

Nederlandse samenvatting

De rol van het NADPH oxidase
in hart en bloedvaten

Introductie

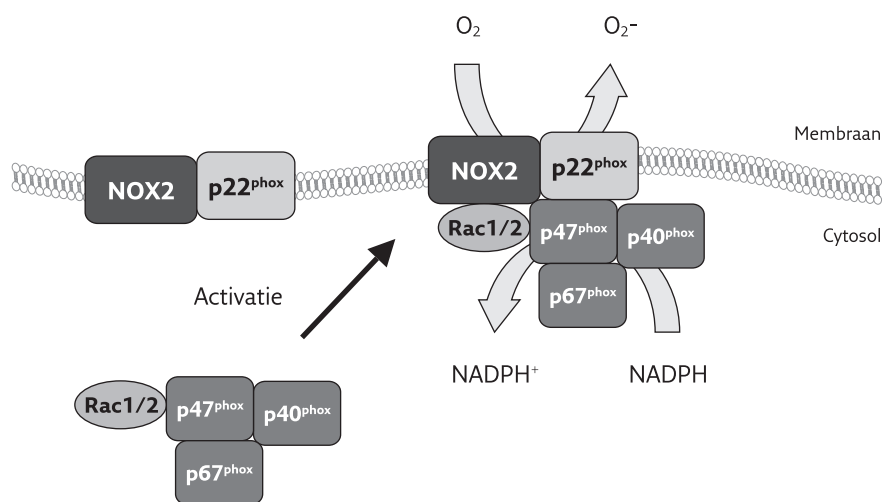
Zuurstofradicalen zijn kortlevende, zeer reactieve componenten die gevormd worden in een cel door verschillende enzymen. Zo kunnen zuurstofradicalen gevormd en uitgescheiden worden door witte bloedcellen, zoals neutrofiële granulocyten en macrofagen, om ziekteverwekkers te doden tijdens een ontstekingsreactie. Zuurstofradicalen kunnen reageren met eiwitten, vetten en DNA, waardoor ze ook grote schade kunnen toebrengen aan cellen, wat uiteindelijk kan leiden tot celdood. Cellen kunnen zich beschermen tegen de schadelijke effecten van zuurstofradicalen met behulp van antioxidanten, die zuurstofradicalen wegvangen en omzetten tot niet-reactieve stoffen. Naast de antioxidanten die de cel zelf produceert krijgen we ook antioxidanten binnen via het voedsel, zoals bijvoorbeeld vitamine C en vitamine E.

Wanneer de balans tussen de hoeveelheid zuurstofradicalen die gevormd worden en de hoeveelheid antioxidanten verstoord is, bijvoorbeeld doordat de productie van zuurstofradicalen sterk toeneemt of de antioxidant capaciteit afneemt, ontstaat oxidatieve stress. Onderzoek heeft aangetoond dat oxidatieve stress een belangrijke rol speelt bij verscheidene ziektebeelden, waaronder hart- en vaatziekten.

Verschillende bronnen in een cel produceren zuurstofradicalen. De familie van NADPH oxidasen (NOXen) hebben als primaire functie het produceren van zuurstofradicalen. Deze NADPH oxidasen zijn complexe enzymen die uit verschillende eiwitten bestaan.

In ongestimuleerde cellen is het NADPH oxidase niet volledig geassembleerd en daarom inactief. Het bestaat uit een membraangebonden component en componenten die in het cytosol zijn gelokaliseerd, waaronder p47^{phox} en p67^{phox}. Wanneer de cel geactiveerd wordt, migreren deze cytosolische componenten naar de celmembraan en binden aan het membraangebonden deel (figuur 1, zie ook hoofdstuk 1). Na de assemblage is het actieve NADPH oxidase in staat om de opgenomen zuurstof om te zetten in reactieve zuurstofradicalen.

Ondanks dat zuurstofradicalen gezien worden als schadelijke afbraakproducten, zijn er sterke aanwijzingen dat de zuurstofradicalen geproduceerd door onder andere NADPH oxidasen noodzakelijk zijn voor het normaal functioneren van een cel middels intracellulaire signalering. Deze intracellulaire signalen kunnen de cel bijvoorbeeld aanzetten tot groeien, delen en/of migreren. Omdat zuurstofradicalen snel reageren met andere moleculen is de lokalisatie waar actieve NADPH oxidasen zuurstofradicalen produceren erg belangrijk voor de juiste intracellulaire signalen en dus de uiteindelijke cellulaire functie.



1. Schematische weergave van een NADPH oxidase (NOX2) complex | NOX2 is in de membraan gebonden aan p22^{phox}. Na stimulatie (activatie) migreren de cytosolische componenten naar de membraan om een actief complex te vormen. Zuurstofradicalen worden geproduceerd doordat elektronen afkomstig van NADPH gekoppeld worden aan zuurstof moleculen, waarbij vrije zuurstofradicalen gevormd worden.

In dit proefschrift hebben we gekeken naar de rol van verschillende NADPH oxidasen in hartspiercellen, endotheelcellen en gladde spiercellen, onder verschillende stimuli, zoals ischemie, homocysteïne en fenylefrine. Hierbij hebben we voornamelijk gekeken naar de subcellulaire lokalisatie van de verschillende NADPH oxidasen en hun rol in de respons van cel op deze stimuli.

NOX2 induceert apoptose van hartspiercellen

Ischemie

Een hartinfarct ontstaat doordat een bloedvat dat het hart van zuurstofrijk bloed voorziet verstopt raakt. Hierdoor krijgt dit deel van het hart onvoldoende zuurstof, genaamd ischemie. Als gevolg hiervan kunnen hartspiercellen afsterven. Een gedeelte van de mensen die een hartinfarct krijgt overlijdt hieraan. Bij mensen die een hartinfarct overleven treedt hartfunctieverlies op, hetgeen uiteindelijk kan leiden tot hartfalen.

Een oorzaak van hartspierceldood is de gereguleerde vorm van celdood, ook wel bekend als apoptose, middels activatie van caspases. Eerder is al aangetoond dat zuurstofradicalen bij dit proces een rol spelen. Zo is het bekend dat als gevolg van ischemie NOX2 zich in hartspiercellen naar de celkern (nucleus) verplaatst en daar zuurstofradicalen produceert. In *hoofdstuk 2* hebben we de verplaatsing van NOX2 naar de celkern verder onderzocht. We laten zien dat als gevolg van ischemie NOX2 zich naar de kernenvolp verplaatst nabij de kernporiën, die de toegangspoorten tot de celkern vormen. Verder laten we zien dat NOX2 co-lokaliseert met de componenten p22^{phox} en p47^{phox}, die respectievelijk nodig zijn voor membraan stabilisatie en activatie. Deze specifieke verplaatsing van NOX2 naar de celkern kan suggereren dat NOX2-geproduceerde zuurstofradicalen de expressie van bepaalde genen kunnen beïnvloeden door middel van de regulatie van transcriptiefactoren. Er zijn namelijk verschillende zuurstofradicaal-aangestuurde transcriptiefactoren betrokken bij de inductie van apoptose. Één daarvan is de transcriptiefactor forkhead box o1 (FOXO1). In *hoofdstuk 3* laten we zien dat als gevolg van ischemie NOX2 activatie bij de celkern zorgt voor de verplaatsing van FOXO1 naar de kern waarna apoptose wordt geïnduceerd. Dit is aldus suggestief voor een rol voor NOX2-geproduceerde zuurstofradicalen in de regulatie van genen gerelateerd aan apoptose in hartspiercellen.

Homocysteïne

Homocysteïne (Hcy) is een aminozuur dat in het menselijke lichaam aangemaakt wordt uit een ander aminozuur, te weten methionine. Methionine wordt namelijk omgezet in *s*-adenosylmethionine (SAM), een belangrijke bron van methyl, dat noodzakelijk is voor de methylering van DNA, RNA en eiwitten. Wanneer de methylgroep van SAM wordt omgezet blijft *s*-adenosylhomocysteïne (SAH) over. SAH wordt vervolgens omgezet in Hcy en adenosine. Onder normale omstandigheden wordt het geproduceerde Hcy weer omgevormd of afgebroken, zodat de hoeveelheid in het lichaam niet toeneemt. Verloopt dit proces onvolledig dan kan Hcy in verhoogde concentraties in het bloed blijven circuleren. Een verhoogd Hcy gehalte in het bloed kan ontstaan door genetische afwijkingen, maar ook door een gebrek aan onder andere foliumzuur, vitamine B6 en B12. Deze hebben namelijk een functie als co-enzymen bij de omzetting van methionine. Wanneer het gehalte aan Hcy te hoog wordt kan er hyperhomocysteinemie ontstaan, wat een belangrijke risicofactor is voor hart- en vaatziekten.

Naast de effecten op cellen van het vaatsysteem (zie ook hoofdstukken 7-9), hebben recente studies aangetoond dat hyperhomocysteinemie ook schadelijke effecten heeft op hartspiercellen. In *hoofdstuk 4* laten we zien dat NOX2-geproduceerde zuurstofradicalen hierin een belangrijke rol spelen. Door verhoogde concentraties Hcy verplaatsen NOX2 en p47^{phox} zich naar de celkern van hartspiercellen waar vervolgens zuurstofradicalen worden geproduceerd en apoptose-inductie plaatsvindt. Deze effecten waren opmerkelijk genoeg onafhankelijk van SAH, omdat SAH geen verplaatsing van p47^{phox} naar de celkern induceerde, waardoor geen activatie van het NOX2 complex bewerkstelligd kon worden.

NOX2 induceert hypertrofie van hartspiercellen

Hypertrofie

Zoals eerder vermeld sterven er als gevolg van de ischemie hartspiercellen af, met name op die plekken in het hart waar de belemmering van de zuurstof/bloedvoorziening het sterkst is, het zogenaamde infarct centrum. Daaromheen, de zogenaamde 'border zones', kunnen hartspiercellen in meer of mindere mate beschadigd raken, maar ze zijn veelal niet dood op het moment dat de bloedtoevoer na een infarct weer tot stand gebracht is (reperfusie). Na die reperfusie komt er echter een ontstekingsreactie op gang, met als doel het dode hartweefsel op te ruimen, waarna verbindweefseling kan plaatsvinden op die plekken waar hartspiercellen

zijn afgestorven. Ter compensatie van het afgestorven hartweefsel moeten omliggende hartspiercellen harder werken waardoor deze hypertrofisch (toename door vergroting) kunnen worden. Eerder zagen wij dat NOX2 tot expressie komt in hartspiercellen in het ischemische gebied na een infarct, maar ook in hartspiercellen in de border zones. Omdat deze cellen in theorie hypertrofisch kunnen worden, hebben we ook een rol voor NOX2 bij de inductie van hypertrofie gesuggereerd. Daarom hebben we in *hoofdstuk 5* gekeken naar de effecten van fenylefrine, dat hypertrofie van hartspiercellen kan veroorzaken, en de eventuele rol van NOX2 hierin. We zagen dat fenylefrine na 24 uur hypertrofie van geïsoleerde hartspiercellen induceert, dat samen ging met een verhoogde NOX2 expressie, 1 tot 4 uur na fenylefrine stimulatie, en met een zuurstofradicaal productie met een piek na 2 uur. Remming van deze NOX2 activatie resulteerde in remming van hypertrofie-inductie na 24 uur. Het is bekend dat fenylefrine binnen 1 uur activatie van bepaalde transcriptiefactoren kan veroorzaken, wat pas na 4 tot 24 uur resulteert in de expressie van structurele genen die geassocieerd worden met het hypertrofisch worden van hartspiercellen. De vroege NOX2-geproduceerde zuurstofradicalen (tussen 1 en 4 uur) die wij nu vonden kunnen dus een belangrijke rol spelen bij de regulatie van genen betrokken bij hypertrofie.

Dit betekent dus dat NOX2 door het produceren van zuurstofradicalen in hartspiercellen een rol kan spelen bij meerdere, ook tegenovergestelde, processen zoals apoptose en hypertrofie.

NOX5 in het hart

NOX5 is het jongste lid van de familie van NADPH oxidasen. Het werd als eerste beschreven in de testis en is later ook gevonden in endotheelcellen (binnenbekleding van bloedvaten) en in de coronairarterie (de kransslagader die de hartspier van bloed voorziet). Wij laten in *hoofdstuk 6* voor het eerst zien dat NOX5 tot expressie wordt gebracht in humane hartspiercellen, maar ook in endotheelcellen en gladde spiercellen van de intramyocardiale bloedvaten (dit zijn aftakkingen van de op het hart gelegen epicardiale vaten). Daarnaast vonden we dat de NOX5 expressie opgereguleerd wordt in hartweefsel van patiënten met een infarct. NOX5-opregulatie vonden we in verschillende compartimenten van de hartspiercellen, zoals het cytosol, de plasmamembraan, ter plaatse van dwarsstreping en de intercalated discs (hechtingsplaatsen). Zoals eerder vermeld is de locatie binnen een cel waar NOX geactiveerd wordt erg belangrijk voor de juiste intracellulaire signalen en dus de juiste cellulaire functies. De verschillende lokalisaties van NOX5 in hartspiercellen kan er dus op duiden dat NOX5 bij meerdere cellulaire processen betrokken is. Wat deze processen zijn in het geval van NOX5 weten we nu nog niet.

NOX signalering in Hcy-geïnduceerde schade van vaten

Zoals boven vermeld is hyperhomocysteinemie een belangrijke risicofactor voor hart- en vaatziekten. Dit wordt niet alleen gezien in hartspiercellen, maar ook in cellen van de bloedvaten. Zo maakt Hcy onder andere endotheelcellen gevoeliger voor ontstekingsmediatoren en kan het direct celdood veroorzaken. Ook is bekend dat Hcy ervoor zorgt dat gladde spiercellen van bloedvaten kunnen gaan groeien en migreren, waarbij extracellulaire matrix componenten, waaronder bindweefsel, worden geproduceerd, hetgeen weer een risicofactor vormt voor het optreden van atherosclerosis (aderverkalking). Anderzijds kan Hcy, net als endotheelcellen, ook gladde spiercellen direct doden. Bij de inductie van apoptose in endotheelcellen en gladde spiercellen speelt ook oxidatieve stress een belangrijke rol.

Endotheelcellen

In *hoofdstuk 7* beschrijven we dat een hoge concentratie Hcy niet alleen apoptose induceert in endotheelcellen, maar ook membraan flip-flop induceert, wat kan resulteren in de binding van ontstekingsfactoren. We vonden dat Hcy naast NOX2 ook NOX4, samen met p47^{phox} naar de celkern transporteerde, waar deze NOXen zuurstofradicalen produceerden. Net als in hartspiercellen zouden NOX2 en NOX4 in endotheelcellen dus een belangrijke rol kunnen spelen in de activatie en/of modulatie van transcriptiefactoren die betrokken zijn bij de inductie van apoptose. Anders dan in hartspiercellen vonden we dat zowel een verhoogde concentratie Hcy als SAH apoptose van endotheelcellen induceerde (hoofdstuk 8). In beide gevallen vonden we een translocatie van NOX2 en NOX4, samen met p47^{phox} naar de celkern en de productie van zuurstofradicalen. We kunnen derhalve concluderen dat een verhoogde concentratie SAH, ook onafhankelijk van Hcy, endotheelschade kan veroorzaken.

Gladde spiercellen

Naast de effecten van verhoogde concentraties Hcy op endotheelcellen hebben we ook gekeken naar de effecten op gladde spiercellen. In *hoofdstuk 9* laten we zien dat een verhoogde Hcy concentratie apoptose veroorzaakte in gladde spiercellen. Echter, de concentraties waarbij Hcy dit schadelijke effect had waren hier beduidend lager dan bij endotheelcellen. Dit zou dus kunnen betekenen dat gladde spiercellen gevoeliger zijn voor Hcy dan endotheelcellen. In deze gladde spiercellen bleek met name NOX4 een belangrijke rol te spelen. Zo zagen we NOX4 translocatie naar de celkern waar zuurstofradicalen geproduceerd werden. Wanneer we NOX4 volledig remden met behulp van siRNA zagen we dat de productie van zuurstofradicalen ook geremd werd en apoptose inductie voorkomen werd. Dus, Hcy induceert apoptose, niet alleen in hartspiercellen, maar ook in endotheelcellen en gladde spiercellen van bloedvaten. In alle gevallen spelen verschillende NOXen gelokaliseerd bij de celkern hierin een belangrijke rol.

Conclusie

Oxidatieve stress speelt een belangrijke pathologische rol in hart- en vaatziekten. De studies in dit proefschrift laten zien dat de familie van NOXen belangrijke bronnen zijn voor de productie van zuurstofradicalen en dat ze betrokken zijn bij verschillende signaleringsroutes. Hierin spelen de subcellulaire lokalisaties van deze NOXen een belangrijke rol. Zo hebben we aangetoond dat de expressie, activatie en subcellulaire lokalisatie van verschillende NOXen (NOX2, NOX4, NOX5) in reactie op verschillende pathologische stimuli (ischemie, Hcy, fenylefrine) kunnen verschillen in meerdere celtypen (hartspiercellen, endotheelcellen, gladde spiercellen). Dit wijst er op dat elk lid van de NOX familie zijn eigen specifieke cellulaire functie kan hebben. Daarmee vormen ze een nieuw interessant therapeutisch target om hart- en vaatziekten aan te pakken.