

Heterogeneity in human atherosclerotic gene expression profiles from man to macrophages

Citation for published version (APA):

Kisters, N. (2008). Heterogeneity in human atherosclerotic gene expression profiles from man to macrophages. Maastricht: Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Cardiovascular diseases, such as myocardial infarction and stroke, are the leading cause of death in the western society. The main underlying pathology of many cardiovascular diseases is atherosclerosis. Atherosclerosis is a progressive, lipid associated inflammatory disease of the larger and medium sized arteries. The early stages of atherosclerosis, which already develop during the first decade of life, usually do not give any clinical symptoms. As the atherosclerotic lesions progress in time they can become more unstable and eventually rupture. Rupture of such an atherosclerotic lesion and the subsequent thrombus formation will lead to the acute clinical complications such as myocardial infarction and stroke.

At present the exact molecular mechanisms underlying (human) atherosclerosis are not fully elucidated. One way to unravel these molecular mechanisms is by performing genome wide gene expression studies such as microarray hybridizations. A potential concern of these human expression studies is the variability or heterogeneity which might be present between or within the samples. This heterogeneity will be reflected in the gene expression profiles and can lead to a decrease in statistical power. The major changes in gene expression profiles, caused by for instance changes in celltypes, locations of the vascular bed or patients, will be detected despite the variability/heterogeneity. However subtle changes in gene expression profiles between a certain patient population, vascular bed or celltype can be missed because of the heterogeneity. Our main hypothesis is that a study design which takes heterogeneity into account will enable the detection of genes and/or pathways that show subtle changes in expression. To test this hypothesis we first defined the different levels of heterogeneity, i.e. sample source heterogeneity, patient heterogeneity and lesion heterogeneity (as described in chapter 1). Subsequently we designed each study in such way that the influence of the defined sources/levels of heterogeneity could be investigated.

In chapter 2 and 3 we focused on sample source heterogeneity. In chapter 2 we compared the gene expression profiles from advanced atherosclerotic lesions obtained either during autopsy or surgery to study the influence of sample source heterogeneity. The gene expression profiles of advanced atherosclerotic lesions obtained during surgery or autopsy are largely similar. However, over 500 genes, mostly involved in basal cell metabolism and hypoxia, were differentially expressed at the mRNA level. Although differential gene expression of the hypoxia-related genes could not be confirmed at the protein level, human gene expression using samples from both sources should be analyzed with care.

Summary

In chapter 3 we compared the gene expression profiles from stable atherosclerotic lesions obtained from various sites of the vasculature. Our analysis revealed several genes to be specifically differentially expressed in the abdominal aorta (36 genes), thoracic aorta (57 genes), aortic arch (58 genes) and the carotid artery (58 genes). Pathway analysis and literature mining on these specific genes could associate several biological processes with a single site of the vascular bed. These data could provide new insights in site specific mechanisms of atherosclerosis and could be further explored to unravel the mechanisms underlying the different susceptibility of distinct sites of the vasculature to develop atherosclerosis.

In chapter 4 of this thesis we performed an intra vessel comparison to eliminate heterogeneity introduced by combining different patients, for instance gender, age and use of medications. We compared the gene expression profiles from early and advanced atherosclerotic lesions within the same carotid artery. Pathway analysis revealed a group of genes with only subtle but consistent upregulated expression levels in advanced atherosclerotic lesions compared to early lesions. These genes were involved in either the intrinsic or extrinsic initiation pathways of apoptosis. One of the genes known to be involved in the initiation of the extrinsic apoptosis pathway, TRAIL, was further validated in vitro. These in vitro studies showed that TRAIL was able to induce apoptosis in macrophages. These data together with the gene expression data indicate TRAIL to be an interesting candidate for therapeutic interventions in atherosclerosis.

In chapter 5 we studied the effect of deficiency of cathepsin K, one of the genes identified to be differentially expressed in chapter 4, on atherogenesis by performing gene expression profiling on aortic arches of *catK*^{-/-} *apoE*^{-/-} and *apoE*^{-/-} mice. Pathway profiling linked the differentially expressed genes CD36 and caveolin-1, 2 and 3 to the lipid metabolism. In vitro validation of these microarray data confirmed the contribution of both CD36 and the caveolins in foam cell formation in cathepsin K deficient mice. In addition, the microarray data suggested that cathepsin K deficiency not only alters the lesion phenotype by decreasing proteolytic activity but also by increasing TGF β signaling.

In chapter 6 and 7 cellular heterogeneity was addressed. In chapter 6 we compared the gene expression profiles of macrophages microdissected from early lesions with macrophages from advanced atherosclerotic lesions. Pathway profiling of the differential expressed genes revealed prominent roles for pathways involved in cell death, cell cycle, cellular growth and proliferation and cell-cell interaction and signaling in atherosclerotic macrophages. These pathways contained several genes related to TGF β and two interesting

transcription factors, ID4 and TGIF. These two transcription factors were upregulated in macrophages from advanced lesions compared to macrophages from early lesions. Interestingly, both these genes were also expressed at significantly higher levels in atherosclerotic macrophages compared to macrophages from non-atherosclerotic tissues, such as liver, lung and spleen. Although the role of TGIF and ID4 during atherogenesis remains to be defined it is tempting to speculate that both genes form an attractive molecular target to modulate the progression of atherosclerosis. In chapter 7 we further studied atherosclerotic macrophage specific gene expression by comparing the transcriptional profiles of atherosclerotic macrophages and non-atherosclerotic macrophages from liver, lung and spleen. Microarray analysis revealed 42 genes showing significantly higher expression levels in atherosclerotic macrophages. One of these genes was TWIST1, a transcription factor known to be involved in inflammation but not linked to atherosclerosis before. Validation of the microarray confirmed higher TWIST expression in atherosclerotic macrophages and demonstrated the absence of TWIST1 protein expression in the macrophages from 11 non-atherosclerotic macrophages. In contrast, foam cells in gallbladder and xanthelasma did show TWIST1 protein expression. In vitro experiments further showed an increase in TWIST expression during foam cell formation and in response to LPS stimulation. These data demonstrate that TWIST is specifically expressed in foamy macrophages and macrophages subjected to inflammatory stimuli such as LPS.

In chapter 8 the findings of this thesis and their implications are discussed. We showed that variability in the gene expression profiles could be introduced from the patient down to the cellular level. We conclude that the research question should determine the allowed level of heterogeneity and therefore the experimental setup. The development of amplification techniques to obtain sufficient RNA from as little as a few cells has opened ways to minimize heterogeneity. By decreasing the heterogeneity in an experimental design in combination with the introduction of pathways analysis we provide an elegant research strategy to identify novel genes and pathways underlying atherosclerosis.

SAMENVATTING

In de westerse wereld zijn cardiovasculaire ziekten zoals een hartinfarct en een herseninfarct de belangrijkste doodsoorzaak. De onderliggende oorzaak van deze cardiovasculaire ziekten is atherosclerose (aderverkalking). Atherosclerose is een progressieve, vet geassocieerde ontstekingsziekte van de middelgrote en grote bloedvaten. De eerste stadia van atherosclerose ontstaan al in de eerste decennia van het leven, maar deze vroege laesies veroorzaken geen klinische complicaties. Naar mate de atherosclerotische laesies groter of gecompliceerder worden kunnen ze instabiel worden en uiteindelijk open scheuren (ruptureren). Wanneer een laesie ruptureert, wordt de inhoud van de laesie blootgesteld aan het bloed waardoor er een bloedstolsel ontstaat (een thrombus). Deze thrombus kan het bloedvat compleet afsluiten en hierdoor ontstaan de klinische symptomen zoals een hartinfarct en een herseninfarct.

Op dit moment zijn de moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan en verergeren van atherosclerose nog niet helemaal ontrafeld. Er zijn verschillende manieren om dit te onderzoeken. Een manier is om de genexpressie te besturen door gebruik te maken van microarrays. Genen zijn de bouwstenen van ons lichaam. Door te kijken hoeveel en welke bouwstenen er in het ene weefsel monster zitten ten op zichte van het ander, kunnen we een uitspraak doen over de processen die geactiveerd zijn in het ene monster ten op zichte van het ander. Een microarray is een glaasje waarop bijna alle bouwstenen van ons lichaam, een genexpressie profiel, geprint zijn en waarmee we in één keer iets kunnen zeggen over de activatie van al die bouwstenen. Een potentiële zorg van humane genexpressie studies is de heterogeniteit of variabiliteit die mogelijk aanwezig is tussen of in verschillende weefselmonsters. De variabiliteit tussen of in de monsters zal immers weerspiegeld worden in de genexpressie profielen. Dit kan ten koste gaan van de statistische power die nodig is om verschillen te kunnen detecteren. Ondanks heterogeniteit kunnen we de grote verschillen tussen onze groepen detecteren. Echter, de subtiele verschillen in de genexpressie profielen van bijvoorbeeld laesies op een specifieke plek in het vaatbed, een bepaalde groep patiënten of een bepaald type cellen in de laesie zullen waarschijnlijk gemist worden. In dit proefschrift hebben we onderzocht wat het effect is op de genexpressie profielen wanneer we de heterogeniteit zo klein mogelijk maken. Hiervoor hebben we eerst een aantal vormen van heterogeniteit gedefinieerd, te weten weefselmonster oorsprong heterogeniteit, patiënt heterogeniteit en laesie heterogeniteit (dit staat beschreven in hoofdstuk 1). Vervolgens hebben we elke studieopzet zo gedefinieerd dat het mogelijk was om de invloed van een van de hierboven genoemde vormen van heterogeniteit te bestuderen.

Om de genexpressie profielen van humane atherosclerotische laesies te kunnen bestuderen zijn we vaak genoodzaakt weefselmonsters gebruiken die afkomstig zijn van verschillende plekken in het lichaam of van levende en overleden donoren. Het combineren van monsters van verschillende oorsprong kan heterogeniteit introduceren en dit type heterogeniteit hebben we onderzocht in hoofdstuk 2 en 3.

In hoofdstuk 2 zijn de genexpressie profielen van gevorderde atherosclerotische laesies, die verkregen zijn van een levende donor (tijdens een operatie) vergeleken met de profielen afkomstig van een overleden donor (via obductie). De resultaten van de microarray analyse en de daaropvolgende validatie door middel van kwantitatieve PCR en immunohistochemie lieten zien dat de genexpressie profielen van vergevorderde atherosclerotische laesies van obductie en operatie grotendeels vergelijkbaar waren. De verschillen in genexpressie die werden waargenomen spelen een rol in hypoxie gerelateerde processen en basale cel processen. We concluderen dan ook dat humane genexpressie studies die weefselmonsters gebruiken afkomstig van zowel operatie en obductie zorgvuldig geanalyseerd moeten worden, vooral wanneer men geïnteresseerd is juist deze processen.

In hoofdstuk 3 hebben we de genexpressie profielen van stabiele atherosclerotische laesies, verkregen van verschillende plekken in het lichaam met elkaar vergeleken. De analyse methode die we hebben gebruikt, leverde een kleine hoeveelheid genen op die specifiek voor een bepaalde plek in het lichaam verschillend tot expressie kwamen ten opzichte van het referentie bloedvat. Het bestuderen van de literatuur van deze specifieke genen in combinatie met het toepassen van pathway profiling programma's liet ons zien dat specifieke biologische processen geassocieerd waren met de verschillende plekken van het lichaam. Zo zijn bijvoorbeeld specifiek in de halsslagader genen verschillend geïdentificeerd die betrokken zijn bij het ontstekings/ en immuniteits proces. De resultaten van deze studie kunnen leiden tot het verkrijgen van nieuwe inzichten in het ontstaan van atherosclerose op specifieke plekken in het lichaam.

Het combineren van weefselmonsters verkregen van meerdere patiënten in een studie kan ook heterogeniteit introduceren vanwege onderlinge verschillen. Ze kunnen bijvoorbeeld verschillen in geslacht, leeftijd, levensstijl en geneesmiddelengebruik. Om deze heterogeniteit te verminderen hebben we in hoofdstuk 4 de genexpressie profielen van vroege en vergevorderde laesies binnen één bloedvat (dus binnen één patient) met elkaar vergeleken. De microarray analyse in combinatie met het toepassen van pathway profiling leverde een groep genen op die marginaal, maar consequent verschillend waren

Samenvatting

tussen de twee laesie stadia. Al deze genen kwamen meer tot expressie in het late laesie stadium en waren betrokken bij het induceren van geprogrammeerde celdood (apoptose). Van een van deze genen, TRAIL, is al eerder aangetoond dat het betrokken was bij het induceren van apoptose. Verdere validatie in vitro liet zien dat dit gen in staat was apoptose te induceren in een belangrijk celtype van de atherosclerotische laesie, de macrofaag. Deze resultaten wijzen erop dat TRAIL een interessante kandidaat zou kunnen zijn voor therapeutische interventies binnen atherosclerose.

In hoofdstuk 5 werd het effect op atherosclerose bestudeerd van cathepsine K deficiëntie, een ander interessant gen dat verschillend tot expressie kwam in hoofdstuk 4. Cathepsine K is een proteolytisch enzym dat de matrix rondom cellen kan afbreken en zo mogelijk een rol in de progressie van atherosclerose speelt. Hiervoor werden de genexpressie profielen van aortabogen van cathK-/-/apoE-/- en apoE-/- muizen met elkaar vergeleken door middel van microarrays. Pathway profiling onthulde een mogelijke rol voor CD36 en caveolines in de functie van cathepsine K in atherosclerose. In vitro validatie experimenten hebben vervolgens bevestigd dat CD36 en de caveolines van belang zijn bij de schuimcelvorming in cathepsine K deficiënte macrofagen. Daarnaast suggereerde de pathway profiling resultaten dat cathepsine K deficiëntie niet alleen via vermindering van proteolytische activiteit maar ook als gevolg van stimulering van de TGF β signalering tot een stabielere laesie fenotype zou kunnen leiden.

Een atherosclerotische laesie bestaat uit verschillen celtypen met elk hun eigen karakteristieke eigenschappen. Wanneer de laesie in zijn geheel onderzocht wordt, kan het verschil in genexpressie van één specifiek celtype verloren gaan. In hoofdstuk 6 en 7 hebben we de invloed van deze cellulaire heterogeniteit bestudeerd.

In hoofdstuk 6 hebben we macrofagen uit vroege en vergevorderde atherosclerotische laesies geïsoleerd en de genexpressie profielen van deze macrofagen met elkaar vergeleken. Ook nu weer hebben we pathway profiling gebruikt om de rol te bepalen van de genen die verschillen tussen de macrofagen van vroege en vergevorderde laesies. De verschilgenen zijn betrokken bij processen zoals de celcyclus, celdood, celgroei en -proliferatie, cel-cel interacties en signalering. Deze processen bevatten veel genen die verbonden zijn aan de TGF β pathway en twee interessante transcriptie factoren, ID4 en TGIF. Deze transcriptie factoren kwamen meer voor in macrofagen van een vergevorderde vergeleken met een vroege atherosclerotische laesie. Zeer interessant was het feit dat deze transcriptie factoren ook meer voorkwamen in macrofagen van atherosclerotische laesies in vergelijking met macrofagen van

niet-atherosclerotische weefsels zoals lever-, milt- en longweefsel. Hoewel de precieze rol van deze twee transcriptie factoren in atherosclerose nog verder onderzocht dient te worden is het verleidelijk om te speculeren dat beide genen een aantrekkelijk moleculair target zouden kunnen zijn om de progressie van atherosclerose te moduleren.

In hoofdstuk 7 hebben we genexpressie specifiek voor de atherosclerotische macrofaag verder bestudeerd door de genexpressie profielen van de atherosclerotische macrofaag te vergelijken met die van niet-atherosclerotische macrofagen van lever, milt en longen. De microarray resultaten lieten 42 genen zien die meer voorkwamen in atherosclerotische macrofagen dan in macrofagen uit de niet-atherosclerotisch weefsels. Een van deze genen was TWIST1, een transcriptie factor die wel al verbonden was aan ontsteking, maar nog niet aan atherosclerose. Validatie experimenten bevestigde dat TWIST1 meer voorkwam in atherosclerotische macrofagen en dat het TWIST1 eiwit niet aanwezig was in de macrofagen van 11 onderzochte niet-atherosclerotische weefsels. Wanneer we echter (niet-atherosclerotische) weefsels onderzochten waarin veel schuimcel macrofagen aanwezig zijn, dan bleek in deze schuimcel macrofagen wel TWIST1 voor te komen. In vitro experimenten lieten vervolgens zien dat de hoeveelheid TWIST1 toenam gedurende schuimcelvorming en als gevolg van stimulatie met ontstekingsmediatoren zoals LPS. Deze data geven aan dat TWIST1 specifiek is voor schuimcel macrofagen en macrofagen die gestimuleerd worden door een ontstekingsstimulus.

In hoofdstuk 8 hebben we de bevindingen van dit proefschrift en de verdere implicaties bediscussieerd. We hebben laten zien dat variabiliteit in genexpressie profielen geïntroduceerd kan worden vanaf patiënt nivo tot aan het cellulaire nivo. We concluderen dat de onderzoeksvraagstelling het toelaatbare nivo van heterogeniteit zou moeten bepalen. Verder hebben we laten zien dat het mogelijk is om vanuit enkele cellen voldoende materiaal te verkrijgen en te vermeerderen, zodat analyse van genexpressie mogelijk is met minimaal heterogeniteit. Het verminderen van heterogeniteit in combinatie met pathway profiling technieken is een elegante researchstrategie om nieuwe genen en pathways te identificeren die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van atherosclerose. Met deze kennis kunnen dan betere (individuele) therapieën ontwikkeld worden om hart- en vaatziekten tegen te gaan.