

Functional genomics in atherosclerosis : focus on cathepsin K

Citation for published version (APA):

Lutgens, S. P. M. (2007). *Functional genomics in atherosclerosis : focus on cathepsin K*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2007

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

In Western society, cardiovascular diseases, such as myocardial infarction, stroke, and peripheral artery disease, are the principal cause of death. The underlying cause of these cardiovascular diseases is atherosclerosis. The early stages of atherosclerotic lesions, which do not cause clinical problems, usually arise during the first decennia of life. More advanced, but stable lesions, may cause clinical manifestations, such as angina pectoris. Most serious life-threatening complications arise when a stable lesion becomes unstable and ruptures. Exposure of lesion components to the blood causes thrombus formation, which may completely occlude the blood stream. Occlusion of the coronary arteries may result in myocardial infarction and occlusion of cerebral arteries may result in stroke. The exact mechanisms by which a stable plaque becomes unstable and ruptures are largely unknown. However, extracellular matrix remodeling is known to play a role in plaque stabilization and is affected by several proteases, including cathepsins.

In this thesis, we showed that the cysteine protease cathepsin K is differentially expressed between stable lesions and lesions containing a thrombus. Furthermore, by genetic deficiency and inhibition, we investigated the role of cathepsin K in two cardiovascular diseases, atherosclerosis and aneurysm formation. In addition, we used a functional genomics approach to identify new genes/peptides that play a role in atherosclerotic plaque (de)stabilization.

The role of various cysteine proteases (cathepsins) in cardiovascular diseases has been summarized in chapter 2. Although the *in vivo* role of both cathepsins K and S in atherosclerosis has been extensively described, little is known about the *in vivo* role of other cathepsins of the cysteine protease family. Until now, no data are available about the *in vivo* role of cathepsins in aneurysm and neointima formation. However, given the expression patterns of cathepsins in diseased arteries, cathepsins may also play an important role in aneurysm and neointima formation. Cathepsins also play a role in the lipid metabolism, for example by degradation of lipids.

The effect of cathepsin K (deficiency) on atherosclerosis has been described in chapters 3 and 4. *In vivo*, deficiency of cathepsin K led to a reduction in the number of atherosclerotic lesions, a reduction in lesion size, more collagen and

less elastin breaks, all characteristics of plaque stabilization. However, deficiency of cathepsin K also resulted in increased macrophage size in the atherosclerotic lesion. In vitro experiments showed that this increased macrophage size resulted from increased lipid uptake and increased cholesterol ester storage in cathepsin K deficient macrophages, leading to macrophage foam cell formation (chapter 3). To further unravel the molecular mechanisms underlying the observed phenotypic changes evoked by cathepsin K deficiency, we performed gene expression profiling of aortic arches of *catK*^{-/-}/*apoE*^{-/-} and *apoE*^{-/-} mice on a mouse oligo microarray. Microarray analysis suggested a role for CD36 and caveolins in the lipid metabolism. In vitro validation experiments confirmed that both CD36 and caveolins contributed to foam cell formation in cathepsin K deficient macrophages. Furthermore, the microarray analysis suggested that cathepsin K deficiency not only alters plaque phenotype by reducing proteolytic activity, but also by increasing TGF- β signaling (chapter 4).

There is increasing interest of pharmaceutical industries for the use of cathepsin K inhibitors for the treatment of osteoporosis and osteoarthritis. These cathepsin K inhibitors may also be useful in the treatment of atherosclerosis. In chapter 5 we studied the in vitro effect of a cathepsin K inhibitor on both extracellular matrix degradation and lipid metabolism in murine and human macrophages. The cathepsin K inhibitor reduced degradation of the extracellular matrix components collagen I and IV and elastin by recombinant murine and human cathepsin K and in cell lysates of murine macrophages. Pharmacological inhibition of cathepsin K had no effect on lipid metabolism, including lipid uptake and cholesterol efflux in murine macrophages. However, absence of cathepsin K led to increased lipid uptake (chapter 3) and reduced cholesterol efflux (chapter 5) in murine macrophages. Thus, the profibrotic and lipogenic effects of cathepsin K inhibition can be separated.

In chapter 6, we described the in vivo effect of cathepsin K deficiency on angiotensin II-induced aneurysm formation. Despite the absence of a protease with strong collagenolytic and elastolytic activity, deficiency of cathepsin K did not result in an increase in angiotensin II-induced aneurysm formation. Additional research to clarify why cathepsin K deficiency did not reduce aneurysm formation in this in vivo model is needed.

An important characteristic of the current techniques to study differentially expressed genes, is the lack of a functional assay early in the selection of candidates. In chapter 7, we introduced a new functional genomics approach to identify genes that are involved in inflammation, one of the key factors in plaque stabiliza-

tion. This screening approach led to the identification of several candidates which were further validated *in vitro*, including 70G7. This approach showed that combining differential gene expression and functional genomics is a potent and effective screening approach to identify novel and functional soluble mediators that induce inflammatory cytokine production by human macrophages. This approach could facilitate high-throughput functional screening of large expression libraries.

In chapter 8 the findings of the five experimental chapters are discussed. Various approaches to study differential gene expression between stable and ruptured atherosclerotic plaques are placed into perspective: the candidate gene approach, the candidate pathway approach, and the functional genomics approach. Besides, the role of cathepsins is compared with the role of MMPs concerning their protease activity. Finally, the use of cathepsins as a therapeutic target and as a diagnostic tool is discussed.

From the studies described in this thesis, we concluded that deficiency of cathepsin K induced atherosclerotic plaque stabilization, but also contributed to plaque destabilization by inducing foam cell formation. It was possible to reduce collagenolytic and elastolytic activity of macrophages by pharmacological inhibition of cathepsin K, without affecting the lipid metabolism. Furthermore, we showed that cathepsin K deficiency did not lead to an increase in angiotensin II-induced aneurysm formation. Finally, we introduced a new approach to facilitate high throughput functional screening of large expression libraries.

Samenvatting

In de Westerse wereld zijn hart- en vaatziekten (cardiovasculaire aandoeningen), zoals hartinfarct, herseninfarct en perifere arterieel vaatlijden, de belangrijkste oorzaak van overlijden. De onderliggende oorzaak van deze hart- en vaatziekten is atherosclerose. De vroege stadia van atherosclerotische laesies (plaques), die overigens geen klinische verschijnselen veroorzaken, ontstaan gewoonlijk gedurende de eerste decennia van het leven. De meer gevorderde (stabiele) laesies kunnen wel klachten zoals pijn op de borst veroorzaken. Het merendeel van de klinische complicaties ontstaat echter als een laesie onstabiel wordt en openscheurt (ruptuur). Door blootstelling van de inhoud van een opengescheurde laesie aan het bloed, ontstaat een bloedprop (trombus) die een bloedvat volledig kan afsluiten. Afsluiting van een kransslagader kan leiden tot een hartinfarct, terwijl afsluiting van een bloedvat in de hersenen kan leiden tot een herseninfarct. De precieze mechanismen die ertoe leiden dat een stabiele laesie onstabiel wordt zijn grotendeels onbekend. Echter, de betrokkenheid van verscheidene proteases, inclusief cathepsines, in de afbraak van extracellulaire matrix componenten is uitgebreid beschreven.

In dit proefschrift hebben we laten zien dat het cysteine protease cathepsine K differentieel tot expressie komt tussen stabiele laesies en laesies met een thrombus. Ook hebben we, door middel van genetische deficiëntie en inhibitie, de rol van cathepsine K in twee cardiovasculaire aandoeningen, atherosclerose en aneurysma vorming, onderzocht. Daarnaast hebben we een functionele screeningsmethode gebruikt om nieuwe genen/peptiden, die mogelijk een rol spelen in atherosclerotische plaque (de)stabilisatie, te identificeren.

De rol van verschillende cysteine proteases (cathepsines) in cardiovasculaire aandoeningen is beschreven in hoofdstuk 2. Hoewel de in vivo rol van cathepsine K en S in atherosclerose uitgebreid is beschreven, is er nog weinig bekend over de in vivo rol van de overige cathepsines van de cysteine protease familie. Ook over de mogelijke betrokkenheid van cathepsines in aneurysma en neointima vorming zijn geen in vivo data bekend. Maar gezien hun expressie patronen in de aangedane vaten zouden cathepsines ook in deze aandoeningen een rol kunnen spelen. Naast een rol in extracellulaire matrix degradatie, spelen cathepsines ook een rol in het vetmetabolisme, onder andere door degradatie van lipiden.

In de hoofdstukken 3 en 4 is het effect bestudeerd van cathepsine K deficiëntie op atherosclerose. In vivo heeft deficiëntie van cathepsine K enerzijds geleid tot een kleiner aantal atherosclerotische laesies, kleinere laesies, meer collageen en minder elastine breuken, allen kenmerken van plaque stabilisatie. Anderzijds heeft cathepsine K deficiëntie tot grotere macrofagen in de atherosclerotische laesies geleid. In vitro experimenten hebben laten zien dat deze toegenomen macrofaag grootte het gevolg is van toegenomen vetopname en toegenomen cholesterol ester opslag in cathepsine K deficiënte macrofagen (hoofdstuk 3). Om de onderliggende mechanismen verder te bestuderen, hebben we de gen expressie profielen van aortabogen van catK^{-/-}/apoE^{-/-} en apoE^{-/-} muizen vergeleken met behulp van een microarray analyse. De gevonden expressie profielen onthulden een mogelijke rol voor CD36 en caveolines. In vitro validatie experimenten hebben vervolgens de bijdrage van CD36 en caveolines aan schuimcel vorming in cathepsine K deficiënte macrofagen bevestigd. Daarnaast suggereerden de expressie profielen dat cathepsine K deficiëntie niet alleen via een vermindering van de aanwezige proteolytische activiteit, maar ook als gevolg van stimulering van TGF- β signaal transductie tot een stabiel plaque fenotype zou kunnen leiden (hoofdstuk 4).

In de farmaceutische industrie is er een toenemende interesse voor het gebruik van cathepsine K remmers voor de behandeling van osteoporose en osteoartritis. Deze cathepsine K remmers kunnen mogelijk ook gebruikt kunnen worden voor de behandeling van atherosclerose. In hoofdstuk 5 hebben we het in vitro effect van een cathepsine K remmer op extracellulaire matrix degradatie en het vetmetabolisme in muizen beenmerg macrofagen en humane macrofagen bestudeerd. Toevoeging van deze cathepsine K remmer resulteerde in verlaagde afbraak van de extracellulaire matrix componenten collageen I, IV en elastine door recombinant muis en humaan cathepsine K en in cellulaire lysaten van muizen macrofagen. Farmacologische inhibitie van cathepsine K had echter geen effect op het vetmetabolisme voor zover dat vetopname en cholesterol efflux in muizen macrofagen betrof. Deficiëntie van cathepsine K heeft wel geleid tot meer vetopname (hoofdstuk 3) en minder cholesterol efflux (hoofdstuk 5) in muizen macrofagen. De effecten van cathepsine K op de extracellulaire matrix en het vetmetabolisme kunnen dus losgekoppeld worden.

In hoofdstuk 6 hebben we het in vivo effect van cathepsine K deficiëntie op angiotensine II geïnduceerde aneurysma vorming beschreven. Ondanks de afwezigheid van een protease met sterke collagenase en elastase activiteit, heeft cathepsine K deficiëntie niet tot een toename in angiotensine II geïnduceerde aneurysma vorming geleid. Verder onderzoek is nodig om aan te tonen waarom deficiëntie

van cathepsine K niet leidt tot verminderde aneurysma vorming in dit in vivo model.

Een belangrijk kenmerk van de huidige technieken om differentiële genen te bestuderen, is het gebrek aan een vroege screening naar de functie van de betreffende genen. In hoofdstuk 7 hebben we een methode beschreven waarbij differentiële genen, gedefinieerd als genen die verhoogd tot expressie komen in de stabiele laesie, al in een vroege fase op functie geselecteerd kunnen worden. De differentiële genen zijn gescreend op een functie in inflammatie (ontsteking), een belangrijke factor in plaque stabilisatie. Deze nieuwe screeningsmethode heeft geleid tot de identificatie en in vitro validatie van enkele kandidaten, waaronder peptide 70G7. Onze proefopzet heeft dan ook laten zien dat het combineren van een differentiële gen expressie studie en het onderzoek naar de functie van genen een effectieve manier is om nieuwe en functionele genen, die humane macrofagen aanzetten tot de productie van inflammatoire cytokines, te identificeren. Deze benadering kan de functionale screening van grote expressiebanken vergemakkelijken.

In hoofdstuk 8 hebben we de bevindingen uit de vijf experimentele hoofdstukken in een breder perspectief geplaatst. De verschillende methodes om genen die differentieel tot expressie komen tussen stabiele laesies en laesies met een thrombus nader te bestuderen zijn hier bediscussieerd: de kandidaat gen benadering, de kandidaat genexpressie benadering, en de benadering waarin onderzoek gedaan wordt naar de functie van genen. Daarnaast hebben we in dit hoofdstuk de rol van de cathepsines met betrekking tot hun protease activiteit vergeleken met de rol van MMP's. Tenslotte is hier ook het gebruik van cathepsines voor therapeutische doeleinden en als diagnostische marker geëvalueerd.

De studies zoals beschreven in dit proefschrift hebben aangetoond dat deficiëntie van cathepsine K enerzijds bijdraagt aan atherosclerotische plaque stabilisatie door middel van toegenomen fibrose, maar anderzijds ook leidt tot plaque destabilisatie als gevolg van toegenomen macrofaag grootte. Verder blijkt het mogelijk om, door middel van farmacologische inhibitie van cathepsine K, collageen en elastine afbraak door macrofagen te remmen, zonder daarbij het vetmetabolisme te beïnvloeden. Daarnaast hebben we aangetoond dat cathepsine K deficiëntie niet leidt tot een toename in angiotensine II geïnduceerde aneurysma vorming. Tot slot hebben we een nieuwe methode geïntroduceerd om grote differentiële expressie banken op een snelle manier functioneel te screenen.