

The role of phospholipases in atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Ghesquiere, S. A. I. (2006). *The role of phospholipases in atherosclerosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060607sg>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060607sg](https://doi.org/10.26481/dis.20060607sg)

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

Atherosclerosis is an inflammatory disease of the large arteries, characterized by the accumulation of modified low-density lipoproteins (LDL). Native LDL is not retained in the vessel wall, unless it is oxidatively and enzymatically modified. Amongst the most prominent enzymes responsible for LDL modification are the secreted phospholipases A₂ (sPLA₂), which hydrolyse phospholipids at their sn-2 position, releasing free fatty acids and lysophospholipids. As such, phospholipase activity can modify phospholipids in the LDL particles enhancing their pro-atherosclerotic properties. At the same time, the generated FFA and lysoPL products are converted into potent inflammatory mediators, which can also highly affect atherogenesis.

Several members of the phospholipases A₂ family have been shown in atherosclerotic lesions. In this study, the main focus was given to sPLA₂ group IIA (chapter 3 and 6), sPLA₂ group X (chapter 4, 5 and 6), and sPLA₂ group VII or platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) (chapter 6). Additionally we investigated enzymes crucial in the processing of the arachidonic acid, which is liberated as result of phospholipase activity (chapter 6).

To study the role of sPLA₂ IIA in macrophages during atherogenesis, transgenic mice were generated using the human sPLA₂ IIA gene and the CD11b promoter (chapter 3). We performed bone marrow transplantations to LDLR deficient mice to study sPLA₂ IIA in an atherosclerotic susceptible mouse model. After 10 weeks on a high fat diet, the mice overexpressing sPLA₂ IIA in macrophages showed 2.3 fold larger lesions as compared to controls. Examination revealed that sPLA₂ IIA expressing mice had increased collagen in their lesions, independent of lesion size. However, smooth muscle cells or fibroblasts in the lesions were not affected, neither did we find significant changes in T-cell quantities and cell turnover as result of sPLA₂ IIA overexpression. Our data clearly show that macrophage sPLA₂ IIA promotes lesion growth, but at the same time enhances collagen production in the plaque and thus fibrotic cap development, which suggests improved plaque stability. Another indication that sPLA₂ IIA contributes to plaque stabilisation was obtained in human atherosclerotic lesions (chapter 6), where sPLA₂ IIA expression was remarkably decreased in ruptures lesions when compared to advanced and early lesions.

In chapter 4 and 5 we studied the involvement of macrophage sPLA₂ X in atherosclerosis and inflammation. sPLA₂ X is much more active on cell membranes and LDL particles than sPLA₂ IIA. We have been able to show sPLA₂ X expression in murine macrophages. To investigate the role of sPLA₂ X in inflammation and atherosclerosis, we generated a macrophage specific construct, in analogy with our sPLA₂ IIA construct used in chapter 2. This time, however, we used the macrophage specific CD68 promoter instead of the CD11b promoter.

First, we used the CD68 sPLA₂ X construct to transfect RAW264.7 cell lines and we obtained several stable cell lines expressing the sPLA₂ X construct. Prior to performing experiments, phospholipase activity was measured to confirm the production of enzymatically active sPLA₂ X. We found that sPLA₂ X overexpression in macrophages strongly increased foam cell formation upon incubation with native LDL, which indicates that sPLA₂ X is capable to contribute to atherosclerotic lesion formation. The next step was to use these macrophage cell lines for

activation experiments (chapter 4). Our results revealed a novel role for sPLA₂ X, as sPLA₂ X overexpression inhibited lipopolysaccharide-induced macrophage-activation, characterized by reduced cell adhesion, lower levels of TNF secretion and increased interleukin-10 production. These effects are likely mediated by increased prostaglandin E₂ and 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ production, as our results show. Our experiments show a potentially two-faced role for sPLA₂ X in atherosclerosis, with promoting foam cell formation and at the same time reducing the inflammatory response in macrophages.

Besides in vitro experiments with sPLA₂ X overexpression, we decided to examine the role of sPLA₂ X in atherosclerosis formation with a transgenic mouse model. Unfortunately, it proved hard to establish viable mouse lines with the CD68 sPLA₂ X construct, despite numerous attempts. Only a few transgenic mice were born, which either died within weeks after birth, or failed to transfer the sPLA₂ X gene to their offspring. Nevertheless, we took the opportunity to examine the transgenic mice we managed to obtain. In the mice that spontaneously died we observed severe lung pathology, with massive macrophage invasion and additional protein and lipid accumulation. The mice that failed to transfer the sPLA₂ X gene showed much milder lung pathology, but also exhibited increased macrophage infiltration. We could not find signs of infections in our mice that could have produced this pathology.

While several phospholipases have been found in atherosclerotic lesions, such as sPLA₂ IIA and sPLA₂ X, little is known about the role and expression of these phospholipases during plaque development. We therefore investigated the expression patterns of sPLA₂ IIA, sPLA₂ X, and PAF-AH in human atherosclerotic lesions. In our analysis we included enzymes involved in pathways closely connected to phospholipase activity, such as 5-lipoxygenase (5-LO), cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E₂ synthase (mPGES) (chapter 6). Arterial plaque material from 13 patients was collected and classified into an early, advanced, and ruptured group. mRNA was isolated and the expression of selected genes was quantified by realtime PCR. Interestingly, our results showed a strong decrease in sPLA₂ IIA expression in ruptured lesions, indicating a role for this enzyme in lesion stability. While not quantified, the early, and advanced lesions exhibiting high sPLA₂ IIA expression levels had a thick, fibrous cap and a stable phenotype. This is nicely in line with our results with sPLA₂ IIA overexpression in mice (chapter 3), where we found increased collagen deposition due to sPLA₂ IIA overexpression. Conversely, PAF-AH expression levels were increased in ruptured lesions. Considering the previously established correlation between plasma PAF-AH and coronary artery disease, our results suggest that intra-plaque PAF-AH similarly contributes to lesion destabilisation. Our results, in combination with the results published by other groups, show a potentially active role of PAF-AH in atherosclerotic progression and rupture rather than being a mere risk marker. Interestingly, the expression of the sPLA₂ X did not differ between the early, advanced, and ruptured lesions. This is similar to what we have found in chapter 4, where we have shown that sPLA₂ X is not regulated by lipopolysaccharide (LPS) stimulation. There are strong indications that sPLA₂ X is constitutively expressed under most circumstances, although differences in basic expression levels between individuals can be of importance. As

such, sPLA₂ X expression patterns should be studied in larger population studies. Phospholipase activity results in the production of AA, which can be transformed and metabolised into a whole myriad of anti- and pro-inflammatory eicosanoids. As such, it is pivotal to understand which pathways are activated during and after phospholipase activity in the atherosclerotic plaque. Therefore we included several key enzymes in our study, COX-2 and mPGES from the prostaglandin synthesis pathway, and 5-LO from the leukotriene pathway. Our results are very interesting, as we observed increased COX-2 expression in the ruptured lesions, which did not come with increased mPGES expression. This might indicate that prostaglandins other than prostaglandin E₂ are produced in ruptured lesions. Because it is not clear to which extent this affects atherosclerosis and plaque stability, future research should expand to inclusion of other prostaglandin synthases, such as prostaglandin I₂ synthase (PGIS) and prostaglandin D₂ synthase (PGDS). The 5-LO expression levels in advanced and ruptured lesions were strongly increased, which confirms the involvement of leukotrienes in atherosclerotic plaque severity. This finding is supported by previous studies, where a correlation between lesion severity and 5-LO concentrations was found.

In conclusion: our results show that phospholipases, although they contribute to lesion growth, are not necessarily harmful due to their capacity to stabilize atherosclerotic lesions and reduce the detrimental inflammatory processes associated with atherosclerosis.

Samenvatting

Atherosclerose, ook wel bekend als 'aderverkalking', is de onderliggende oorzaak van veel hart- en vaatziekten. Kenmerkend aan deze aandoening is de stapeling van vetten en cellen in de vaatwand. Het gevolg hiervan is dat het vat nauwer wordt, hetgeen de bloedstroom kan belemmeren. Nog problematischer wordt het als de plaque scheurt en vervolgens stolsels gevormd worden die verstoppingen in het vaatstelsel kunnen veroorzaken. Vaak gebeurt dat in de coronaire vaten, waardoor de bloedvoorziening van de hartspier in het gedrang komt, met een 'hartaanval' als gevolg.

Het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift richt zich op het ontstaan en de groei van atherosclerotische plaques. Het stapelen van vet, in de vorm van van LDL (low-density lipoproteins) in de vaatwand, en de opname ervan door macrofagen liggen aan de basis van plaquevorming. LDL deeltjes zijn verantwoordelijk voor vet- en cholesterol-transport van de organen naar de lever. Ze bestaan uit een eiwit, ingebed in een membraan van fosfolipiden, en zijn gevuld met cholesterol en lipiden. LDL deeltjes komen door diffusie in de vaatwand terecht en worden vervolgens opgeruimd door macrofagen. Door oxidatie en enzymatische activiteit kan het LDL gaan binden aan moleculen in de vaatwand en hoopt het LDL op. Daarnaast wordt de opname en verwijdering door macrofagen verstoord, en raken de macrofagen gevuld met vetdeeltjes en veranderen ze in 'schuimcellen'. Dit vormt de aanzet tot de vorming van een atherosclerotische plaque.

De voornaamste enzymen die LDL modificeren en LDL stapeling in de vaatwand en de vorming van schuimcellen veroorzaken zijn de secretoire fosfolipasen. Deze enzymen breken fosfolipiden af die een hoofdbestanddeel vormen van celmembranen en LDL deeltjes. De hierbij vrijkomende vrije vetzuren (o.a. arachidonzuur) en lysosofolipiden beïnvloeden ontstekingsprocessen, die dan weer een rol spelen in de ontwikkeling van atherosclerose.

In dit proefschrift wordt vooral de aandacht gegeven aan secretoir fosfolipase-A₂ groep IIA (sPLA₂ IIA) (hoofdstuk 3 en 6) en groep X (sPLA₂ X) (hoofdstuk 4, 5 en 6). In mindere mate komt ook groep VII (hoofdstuk 6), ook wel bekend als (bloed)plaatjes activerende factor acetylhydrolase (PAF-AH) aan bod. Daarnaast hebben we in hoofdstuk 6 enzymen bestudeerd die arachidonzuur omzetten in ontstekingsmediatoren.

Om de rol van sPLA₂ IIA in atherosclerose te onderzoeken (hoofdstuk 3) hebben we een transgene muis gemaakt met het sPLA₂ IIA gen van de mens. Om de sPLA₂ IIA productie te beperken tot de atherosclerotische plaques is het gen voorzien van een macrofaag specifieke promotor. Vervolgens is het beenmerg van deze muizen getransplanteerd naar een muismodel voor atherosclerose: de LDL receptor deficiënte muis. De muizen werden vervolgens 10 weken op een vetrijk dieet gezet. Na afloop stelden we vast dat de muizen die sPLA₂ IIA beenmerg hadden gekregen gemiddeld 2.3 maal grotere atherosclerotische lesies hadden dan muizen die gewoon beenmerg ontvangen hadden. Niet alleen waren de lesies groter, ze bevatte in verhouding veel meer collageen. Dit is interessant omdat collageen een plaque sterker en stabiel maakt, waardoor deze minder snel scheurt. In het aantal gladde spiercellen, fibroblasten, T-cellen en celdelingen waren er geen verschillen. De resultaten van dit experiment laten zien dat sPLA₂ IIA de groei van atherosclerotische plaques bevordert, maar deze eveneens stabiel maakt. Dat

sPLA₂ IIA de stabiliteit van plaques beïnvloedt komt overeen met de vaststelling dat opengescheurde humane plaques aanzienlijk minder sPLA₂ IIA tot expressie brachten dan vroege en gevorderde lesies en daardoor mogelijk minder stabiel waren (hoofdstuk 6).

In hoofdstuk 4 en 5 worden de resultaten behandeld van onze experimenten met sPLA₂ X. Dit enzym is vele malen actiever op celmembranen en LDL dan sPLA₂ IIA. sPLA₂ X komt voor in atherosclerotische plaques en macrofagen. Door sPLA₂ X mRNA aan te tonen lieten we zien dat sPLA₂ X ook daadwerkelijk door macrofagen geproduceerd wordt. Om de rol van sPLA₂ X te kunnen onderzoeken werd het humane sPLA₂ X gen voorzien van een macrofaag specifieke CD68 promotor en ingebracht in muismacrofaag cellijnen, zodat deze grote hoeveelheden sPLA₂ X begonnen te produceren (hoofdstuk 4). Het eerste experiment met deze macrofagen bestond erin om LDL aan het kweekmedium toe te voegen. Hieruit bleek dat sPLA₂ X schuimcelformatie sterk bevorderde en zo kan bijdragen aan de vorming van atherosclerotische plaques. De volgende stap was het bestuderen van de ontstekingseigenschappen van deze sPLA₂ X macrofagen. Hiertoe werden de macrofagen gestimuleerd met lipopolysaccharide. De resultaten lieten zien dat sPLA₂ X de ontstekingsreactie in macrofagen afremt. Zo was het TNF niveau lager dan in normale macrofagen, terwijl de interleukine-10 concentratie verdubbelde. sPLA₂ X bleek te zorgen voor een toename in de productie prostaglandin E₂ en 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J₂ in geactiveerde macrofagen. De toename van deze ontstekingsremmende prostaglandines verklaart de ontstekingsremmende werking van sPLA₂ X. Onze in vitro proeven tonen aan dat sPLA₂ X atherosclerose kan bevorderen door schuimcelformatie, maar daarnaast de ontsteking in atherosclerotische plaques kan remmen.

De logische volgende stap was het maken van een transgene sPLA₂ X muis in analogie met onze sPLA₂ IIA muis (hoofdstuk 5). Dit bleek moeilijker dan verwacht. Er werden slechts 3 transgene muizen geboren, waarvan er 2 op jonge leeftijd stierven. De overlevende muis gaf het gen nauwelijks aan het nageslacht. De longen van een van de gestorven muizen bevatte veel macrofagen, waren sterk oedemateus en vertoonden lipide- en proteïnestapeling. De transgene muizen die niet op jonge leeftijd stierven hadden een veel mildere vorm van longpathologie. We konden geen sporen van infectie vaststellen. Waarschijnlijk verstoorde sPLA₂ X de longsurfactant balans door afbraak van het surfactant. Dit veroorzaakte een ontstekingsreactie en stapeling van surfactant residuen. De conclusie is dat macrofaag specifieke sPLA₂ X overexpressie voor ernstige longproblemen kan zorgen via afbraak van surfactant.

Er is nog maar weinig bekend over het verband tussen de verschillende fosfolipasetypen en de ernst en samenstelling van een atherosclerotische plaque. Om dit beter in kaart te brengen hebben we de expressie van sPLA₂ IIA, sPLA₂ X en PAF-AH in humaan plaque materiaal gemeten (hoofdstuk 6). Atherosclerotisch materiaal van 13 personen werd verzameld en geclassificeerd in vroege, gevorderde en gescheurde plaques. Uit dit materiaal is RNA geïsoleerd en is vervolgens de expressie van de genen gemeten met realtime PCR. Onze resultaten laten zien dat sPLA₂ IIA expressie sterk afneemt in gescheurde plaques, hetgeen aangeeft dat dit enzym een rol speelt in plaque stabiliteit. Bovendien bleek dat

vroege en gevorderde plaques met een hoge sPLA₂ IIA expressie een stevigere structuur hadden. Het expressieniveau van PAF-AH daarentegen nam sterk toe in gescheurde plaques. De relatie tussen een hoge PAF-AH plasma waarden en coronair vaatlijden is al langer bekend, maar onze resultaten laten zien dat PAF-AH productie in de atherosclerotische plaque negatieve gevolgen kan hebben. Het lijkt erop dat sPLA₂ X productie niet beïnvloed wordt door de samenstelling van de plaque, aangezien er geen verschillen vastgesteld werden in vroege, gevorderde en gescheurde plaques. Er zijn aanwijzingen dat sPLA₂ X expressie per individu verschilt en zo een factor kan zijn in atherosclerose vorming. Hier is echter meer onderzoek voor nodig.

We hebben eveneens gekeken naar enzymen die het arachidonzuur, dat vrijkomt bij fosfolipase activiteit, omzetten in ontstekingsregulerende eicosanoiden. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expressie was toegenomen in de gescheurde plaques, terwijl PGE₂ synthase (mPGES) expressie niet verhoogd was. Dit is interessant, aangezien COX-2 het substraat levert voor PGE₂ productie en deze twee enzymen vaak tegelijkertijd actief zijn. Waarschijnlijk spelen andere prostaglandine-synthases een belangrijke rol in gescheurde plaques en kunnen deze bijdragen aan het scheuren van de plaque. De expressieniveau's van 5-lipoxygenase (5-LO) waren toegenomen in zowel de gevorderde lesies als ook in de gescheurde lesies. Deze bevinding bevestigt de relatie tussen de ernst van de atherosclerotische plaque en de concentratie 5-LO.

De resultaten in dit proefschrift laten zien dat fosfolipasen kunnen bijdragen aan de groei van atherosclerotische lesies, maar eveneens de ernst van deze lesies kunnen verminderen door stabilisatie en het remmen van de ontsteking. Daarnaast laten onze resultaten zien dat de rol van fosfolipasen in het lichaam niet los kunnen worden gezien van de eicosanoïd routes.

