. Op dit moment is er niet veel bekend over de rol van de LDLr bij HDL en cholesterolopname in de zebravis. *Ldlra*$^{-/-}$ zebravissen hebben van nature een hoog cholesterolgehalte waardoor ze spontaan cholesterol ophopen in hun staartader[19].

Een verstoord cholesterolmetabolisme kan leiden tot fertiliteitsproblemen bij mensen en muizen[16,20]. *Ldlra*$^{-/-}$ zebravissen hebben geen vruchtbaarheidsproblemen. Ons onderzoek heeft echter laten zien dat *scarb1*$^{-/-}$ zebravissen wel vruchtbaarheidsproblemen hebben, ondanks dat hun cholesterolgehalte niet verschillend was in vergelijking met wild-type zebravissen. Deze bevindingen suggereren dat de fertiliteitsproblemen en het verminderde overlevingspercentage onafhankelijk is van de plasmacholesterol waarden of lipoproteïneopname. Terwijl bij zoogdieren de verminderde fertiliteit vooral te wijten is aan de verminderde vrouwelijke vruchtbaarheid, heeft onze studie aangetoond dat zowel mannelijke als vrouwelijke *scarb1*$^{-/-}$ zebravissen te kampen hebben met vruchtbaarheidsproblemen. Omdat bij zoogdieren gesuggereerd wordt dat zowel vitamine A als E de vruchtbaarheid kan beïnvloeden, zou het interessant zijn om te onderzoeken of deze factoren ook een rol zouden kunnen spelen bij *scarb1*$^{-/-}$ zebravissen.

De zebravis als diermodel heeft de laatste jaren veel populariteit gewonnen. De pathologie van verschillende ziekten zoals kanker, epilepsie, autisme, diabetes en bacteriële infecties etc. kan met behulp van zebravissen worden onderzocht[21-25]. Alhoewel de zebravis ook een opkomend diermodel leek te zijn voor onderzoek naar atherosclerose[26], heeft het onderzoek beschreven in dit proefschrift laten zien dat de zebravis niet geschikt is voor het bestuderen van vasculaire lipide ophoping en voor atherosclerose onderzoek. De zebravis is echter wel geschikt bevonden om verschillende processen die een rol spelen bij de ontwikkeling van atherosclerose, zoals lipoproteïne opname door macrofagen, te bestuderen.

Identificatie van nieuwe immunologische targets voor de behandeling van atherosclerose

Verschillende klinische studies hebben aangetoond dat modulatie van het immuunsysteem het verloop van hart- en vaatziekten positief zouden kunnen beïnvloeden[27-29]. Aangezien is gebleken dat naast cholesterol ook het immuunsysteem een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling atherosclerose, zijn in dit proefschrift twee mogelijk nieuwe therapeutische targets geïdentificeerd en getest: protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) (**hoofdstuk 5**) en interleukin 4-induced gene-1 (IL4i1) (**hoofdstuk 6**).

PRMT5

PRMT5 is onderdeel van de PRMT-familie van epigenetische modulatoren. Gezien de beschreven functie van PRMT 5 in ontsteking en metabolisme, is in hoofdstuk 5 de rol van PRMT5 in de ontwikkeling van atherosclerose geëvalueerd. De functie van PRMT5 is bestudeerd in zowel *in vitro* experimenten in gekweekte macrofagen als in een *in vivo* studie met atherosclerose gevoelige muizen (LDL receptor knock-out muizen). In beide studies is gebruik gemaakt van de specifieke PRMT5-remmer GSK3326595. *In vitro* resultaten hebben laten zien dat remming van PRMT5 kan leiden tot een verandering in het macrofaag fenotype, namelijk een verhoging van de macrofaag type 1 (M1)/ macrofaag type 2 (M2) verhouding. Belangrijk om te vermelden is dat deze effecten alleen werden waargenomen bij het toevoegen van interferon gamma (IFNg), een pro-inflammatoir cytokine, en niet bij toevoeging van andere stimuli aan de cellen. Deze resultaten zouden kunnen suggereren dat PRMT5 functie samenhangt met IFNg signalering. Bovendien heeft de studie van Fan *et al*. laten zien dat in reactie op toevoeging van IFNg, translocatie van PRMT5 kan plaatsvinden van het cytoplasma naar de kern van macrofagen, waar het kan binden aan de promotor van het MHCII-complex en zo de transcriptie ervan kan activeren. In overeenstemming met deze studie, zagen we in onze eigen *in vitro* studie dat remming van PRMT5 het relatieve expressieniveau van MHCII na IFNg-stimulatie aanzienlijk

omlaag brengt. Langdurige behandeling met een lage dosis GSK3326595 *in vivo* had geen invloed op de ontstekingsstatus (T-celsubsets en T cel activeringstoestand) of op de ontwikkeling van atherosclerose. Wel activeerde de behandeling genen die betrokken zijn bij de aanmaak van vetzuren in de lever, waaronder SREBF1, FASN en CD36. Daarnaast zorgde de behandeling met GSK3326595 tot een verhoging van de triglycerideniveaus in de lever. Samenvattend hebben de resultaten van onze studie laten zien dat inhibitie van PRMT5 door middel van toediening van GSK3326595 geen effectieve therapeutische benadering is om atherosclerose te moduleren. Op dit moment wordt GSK3326595 getest als therapie tegen kanker in zowel preklinische studies als in fase I en II klinische studies. Omdat onze resultaten hebben aangetoond dat behandeling met een lage dosis GSK3326595 leidt tot triglyceride-accumulatie in de lever, kan langdurige farmacologische remming van PRMT5 voor bijvoorbeeld de behandeling van kanker leiden tot ernstige bijwerkingen in de lever zoals niet-alcoholische vette leverziekte. Aanvullend onderzoek is daarom nodig om dit risico verder in kaart te brengen.

IL4i1

IL4i1 is een enzym dat wordt uitgescheiden door verschillende immuuncellen en kan het aminozuur fenylalanine omzetten in fenylpyruvaat, ammoniak en waterstofperoxide[30]. Daarnaast kan IL4i1 de immuunrespons moduleren door fenylalanine te oxideren en zo T- en B-celfuncties remmen[30]. Door de immuunregulerende functies van IL4i1 wordt het beschouwd als een veelbelovend therapeutisch target voor kanker en multiple sclerose[31,32]. Uit single cell sequencing analyse van humane atherosclerotische plaques is gebleken dat IL4i1 hoog tot expressie komt in macrofagen en co-lokaliseert met TREM2^{hi} macrofagen, die een rol spelen in atherosclerose[33]. Verder kan IL4i1 de polarisatie naar M2 macrofagen bevorderen die de T-celfuncties kunnen beïnvloeden[34]. Aangezien eerder onderzoek heeft aangetoond dat IL4i1 betrokken is bij de regulering van de functie van het immuunsysteem, zou IL4i1 ook de ontwikkeling en progressie van atherosclerose beïnvloeden. Ondanks de anti-inflammatoire eigenschappen van IL4i1 en dat remming van IL4i1 met de compound CB-668 leidt tot een pro-inflammatoire omgeving in athersclerotische plaques, laten we in hoofdstuk 6 zien dat remming van IL4i1 niet leidt tot verergering van atherosclerose. Belangrijk is dat immuuncellen verschillende functies vervullen in de diverse stadia van atherosclerose ontwikkeling. Macrofagen spelen een belangrijke rol bij het ontstaan van beginnende atherosclerotische plaques, terwijl T-cellen juist een meer prominentere rol spelen tijdens de progressie van atherosclerose. Omdat IL4i1 zowel op macrofagen als op T-cellen tot expressie komt, zou het interessant zijn om te onderzoeken of remming van IL4i1 de progressie van atherosclerotische laesies in een gevorderd stadia beïnvloedt, aangezien in dit stadium T-cellen een grotere rol spelen. Momenteel wordt de IL4i1

inhibitor CB-668 getest als nieuwe therapeutische behandeling voor kankerpatiënten. Een bijwerking van anti-kanker behandelingen is vaak de ontwikkeling van hart- en vaatziekten[35]. Uit onze studie is gebleken dat gebruik van CB-668 niet leidt tot een verhoogd risico op de ontwikkeling van atherosclerose. Dit zou erop kunnen wijzen dat behandeling met CB-668 veilig is voor kankerpatiënten, hoewel de effecten van de lange termijn behandeling in deze studie niet onderzocht zijn en daarbij dus niet uitgesloten kunnen worden. Daarnaast is het ook belangrijk om te onderzoeken of het gebruik van CB-668 bij kankerpatiënten met atherosclerose nog steeds gunstig is.

Toekomstperspectieven

De laatste jaren is er veel onderzoek gedaan naar de pathofysiologie van atherosclerose, waardoor het aantal potentiële nieuwe targets voor de behandeling van atherosclerose is toegenomen. Voor het opzetten van een atherosclerose studie is het van groot belang het juiste diermodel te kiezen. Er zijn namelijk meerdere diermodellen beschikbaar, elk met z'n eigen voor- en nadelen. Recentelijk is de zebravis naar voren gekomen als potentieel nieuw diermodel voor atherosclerose onderzoek. In dit proefschrift is beschreven dat wild-type zebravissen niet het beste model zijn om de ontwikkeling van atherosclerose, d.w.z. de accumulatie van foam cellen, te bestuderen. Genetisch gemodificeerde zebravissen, waaronder de *ldlra*$^{-/-}$ zebravis, zouden hiervoor meer geschikt kunnen zijn. Hoewel er een paar studies zijn die de mogelijkheid hebben aangetoond om atherosclerose te kunnen induceren in wild-type zebravissen, is onze studie tot dusver de enige studie die de co-lokalisatie van macrofagen met cholesterol na een 10-daags hoog cholesteroldieet heeft proberen te visualiseren. Dit laat het belang zien dat gepubliceerde resultaten in meerdere laboratoria moeten worden gevalideerd. Om dit te bereiken zijn duidelijke en gestandaardiseerde protocollen nodig en moeten manuscripten alle belangrijke details beschrijven die de uitkomsten van een dierproef kunnen beïnvloeden zoals soort dieet, fluorescerend label, zebravisstam enzovoorts. Een nuttige richtlijn die ervoor zorgt dat studies voldoende gedetailleerd worden gerapporteerd is de "Animals in Research: Reporting In vivo Experiments" (ARRIVE) richtlijn. Het rapporteren van dierproeven volgens deze richtlijnen helpt lezers en beoordelaars om de opzet van de studie te evalueren en geeft de mogelijkheid om de methoden of bevindingen te reproduceren.

Dit proefschrift heeft aangetoond dat zebravissen een goed modelorganisme kunnen zijn voor het bestuderen van bepaalde aspecten van het lipoproteïnemetabolisme en daarom alsnog zeer nuttig kunnen zijn voor translationeel onderzoek naar de pathofysiologie van atherosclerose. Het gebruik van de zebravis heeft duidelijke voordelen; het is een tijds- en kostenefficiënt diermodel dat real-time imaging toelaat en makkelijk genetisch gemodificeerd kan worden. Voor toekomstig onderzoek is het belangrijk dat alvorens

(genetisch gemodificeerde) zebravissen als modelorganisme worden gebruikt, dit specifieke model volledig wordt gekarakteriseerd en alle aspecten van atherosclerose duidelijk worden gedefinieerd, zodat dit de onderzoeksresultaten niet kan beïnvloeden. Hoewel zebravissen steeds populairder worden voor onderzoek naar atherosclerose, zijn muizenmodellen nog steeds de gouden standaard om nieuwe potentiële doelwitten te valideren. Uit ethisch oogpunt zou het uiteindelijk ideaal zijn dat de mechanismen van atherosclerose kunnen worden bestudeerd zonder diermodellen, bijvoorbeeld met *in vitro* modellen met een goede voorspellende waarde. Er zijn verschillende *in vitro* modellen, waaronder twee- en driedimensionale cel-modellen, beschikbaar om atherosclerose te onderzoeken en zo nieuwe potentiële therapeutische targets te valideren[36]. De voordelen van het gebruik van deze *in vitro* modellen voor het screenen van geneesmiddelen is dat de werkzaamheid en toxiciteit van een bepaald geneesmiddel al in een korte tijd (en daardoor dus meer kosteneffectief) kunnen worden onderzocht in vergelijking met het testen in diermodellen. Hoewel in de komende jaren *in vitro* modellen, met name de driedimensionale modellen zoals een vessel-on-a-chip, potentie hebben en daarom aan populariteit zullen winnen, zijn de reeds bestaande *in vitro* modellen tot nu toe nog onvoldoende in staat de pathofysiologie van atherosclerose in mensen, de interactie met het complexe immuunsysteem en de regulering van het cholesterol metabolisme volledig te modelleren. De toekomst zal uitwijzen welke modellen het best geschikt zijn om de mechanismen betrokken bij atherosclerose te onderzoeken om zo nieuwe potentiële cholesterol- en/of immuunsysteem gebaseerde therapeutische targets te identificeren die uiteindelijk gebruikt kunnen worden voor de behandeling van atherosclerose.

Conclusie

In dit proefschrift hebben we a) onderzocht of zebravissen gebruikt kunnen worden als diermodel voor onderzoek naar het cholesterol metabolisme en de ontwikkeling naar atherosclerose, b) de functie van de scavenger receptoren SCARB1 en stabilin 1 en 2 in cholesterolmetabolisme onderzocht en c) de potentie van 2 nieuwe immuun-gebaseerde therapeutische targets, PRMT5 en IL4i1, in de ontwikkeling atherosclerose bestudeerd. De resultaten (1) benadrukken het belang van een goede definitie van atherosclerose in zebravissen, aangezien dit de uitkomst van de studies kan beïnvloeden, (2) onderstrepen het belang (en de moeilijkheid) van het kiezen van het juiste diermodel voor uw onderzoek, aangezien elk model zijn voordelen en beperkingen heeft, (3) geven aan dat de functie van bepaalde receptoren in het lipoproteïnemetabolisme verschilt tussen zoogdieren en gewervelde dieren zoals de zebravis, en (4) suggereren dat de identificatie en validatie van nieuwe therapeutische targets tegen atherosclerose complex is en dat toekomstige therapeutische strategieën voor de behandeling van atherosclerose een combinatie van lipiden-verlagende en immuunsysteem-blokkerende middelen zullen moeten omvatten.

References

1. Tsao, C. W. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 145, (2022).
2. Bandyopadhyay, D. *et al.* Safety and Efficacy of Extremely Low LDL-Cholesterol Levels and Its Prospects in Hyperlipidemia Management. *J. Lipids* 2018, 8598054 (2018).
3. Ridker, P. M. The JUPITER Trial. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* 2, 279–285 (2009).
4. Stoletov, K. *et al.* Vascular Lipid Accumulation, Lipoprotein Oxidation, and Macrophage Lipid Uptake in Hypercholesterolemic Zebrafish. *Circ. Res.* 104, 952–960 (2009).
5. Yan, Y. *et al.* The important role of apolipoprotein A-II in ezetimibe driven reduction of high cholesterol diet-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis* 280, 99–108 (2019).
6. Yoon, Y. *et al.* High Cholesterol Diet Induces IL-1β Expression in Adult but Not Larval Zebrafish. *PLoS ONE* 8, (2013).
7. Bandaru, M. K. *et al.* Zebrafish larvae as a model system for systematic characterization of drugs and genes in dyslipidemia and atherosclerosis. *bioRxiv* 502674 (2019) doi:10.1101/502674.
8. Hölttä-Vuori, M. *et al.* Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem. J.* 429, 235–242 (2010).
9. Babin, P. J. *et al.* Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8622–8627 (1997).
10. Durliat, M., André, M. & Babin, P. J. Conserved protein motifs and structural organization of a fish gene homologous to mammalian apolipoprotein E. *Eur. J. Biochem.* 267, 549–559 (2000).
11. Otis, J. P. *et al.* Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis. Model. Mech.* 8, 295–309 (2015).
12. Moore, K. J. & Freeman, M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1702–1711 (2006).
13. Li, R. *et al.* Role of liver sinusoidal endothelial cells and stabilins in elimination of oxidized low-density lipoproteins. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G71–G81 (2010).
14. Manta, C.-P. *et al.* Targeting of Scavenger Receptors Stabilin-1 and Stabilin-2 Ameliorates Atherosclerosis by a Plasma Proteome Switch Mediating Monocyte/Macrophage Suppression. *Circulation* 146, 1783–1799 (2022).
15. Nahon, J. E. *et al.* Hematopoietic Stabilin-1 deficiency does not influence atherosclerosis susceptibility in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis* 281, 47–55 (2019).
16. Yates, M., Kolmakova, A., Zhao, Y. & Rodriguez, A. Clinical impact of scavenger receptor class B type I gene polymorphisms on human female fertility. *Hum. Reprod.* 26, 1910–1916 (2011).
17. Roberts, C. G. P. *et al.* Variants in Scavenger Receptor Class B Type I Gene Are Associated with HDL Cholesterol Levels in Younger Women. *Hum. Hered.* 64, 107–113 (2007).
18. Trigatti, B. *et al.* Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9322–9327 (1999).
19. Liu, C. *et al.* Modeling hypercholesterolemia and vascular lipid accumulation in LDL receptor mutant zebrafish. *J. Lipid Res.* jlr.D081521 (2017) doi:10.1194/jlr.D081521.
20. Miettinen, H. E., Rayburn, H. & Krieger, M. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)–deficient mice. *J. Clin. Invest.* 108, 1717–1722 (2001).
21. Kobar, K., Collett, K., Prykhozhij, S. V. & Berman, J. N. Zebrafish Cancer Predisposition Models. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, (2021).

22. Cho, S.-J., Park, E., Baker, A. & Reid, A. Y. Age Bias in Zebrafish Models of Epilepsy: What Can We Learn From Old Fish? *Front. Cell Dev. Biol.* 8, (2020).
23. James, D. M., Davidson, E. A., Yanes, J., Moshiree, B. & Dallman, J. E. The Gut-Brain-Microbiome Axis and Its Link to Autism: Emerging Insights and the Potential of Zebrafish Models. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, (2021).
24. Salehpour, A., Rezaei, M., Khoradmehr, A., Tahamtani, Y. & Tamadon, A. Which Hyperglycemic Model of Zebrafish (Danio rerio) Suites My Type 2 Diabetes Mellitus Research? A Scoring System for Available Methods. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, (2021).
25. Neely, M. N. The Zebrafish as a Model for Human Bacterial Infections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1535, 245–266 (2017).
26. Tang, D., Geng, F., Yu, C. & Zhang, R. Recent Application of Zebrafish Models in Atherosclerosis Research. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, (2021).
27. Ridker, P. M. *et al.* Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N. Engl. J. Med.* 380, 752–762 (2019).
28. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 1119–1131 (2017).
29. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* 381, 2497–2505 (2019).
30. Boulland, M.-L. *et al.* Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood* 110, 220–227 (2007).
31. Wang, Z., Li, T., Mao, C., Liu, W. & Tao, Y. IL4I1-driven AHR signature: a new avenue for cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 1–2 (2021).
32. Psachoulia, K. *et al.* IL4I1 augments CNS remyelination and axonal protection by modulating T cell driven inflammation. *Brain* 139, 3121–3136 (2016).
33. Porsch, F. *et al.* Haematopoetic TREM2 deficiency modulates atherosclerosis and lipid metabolism. *Atherosclerosis* 315, e58–e59 (2020).
34. Yue, Y. *et al.* IL4I1 Is a Novel Regulator of M2 Macrophage Polarization That Can Inhibit T Cell Activation via L-Tryptophan and Arginine Depletion and IL-10 Production. *PloS One* 10, e0142979 (2015).
35. Ruddy, K. J., Patel, S. R., Higgins, A. S., Armenian, S. H. & Herrmann, J. Cardiovascular Health during and after Cancer Therapy. *Cancers* 12, 3737 (2020).
36. Chen, J. *et al.* Recent Progress in in vitro Models for Atherosclerosis Studies. *Front. Cardiovasc. Med.* 8, (2022).