

Samenvatting



In dit proefschrift wordt het onderzoek naar de rol van celcyclus en apoptose genen in atherosclerose beschreven. Atherosclerose is de belangrijkste oorzaak van cardiovasculaire ziekten, een multi-factoriële aandoening die voornamelijk de grote en middelgrote vaten van het lichaam aantast. Alhoewel in het begin van de jaren 90 veelbelovende lipide verlagende therapieën een sterke reductie in cardiovasculaire mortaliteit voorspelden, is atherosclerose nog steeds de onderliggende oorzaak in 40% van alle sterfgevallen in de westerse samenleving. Dit geeft aan dat de behandeling van atherosclerose meer vereist dan enkel het verlagen van plasma-lipiden. Naast plasma lipiden spelen continue celgroei (celcyclus), celdood (apoptose en necrose) en ontstekingsprocessen een belangrijke rol in de ontwikkeling van atherosclerotische lesies. Om de rol van verschillende celcyclus en apoptose genen in de ontwikkeling van atherosclerose te bestuderen, hebben we verschillende muismodellen gemaakt en gekarakteriseerd.

Uitgaande van de bevindingen dat het volledig uitschakelen van de genen van onze interesse (nl. p53, Rb en Mdm2) leidt tot òf de vorming van tumoren wanneer de muizen 6 maanden en ouder zijn (bij p53) òf embryonale letaliteit (bij Rb en Mdm2) hebben we gebruik gemaakt van “site-specific recombinase (SSR)” technologie. Met deze techniek bereikten we celspecificiteit door het gebruik van het LysMCre muismodel (voor macrofagen) of het SM-CreER^{T2}(ki) muismodel (voor gladde spiercellen), twee celtypes die van groot belang zijn in atherosclerotische lesies.

Het tumor suppressor gen p53 remt celproliferatie en stimuleert apoptose in veel verschillende celtypes. Om de rol van macrofaag p53 in de ontwikkeling van atherosclerose te bestuderen, werden apoE-deficiënte muizen met een macrofaag-specifieke p53 deletie en controle muizen gemaakt (**hoofdstuk 2**). Macrofaag p53 werd in milde en ernstige atherosclerose bestudeerd. Macrofaag specifieke p53 deletie had geen effect op het oppervlak van de milde en ernstige atherosclerotische lesies, niet in het hartkleppengebied en ook niet in de aortaboog en thoracale aorta. In de milde atherosclerotische lesies leidde afwezigheid van macrofaag p53 tot een afname in apoptose. Dit had geen effect op de atherosclerotische lesie samenstelling. Echter, in de ernstige atherosclerotische lesies, leidde de afname van apoptose in p53-deficiënte muizen tot een toename in necrotische celdood, een toename van het schuimcel oppervlak, en een afname in de lipide afzettingen. Macrofaag-specifieke deletie van p53 had geen invloed op celproliferatie in zowel de milde als de ernstige atherosclerotische lesies. Deze studie laat zien dat macrofaag p53 een sterke regulator is van schuimcelapoptose en remming van deze route leidt tot een verschuiving van apoptotische celdood naar necrotische celdood van macrofagen, direct resulterend in veranderingen in lesie samenstelling.

Om de kennis van de rol van celcyclus genen in vasculaire ziekten verder te verbreden, hebben we de rol van macrofaag Retinoblastoma (Rb) in atherosclerose ontwikkeling onderzocht. Het tumor suppressor gen Rb reguleert zowel cel proliferatie als celdood in veel verschillende celtypes. In **hoofdstuk 3** beschrijven we de rol van macrofaag Rb in de ontwikkeling van atherosclerose zoals bestudeerd in apoE-deficiënte muizen. Gedurende 12 weken werden macrofaag-specifieke Rb deficiënte en controle muizen een cholesterol-rijk dieet gevoerd. Macrofaag-specifieke Rb deletie resulteerde in een sterke toename van het atherosclerotisch lesie

oppervlak. Bovendien werd de toename in atherosclerose gekarakteriseerd door de aanwezigheid van meer ernstige lesies met veel gladde spiercellen en weinig macrofagen. *In vitro* analyses lieten zien dat de toename in atherosclerose onafhankelijk was van opname van gemodificeerde lipoproteïnen of productie van cytokines door macrofagen. Macrofaag proliferatie was sterk verhoogd in de atherosclerotische lesies van macrofaag-specifieke Rb deficiënte muizen. Daartegenover, had macrofaag-specifieke Rb deletie geen effect op apoptose in de lesies. Deze studie laat duidelijk zien dat macrofaag Rb een remmende factor is in de ontwikkeling van atherosclerose via de reductie van macrofaag proliferatie.

Oncoproteïne Mdm2 remt p53 activiteit tijdens embryonale ontwikkeling en in volwassen homeostatische weefsels. Overexpressie van p53 kan worden geïnduceerd door specifieke inactivatie van zijn remmer Mdm2 (**hoofdstuk 4**). Om dit te bereiken werden muizen waarvan het Mdm2 gen “gefloxed” is, gecombineerd met muizen die het tamoxifen-induceerbare Cre-recombinase onder de controle van de SM22 promotor hebben (SM-CreER^{T2}(ki) muizen). Dit resulteerde in muizen die induceerbaar deficiënt waren voor Mdm2 in gladde spiercellen. Dit model had als doel om p53 overexpressie te bestuderen in de gladde spiercel-rijke cap van atherosclerotische lesies. Maar, na deletie van Mdm2 specifiek in gladde spiercellen, werden de muizen snel ziek en gingen dood, waardoor studies naar de rol van gladde spiercel p53 in atherosclerose niet uitgevoerd konden worden. Extra analyses aan het muismodel leverde onverwachts het bewijs dat Mdm2 ophoping van actief p53 in rustende gladde spiercellen voorkomt en daarmee de inductie van p53-gemedieerde necrotische celdood *in vivo*.

Hoofdstuk 5 beschrijft een methode om conditioneel en lokaal genen te modificeren in de vaatwand met een “perivasculaire drug delivery device (PDD)”. Een 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) PDD werd rond de carotis en femoralis van een muisstam geplaatst, die zowel het tamoxifen-induceerbare en gladde spiercel-specifieke Cre-recombinase (SM-CreER^{T2}(ki)) transgen als het “stop-floxed -galactosidase” gen in de Rosa26 locus heeft. Een dosiscurve van 0-10% (w/w) 4-OHT en tijdscurve van 0-14 dagen applicatie van de PDD resulteerde in optimale gen recombinatie bij 1% (w/w) 4-OHT, 7 dagen post applicatie. De hiermee verkregen recombinatie was gelijk aan de niveaus die bereikt werden met systemische toediening van tamoxifen en beperkte zich volledig tot het PDD-behandelde gedeelte van de vaatwand. Dus, lokale toediening van een 4-OHT PDD resulteerde in vasculaire gladde spiercel specifieke Cre-gemedieerde gen recombinatie zonder andere gladde spiercellen te beïnvloeden.

Naast celgroei en celdood speelt ontsteking een belangrijke rol in de ontwikkeling van atherosclerose. Immuuncellen zijn van groot belang in vroege atherosclerose ontwikkeling en hun “effector” moleculen versnellen de progressie van atherosclerose. Tumor necrosis factor- α (TNF α) is een cytokine met zowel celdood als ontstekings modulerende activiteit. Hoewel TNF α en zijn receptoren van belang zijn in een aantal biologische activiteiten die zeer relevant zijn voor atherosclerose, is de volledige rol van TNF α in de ontwikkeling van atherosclerose nog onduidelijk. Eerdere muizen studies lieten zien dat TNF α vroege atherosclerose ontwikkeling niet tot nauwelijks beïnvloedt. Om de rol van TNF α in ernstige en complexe atherosclerotische lesies te onderzoeken hebben we TNF α -deficiënte muizen gekruist

met APOE*3-Leiden muizen (**hoofdstuk 6**). Vervolgens werden de muizen gevoerd met een cholesterol-rijk dieet om atherosclerose te induceren. TNF α -deficiënte en controle muizen vertoonden gelijke niveaus van plasma cholesterol en triglyceriden en de systemische ontstekingsparameters "serum amyloid A" en "soluble intercellular adhesion molecule-1". Hoewel TNF α deficiëntie geen invloed had op het atherosclerose lesie oppervlak, hadden TNF α -deficiënte muizen een relatief hoger aantal vroege en relatief lager aantal ernstige lesies. Bovendien vertoonden de ernstige lesies in TNF α -deficiënte muizen een afname in necrose en een toename in apoptose. We concluderen dat TNF α de vorming van ernstigere lesies met meer necrose en een lagere incidentie van apoptose stimuleert.

"Peroxisome proliferator activated receptoren" (PPAR) zijn nucleaire receptoren die aanwezig zijn in verschillende organen en celtypen. PPAR alpha (α) en gamma (γ) zijn de belangrijkste subtypes van deze receptoren en beïnvloeden celproliferatie, differentiatie, apoptose en ontsteking, maar ook lipide metabolisme en glucose homeostase via transcriptionele activatie of repressie van genen of via DNA-bindings-onafhankelijke routes. In atherosclerose leidt PPAR α en PPAR γ activatie tot een reductie van atherogene triglyceriden en systemische ontstekingsfactoren, een toename in HDL niveaus en een verbetering van insuline resistentie. Op cellulair niveau werken PPAR α/γ agonisten op de meeste celtypen die van belang zijn in atherosclerose, waardoor de betrokkenheid van deze celtypen in de ontwikkeling van de atherosclerotische lesie wordt verminderd. In **hoofdstuk 7** onderzochten we de anti-atherogene effecten van de gecombineerde PPAR α/γ agonist tesaglitazar in APOE*3-Leiden muizen, met een normale en gereduceerde insuline gevoeligheid. De APOE*3-Leiden muizen werden in twee verschillende dieet groepen ingedeeld. De eerste groep kreeg een laag-vet dieet en de tweede groep een hoog-vet insuline-resistentie-inducerend dieet. In zowel de laag-vet als de hoog-vet muizen kreeg één groep een hoog-cholesterol supplement. Een tweede groep kreeg ook dit hoog-cholesterol supplement, maar nu met tesaglitazar als toevoeging. Een derde groep kreeg een laag-cholesterol supplement, wat resulteerde in plasma cholesterol niveaus die gelijk waren aan de plasma cholesterol niveaus in de tesaglitazar behandelde groep. Analyses van atherosclerose, in zowel het hartkleppengebied als in de aortaboog (*en face* analyse), lieten zien dat tesaglitazar anti-atherosclerotische effecten heeft. Deze anti-atherosclerotische effecten werden niet enkel geïnduceerd door plasma cholesterol verlaging en bleken sterker in muizen op een hoog-vet dieet. Tesaglitazar behandeling resulteerde ook in een afname van ontstekings parameters zoals "plasma serum amyloid A" (SAA), het aantal aanhechtende monocytten en "Nuclear Factor Kappa-B" (NF κ B) activiteit in de vaatwand. Het zijn waarschijnlijk deze anti-inflammatoire eigenschappen van tesaglitazar die zorgen voor een additionele reductie in atherosclerose.

