



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Novel immune cell-based therapies for atherosclerosis

Frodermann, V.

### Citation

Frodermann, V. (2015, May 27). *Novel immune cell-based therapies for atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/33064>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/33064>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33064> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Frodermann, Vanessa

**Title:** Novel immune cell-based therapies for atherosclerosis

**Issue Date:** 2015-05-27



**Dutch Summary**  
**Nederlandse Samenvatting**



## Achtergrond

Hart- en vaatziekten (HVZ) is een verzamelnaam voor alle aandoeningen die het hart en de bloedvaten betreffen. De meest voorkomende vormen van HVZ zijn coronair vaatlijden en cerebrovasculaire aandoeningen<sup>1</sup>. Atherosclerose of aderverkalking vormt de belangrijkste oorzaak van het ontstaan van HVZ. De grootste risicofactoren voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten zijn een vetrijk dieet, te weinig lichaamsbeweging, stress en overmatig alcoholgebruik en roken<sup>1,2</sup>. Naast deze factoren kan ook een bacteriële infectie of het lijden aan een auto-immuunziekte, zoals reumatoïde artritis, het risico op HVZ verhogen<sup>3</sup>.

HVZ vormen de belangrijkste doodsoorzaak in geïndustrialiseerde landen en zijn elk jaar verantwoordelijk voor 46% van de sterfgevallen in de Europese Unie<sup>4</sup> en 36% van de sterfgevallen in de Verenigde Staten<sup>1</sup>. Toch is er in de afgelopen 10 jaar een aanzienlijke daling (30%) in de sterfte ten gevolge van HVZ waargenomen<sup>1,4</sup>. Deze daling is grotendeels te danken aan een verbeterde preventie en een doeltreffender behandeling van de complicaties van vooral acute vormen van HVZ, zoals hart- en herseninfarcten<sup>5,6</sup>. Helaas neemt als gevolg van deze verbeterde behandeling het aantal gevallen van hartfalen sterk toe<sup>1</sup>. Bovendien stijgen risicofactoren, zoals obesitas<sup>7</sup> en diabetes<sup>8</sup>, sterk en dit kan in de nabije toekomst mogelijk een negatieve invloed hebben op het voorkomen van HVZ. Het is ook zorgelijk dat in de Westerse landen de sterftcijfers als gevolg van HVZ weliswaar dalen, terwijl in de rest van de wereld de HVZ sterftcijfers sterk stijgen<sup>9</sup>.

Mede vanwege de gevolgen van een hart- of herseninfarct, hebben hart- en vaatziekten een enorme economische impact en de jaarlijkse uitgaven ten gevolge van HVZ belopen in de Europese Unie naar schatting 200 miljard euro<sup>10</sup> en in de Verenigde Staten 400 miljard euro<sup>1</sup>. Deze getallen geven duidelijk aan dat er, naast de klinische behoefte voor een betere behandeling van de patiënten, een grote behoefte is aan nieuwe en betere behandelmethoden van atherosclerose in aanvulling op de bestaande operatieve behandelingen en het gebruik van cholesterol en bloeddrukverlagende middelen.

Atherosclerose is een chronische autoimmuunachtige ziekte van de grote en middelgrote slagaders. Het proces van atherosclerose begint al in de vroege puberjaren<sup>11</sup> en kan een heel leven asymptomatisch blijven of kan leiden tot acute complicaties, zoals een myocardinfarct (MI) of een herseninfarct. De ziekte ontwikkelt zich door een combinatie van dyslipidemie en een ontstekingsproces, waardoor ook de atherosclerotische laesie gekenmerkt: door zowel een grote ophoping van lipiden als een chronische pro-inflammatoire respons.

De huidige behandeling van hart- en vaatziekten is voornamelijk gericht op het verlagen van het niveau van het slechte cholesterol, het LDL cholesterol, in het bloed. Het LDL gehalte is een van de belangrijkste risicofactoren voor atherosclerose en het kan door gebruik van statines effectief worden verlaagd. Statines werden voor het eerst op de markt gebracht aan het eind van de jaren 80 van de vorige eeuw en ze remmen het enzym 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl (HMG)-COA reductase, wat het snelheidsbeperkende enzym van de mevalonaat pathway is en verantwoordelijk voor de cholesterol synthese. Statines blijken het cardiovasculaire risico met 25-30%

te verlagen, maar patiënten die een cardiovasculaire complicatie zoals een hart- of herseninfarct hebben ondervonden, hebben ondanks statine gebruik meer dan twintig procent kans op een tweede cardiovasculaire complicatie<sup>12</sup>. Dit geeft aan dat er een dringende behoefte is aan nieuwe, alternatieve therapeutische strategieën.

Om dit doel te bereiken heeft men zich de laatste jaren ingespannen om een anti-inflammatoire therapie te ontwikkelen teneinde de behandeling van atherosclerose te verbeteren. Sommige van deze methodes zijn al in een tweede en derde fase van een klinische trial, maar de uiteindelijke klinische toepassing is nog niet goedgekeurd.

### **Dit proefschrift**

Het doel van dit proefschrift was om nieuwe, immunomodulerende therapieën te ontwikkelen voor atherosclerose. Grofweg zijn er twee methodes gebruikt: ten eerste een directe cellulaire therapie en ten tweede het gebruik van geneesmiddelen en biologics om de immuunrespons zodanig te beïnvloeden dat atherosclerose vermindert. Het onderzoek is uitgevoerd in transgene muizen die doordat ze de receptor voor het slechte cholesterol, lage dichtheidslipoproteïne (LDLr), missen gevoelig zijn voor het ontwikkelen van atherosclerose. De LDLr deficiënte muizen (LDLr<sup>-/-</sup>) muizen ontwikkelen op een dieet met een hoog vetgehalte (Western-type dieet, WTD) atherosclerose. Hoewel onze therapeutische strategieën primair gericht zijn op het verminderen van de ontstekingsreactie, hebben wij in twee studies een bijkomend gunstig effect op de cholesterol huishouding vastgesteld.

### **(1) Cellulaire therapie: Directe behandeling met (gemodificeerde) immuuncellen voor de behandeling van atherosclerose**

Het doel van een anti-inflammatoire behandeling voor atherosclerose is het moduleren van ontstekingsreacties van zowel het aangeboren als het adaptieve deel van het immuunsysteem. Dendritische cellen (DCs) zijn de krachtigste antigeen-presenterende cellen en vormen de verbinding tussen de aangeboren en adaptieve immuunrespons. Onze hypothese was dat de modulatie van DCs naar een tolerogeen fenotype leidt tot de productie van anti-inflammatoire mediators en de inductie van regulatoire T cellen (Treg), welke atherosclerose gunstig kunnen beïnvloeden. Wij hebben dit op twee manieren getest: (1) door toediening van apoptotische DCs, met als gevolg de inductie van tolerogene DC reacties en (2) door het verhogen van  $\beta$ -catenin signalering in DCs om direct een tolerogeen fenotype in de DCs te verkrijgen.

In **hoofdstuk 2** onderzochten wij het effect van de behandeling van muizen met DCs, die door behandeling met geoxideerd LDL (oxLDL) apoptotisch waren, op beginnende en bestaande atherosclerose. Het is bekend dat de klaring van apoptotische cellen ("efferocytose") bij vergevorderde atherosclerose verzwakt is<sup>13</sup> en eerdere studies door onder andere ons laboratorium hebben aangetoond dat door de blokkade van efferocytose atherosclerose verergerd wordt<sup>15</sup>. Wij laten nu zien dat de klaring van door oxLDL geïnduceerde apoptotische DCs leidt tot een respons die beschermend is voor atherosclerose. Wij laten zien dat toediening van oxLDL geïnduceerde apoptotische DCs resulteert in de inductie van tolerogene DC's, een verhoogd aantal regulatoire

T cellen, een verminderde inflammatoire respons in de monocytten en verminderde atherosclerose.

Apoptotische DCs, die werden ingespoten in LDLr<sup>-/-</sup> muizen in een initieel stadium of in een later stadium van atherosclerose, werden voornamelijk opgenomen door DCs en macrofagen in de marginale zone van de milt. Dit leidde tot de inductie van een tolerogeen fenotype wat de ontwikkeling van Tregs faciliteert. Daarnaast vonden wij dat het totaal aantal (inflammatoire) monocytten werd gereduceerd, een tot nu toe onbekend effect van een behandeling met apoptotische cellen. Muizen met bestaande atherosclerotische laesies vormen een meer relevante onderzoekmodel omdat de meeste patiënten in het ziekenhuis komen met bestaande, meestal vergevorderde stadia van atherosclerose. De behandeling van muizen met bestaande atherosclerotische laesies door inspuiting met apoptotische DC's verbeterde de stabiliteit van deze laesies. Ons onderzoek geeft de mogelijke klinische toepassing aan, maar benadrukt ook het belang van het onderzoek naar de emigratie van DCs vanuit de laesies naar de lymfeknopen. Dit sluit aan op eerder onderzoek van ons laboratorium waaruit bleek dat de behandeling van muizen met oxLDL-geladen DCs de start van atherosclerose vermindert<sup>16</sup>. Als DCs, die oxLDL opnemen of oxLDL-geïnduceerde apoptotische DCs dan wel macrofagen (beide met een atherosclerose-relevant antigeen) opnemen, kunnen worden geactiveerd om te emigreren uit de atherosclerotische laesies, kunnen ze mogelijk bijdragen aan de remming van laesie ontwikkeling en aan de stabilisatie van bestaande laesies.

Hosseini *et al.* publiceerden tegelijkertijd met ons dat de intraperitoneale toediening van apoptotische thymocyten de ontwikkeling van atherosclerose in muizen verminderde<sup>17</sup>. Vergelijkbaar met onze studie, het aantal macrofagen en T cellen in de atherosclerotische laesies verminderd. Opvallend is dat wij vooral effecten op monocytten hebben waargenomen, terwijl Hosseini *et al.* vooral effecten op de B cell respons vond, die leidde tot een inductie van IgM-producerende B1a cellen die beschermend zijn tegen atherosclerose<sup>17</sup>.

Een interessant aspect van onze studie is dat controle apoptotische DCs (niet geladen met oxLDL), weliswaar de expressie van ontstekingsbevorderende cytokines verminderen, maar niet het tolerogene fenotype in DCs induceren. Deze bevinding komt overeen met de studie van Hosseini *et al.* die geen invloed van apoptotische thymocyten op Tregs of IL-10 vond<sup>17</sup>. Wij beschrijven ook dat alleen in DCs die werden blootgesteld aan oxLDL-geïnduceerde apoptotische DCs, de expressie van PD-L1, IL-10, ABCA1 en ABCG1 werd verhoogd, wat erop duidt dat liver X receptor (LXR) signalering verhoogd was en dat is in lijn met het feit dat zowel blootstelling aan apoptotische cellen als aan cholesterol LXR activeert<sup>18-20</sup>. Het is al eerder aangetoond dat de LXR activering in DCs resulteert in een tolerogeen fenotype<sup>21</sup>. Onze hypothese is dat oxLDL-geïnduceerde apoptotische DCs atherosclerose-relevante antigenen kunnen overbrengen in de context van een anti-inflammatoire respons (efferocytose) en dat het extra cholesterol aanwezig in de oxLDL-geïnduceerde apoptotische cellen een aanvullend gunstig effect heeft op atherosclerose.

Phosphatidylserine (PS) bevattende liposomen kunnen apoptotische cellen nabootsen en kunnen ook ontstekingsreacties moduleren. PS draagt zorg voor de herkenning

van apoptotische cellen door DCs en macrofagen en het remt de rijping van DCs<sup>22-24</sup>. De intraveneuze toediening van PS-bevattende liposomen induceert de productie van de ontstekingsremmende cytokines TGF- $\beta$  en IL-10 door macrofagen en in een model voor het herstel na een hartinfarct verbeteren deze liposomen het herstel van de hartspier<sup>25</sup>. Deze benadering zou een eenvoudiger vertaling van onze data naar de kliniek kunnen zijn aangezien liposomen relatief eenvoudig kunnen worden geproduceerd. Hosseini *et al.* beschrijven dat PS liposomen inderdaad apoptotische cellen konden nabootsen en atherosclerose in atherosclerose gevoelige apolipoproteïne E deficiënte (apoE<sup>-/-</sup>) muizen verminderen<sup>17</sup>. In een preliminaire studie met een lagere dosis PS-liposomen konden wij echter geen gunstig effect op de ontwikkeling van atherosclerose in LDLr<sup>-/-</sup> muizen aantonen.

Een toename in de  $\beta$ -catenine signalering in DCs is een andere benadering om tolerantie in DCs te induceren en wij hebben onderzocht of dit een gunstig effect heeft op de ontwikkeling van atherosclerose. Hiervoor gebruikten wij in **hoofdstuk 3** CD11c- $\beta$ cat<sup>EX3</sup> muizen die een door de CD11c-promotor gedreven Cre recombinase bezitten in combinatie met een gefloxt exon 3 van het  $\beta$ -catenine gen, met als resultaat een constitutief actieve  $\beta$ -catenine signalering in CD11c positieve cellen.  $\beta$ -catenine signalering in DCs is een belangrijke factor in het ontstaan van een toleroogeen fenotype in DCs<sup>26-28</sup> en wij vonden na beenmergtransplantatie van CD11c- $\beta$ cat<sup>EX3</sup> beenmerg in LDLr<sup>-/-</sup> muizen een significante toename van het aantal Tregs en een 26% vermindering van de grootte van de atherosclerotische laesies. Deze laesies hadden ook een significant kleinere necrotische kern en vertoonden een verhoogde expressie van collageen. Ook het inspuiten van CD11c- $\beta$ cat<sup>EX3</sup> DCs in LDLr<sup>-/-</sup> muizen verminderde de grootte van de atherosclerose laesie met 21%. In deze experimenten gebruikten wij de expressie van CD11c als de manier om een constitutieve expressie van  $\beta$ -catenine te bewerkstelligen, CD11c is echter niet een exclusieve marker voor DCs<sup>29</sup>, aangezien CD11c expressie ook in monocytten en macrofagen onder hypercholesterolemische condities wordt geïnduceerd<sup>29,30</sup>. Interessant is dat Wnt3a signalering, wat  $\beta$ -catenine induceert, in macrofagen ook resulteert in een anti-inflammatoire fenotype<sup>31</sup> en dit kan bijdragen aan de positieve effecten die wij zien na beenmergtransplantatie. Het zal natuurlijk interessant zijn om het effect van DCs met  $\beta$ -catenine stabilisatie op geavanceerde atherosclerotische laesies te bepalen, eventueel in combinatie met een verhoging van het aantal behandelingen met DCs, aangezien DCs een halfwaardetijd van een week hebben<sup>32</sup>. Deze hogere behandelingsfrequentie wordt ook aanbevolen voor Provenge, een DC-gebaseerde therapie voor prostaatkanker<sup>33</sup>.

In de afgelopen jaren is de interesse in de mogelijkheden en voordelen van stamceltherapie sterk toegenomen en stamcellen worden dikwijls genoemd als "genezers" van diverse ziekten. Het onderzoek naar stamcellen en stamcelgebruik in de regeneratieve geneeskunde heeft een sterke ontwikkeling doorgemaakt. Mesenchymale stamcellen (MSCs) zijn specifiek gebruikt voor botvernieuwing<sup>34</sup>, neuroregeneratie<sup>35</sup> en het herstel van het hart na een infarct<sup>36</sup>. Meer recent is het duidelijk geworden dat MSCs ook immuun regulerende capaciteiten hebben en een positief effect op ontstekingsziekten kunnen uitoefenen, zoals bij experimentele muismodellen voor multiple sclerose, reumatoïde artritis en type 2 diabetes is vastgesteld<sup>37-40</sup>. In klinische

studies naar Graft-versus-Host ziekte en multiple sclerose is een gunstig effect van de behandeling met MSCs vastgesteld<sup>41,42</sup>. In **hoofdstuk 4** hebben wij daarom MSCs uit muizen ingespoten in LDLr<sup>-/-</sup> muizen die gevoed werden met een cholesterol-rijk dieet en wij ontdekten dat de toediening van MSCs het plasma niveau van CCL2 en het aantal monocytten en effector CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T cellen verlaagde. Daarnaast bleken MSCs een opvallend effect op het lipiden metabolisme te hebben; MSCs verlaagden de totale plasma cholesterol niveau door verlaging van het VLDL niveau als gevolg van een verlaagde *de novo* lipidensynthese. Het belangrijkste effect van de MSC therapie was een 33% reductie van de grootte van de atherosclerotische laesie.

Het effect van MSC therapie op het cholesterol metabolisme is nieuw, maar aangezien het effect pas vier tot vijf weken na de MSCs inspuiting ontstond, vermoeden wij dat het effect op het cholesterolmetabolisme een indirect gevolg kan zijn van een afname in de ontsteking. Dit kan afgeleid worden uit het feit dat IL-10 in staat is de VLDL synthese te verlagen<sup>43</sup> en de TNF- $\alpha$  de VLDL synthese<sup>44</sup> kan verhogen, wat aangeeft dat modulatie van cytokine responsen door MSCs dyslipidemie kan verbeteren. Omdat MSCs zijn onderzocht voor hun rol in het herstel van het hartweefsel na een infarct, is het relevant om ook de effecten op het cholesterolgehalte vast te stellen bij deze MSC behandelde patiënten. In een kleine patiëntengroep van 18 personen is aangetoond dat intracoronaire stamcelinfusie volgend op een hartinfarct, de grootte van de atherosclerotische plaque in de coronair vaten vermindert<sup>45</sup>, wat erop kan duiden dat MSC behandeling nuttig is voor patiënten met atherosclerose.

Twee recente studies hebben aangetoond dat MSCs de uitkomst van atherosclerose kunnen verbeteren. Lin *et al.* laten zien dat MSC therapie de vaatverwijding verbetert door verhoging van eNOS expressie in endotheelcellen leidend tot een kleinere atherosclerotische laesie in de aorta van ApoE<sup>-/-</sup> muizen<sup>46</sup>. Een studie van Wang *et al.* beschrijft dat MSC therapie de atherosclerotische laesies in de aortawortel in ApoE<sup>-/-</sup> muizen verkleint door het induceren van Tregs<sup>47</sup>. Interessant is dat het eerste onderzoek geen effect op plasma cholesterolniveau's vindt<sup>46</sup>, terwijl de tweede studie de cholesterol niveaus niet vermeldt. Lin *et al.* gebruikten humane MSCs en Wang *et al.* gebruikten ApoE<sup>-/-</sup> MSCs, terwijl wij MSCs uit wild type (C57BL/6) muizen gebruikten. Bij humane MSCs bestaat het gevaar van xenotransplantaat afstoting. Verder blijken verhoogde cholesterolwaarden in stamcellen van ApoE<sup>-/-</sup> knock-out muizen te leiden tot de proliferatie van hematopoïetische stamcellen en progenitor cellen<sup>48</sup>, wat kan suggereren dat een verstoorde cholesterol homeostase in ApoE<sup>-/-</sup> MSCs ten opzichte van de wildtype MSCs tot andere effecten op atherosclerose kan leiden. Toekomstig onderzoek zal meer inzicht moeten verschaffen over het type MSCs met het meest gunstige effect op HVZ.

## **(2) Geneesmiddelen en biologics om de immuuncel functie in vivo te moduleren**

Naast cellulaire therapie kunnen geneesmiddelen (small molecules) en biologics worden gebruikt om immuun cellen te moduleren of een specifieke subset van de immuun cellen te induceren.

In een eerste benadering hebben wij gebruik gemaakt van het feit dat het



immuunsysteem een intrinsiek controlemechanisme heeft om ontstekingsreacties te verminderen tijdens het opruimen van een pathogeen, dit gebeurt om het herstel van de weefselhomeostase te waarborgen. De activatie van Toll-Like Receptoren (TLRs) door pathogenen leidt dus niet alleen tot initiële ontstekingsreacties, maar in latere stadia ook tot anti-inflammatoire responsen zoals de inductie van IL-10<sup>49</sup>. Verschillende studies hebben gesuggereerd dat TLR2 activatie specifiek IL-10 induceert<sup>49-51</sup>, waarbij er een fundamenteel verschil is tussen de verschillende types antigeen presenterende cellen en hun vermogen om IL-10 te produceren: macrofagen produceren hoge niveaus van IL-10 in reactie op TLR2 activatie, terwijl TLR2 activatie in DCs tot veel lagere hoeveelheden IL-10 leidt<sup>50,52</sup>. In **hoofdstuk 5** laten wij zien dat een *intrapertoneale* injectie met door verhitting gedode *Staphylococcus aureus* (HK-SA) een krachtige anti-inflammatoire IL-10 respons induceert. Dit leidt tot een verminderde ontsteking en daardoor wordt de ontwikkeling van atherosclerose in de aorta met 34% gereduceerd. Wij laten ook zien dat de inductie van IL-10 door HK-SA afhankelijk is van TLR2/PI3K signalering en dit leidt tot een immunoregulatorisch M2b fenotype in macrofagen. De sterke IL-10-productie verminderde de expressie van adhesiemoleculen (VCAM-1 en ICAM-1) en CCL2 in de aorta, terwijl de hoeveelheid circulerende pro-inflammatoire Ly-6C<sup>hi</sup> monocyten en de hoeveelheid macrofagen in de laesie drastisch verminderde. Daarenboven werden lagere Th1 en Th17 responsen waargenomen en bleken het aantal T cellen in de laesie verminderd na een behandeling met HK-SA. Onze data laten zien dat TLR2/PI3K-afhankelijke signalering een goede target kan zijn om een anti-inflammatoire IL-10 reactie in macrofagen te induceren en daardoor de monocyt/macrofaag en T cel response te verlagen, wat een behandeling voor atherosclerose mogelijk kan maken.

Er zijn verschillende strategieën beschreven die de ontsteking verminderen door immunoregulatorische of tolerogene cellen te induceren. Eén van de meest onderzochte immuuncellen in het kader van atherosclerose is de Treg. In eerdere hoofdstukken (hoofdstukken 2, 3 en 4) verhoogden onze behandelwijzen indirect het niveau van de Tregs en dit droeg bij aan het positieve effect van deze behandelingen op de ontwikkeling van atherosclerose. In deze studies werd slechts een bescheiden toename gevonden van het aantal Tregs (1.5 tot 1.8 maal) en de toename was ook niet erg langdurig. In **hoofdstuk 6** hebben wij daarom onderzocht of een significante en langdurige toename van het aantal Tregs door toediening van een IL-2/anti-IL2 complex de ontwikkeling van atherosclerose zou kunnen verminderen en regressie van bestaande laesies zou kunnen veroorzaken. De behandeling met het IL-2/anti-IL2 complex resulteerde in een sterke, 10-voudige, inductie van Tregs en een verhoogde IL-10 expressie in de milt. De sterke expansie van de Tregs verminderde de ontwikkeling van atherosclerose met 39%, wat erop wijst dat Tregs initiële atherosclerose remmen. De door het IL-2/anti-IL2 complex geïnduceerde Tregs hadden echter geen invloed op de grootte van reeds ontwikkelde laesies, maar het IL-2/anti-IL2 complex kon wel de stabiliteit van deze laesies bevorderen door een 21% toename van de hoeveelheid collageen. Deze laatste waarneming is klinisch relevant omdat patiënten op het moment dat ze behandeld worden in de meeste gevallen bestaande laesies hebben en mogelijk kan een sterke expansie van de Tregs de laesies stabiliseren.

Macrofagen en DCs presenteren atherosclerose-relevante antigenen in samenhang met cytokine productie en deze cellen kunnen vervolgens de reactie van T cellen beïnvloeden. Voor de presentatie van antigenen op het "Major Histocompatibility Complex" (MHC) I, is het noodzakelijk dat antigenen door het proteasoom worden verwerkt. Het proteasoom speelt ook een centrale rol in inflammatoire signaleringsroutes tijdens atherosclerose, aangezien het betrokken is bij de afbraak van sleuteleiwitten in de signaleringsroutes, zoals TLR, de TNF receptor en T cel receptor signaalroutes. Maar ook signaaleiwitten en transcriptiefactoren betrokken bij het lipiden metabolisme worden afgebroken door het proteasoom. Wij hebben daarom in **hoofdstuk 7** onderzocht of remming van het proteasoom door Bortezomib zowel ontsteking in de vaatwand als dyslipidemie kan verminderen. Wij vonden dat de behandeling met Bortezomib een significante vermindering van de activiteit van monocytten en macrofagen bewerkstelligde, zoals bleek uit een lager aantal circulerende pro-inflammatoire monocytten en een lager aantal macrofagen in de aorta en in de lever. Bortezomib verminderde ook de Th1 respons en verhoogde Th2 responsen. Het opvallendste effect van Bortezomib was echter het sterke effect op het VLDL metabolisme aangezien de VLDL secretie met meer dan de helft gereduceerd werd in Bortezomib behandelde muizen, ten gevolge van een significante daling van de triglyceride opname, een daling van de *de novo* lipiden synthese en een verhoogde galzuur uitscheiding door de lever. De Bortezomib behandeling verminderde de ontsteking en de leververvetting, wat gezamenlijk bijdroeg aan een robuuste 58% reductie in laesie grootte. De effecten op monocytten waren vergelijkbaar met de effecten die beschreven zijn door Wilck *et al.*, maar zij vonden geen effecten van Bortezomib op T cellen of lipiden metabolisme<sup>53</sup>. Zij vonden echter wel een lagere expressie van HMG-CoA reductase in de aorta, maar geven geen data over de expressie in de lever. Waarschijnlijk is de dosis van Bortezomib die nodig is voor lipiden verlaging in het onderzoek van Wilck *et al.* niet bereikt en daarom is het interessant om te onderzoeken wat de minimale dosis Bortezomib is die nog invloed heeft op het lipiden metabolisme.

### Perspectieven

Het zal interessant zijn om de resultaten van grote klinische trials zoals de CIRT en CANTOS te volgen aangezien zij voor de eerste keer op grote schaal zullen bepalen of een remming van ontstekingsreacties cardiovasculaire gebeurtenissen kan reduceren. Bovendien is het interessant om te bepalen of een combinatie van statine behandeling met nieuwe anti-inflammatoire therapieën een gunstiger uitkomst geeft voor de patiënt. Het lijkt ook waarschijnlijk dat de toekomstige cardiovasculaire behandelingsstrategie juist een gecombineerde behandeling voor het verminderen van lipiden en ontsteking zal zijn, aangezien atherosclerose wordt bepaald door zowel dyslipidemie als ontsteking. Bij het vergelijken van alle benaderingen die wij in dit proefschrift hebben gebruikt, is het duidelijk dat de strategieën die alleen ontsteking beïnvloeden de laesie grootte maximaal 40% verminderen, terwijl alleen een remming van zowel de ontsteking als het lipiden metabolisme door Bortezomib, een grotere laesie vermindering tot 58% mogelijk maakt. Daarom zullen toekomstige cardiovasculaire behandelingsstrategieën gericht zijn op het reduceren van zowel

ontsteking en dyslipidemie, hetzij door toediening van geneesmiddelen, zoals bijvoorbeeld Bortezomib, die beide processen sterk remmen of door een combinatie van therapieën.

In dit proefschrift bevestigen wij dat immuuncel-gebaseerde therapieën een sterke potentie hebben voor de behandeling van atherosclerose. Echter, een aantal problemen om experimentele behandelingen naar de kliniek te vertalen blijven bestaan en de ontwikkeling van immuuncel-gebaseerde therapieën voor atherosclerose zal, evenals voor andere ziekten, een uitdaging zijn die de moeite waard is.

## References

1. Go, A. S. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 129, e28–e292 (2014).
2. Conen, D. Alcohol consumption and incident cardiovascular disease: not just one unifying hypothesis. *Eur. Heart J.* (2015).
3. Legein, B., Temmerman, L., Biessen, E. A. L. & Lutgens, E. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3847–69 (2013).
4. Nicholas, M., Townsend, N., Scarborough, P. & Rayner, M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur. Heart J.* (2014).
5. Go, A. S. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, e6–e245 (2013).
6. Smolina, K., Wright, F. L., Rayner, M. & Goldacre, M. J. Determinants of the decline in mortality from acute myocardial infarction in England between 2002 and 2010: linked national database study. *BMJ* 344, d8059 (2012).
7. Finucane, M. M. *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377, 557–67 (2011).
8. Danaei, G. *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 378, 31–40 (2011).
9. Finegold, J. A., Asaria, P. & Francis, D. P. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int. J. Cardiol.* 168, 934–45 (2013).
10. Leal, J., Luengo-Fernández, R., Gray, A., Petersen, S. & Rayner, M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur. Heart J.* 27, 1610–9 (2006).
11. Sary, H. C. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1297S–1306S (2000).
12. Cannon, C. P. *et al.* Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 350, 1495–504 (2004).
13. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 36–46 (2010).
14. Foks, A. C. *et al.* T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3 Acts as a Negative Regulator of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2558–65 (2013).
15. Elliott, M. R. & Ravichandran, K. S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.* 189, 1059–70 (2010).
16. Habets, K. L. L. *et al.* Vaccination using oxidized low-density lipoprotein-pulsed dendritic cells reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc. Res.* 85, 622–30 (2010).
17. Hosseini, H. *et al.* Phosphatidylserine Liposomes Mimic Apoptotic Cells to Attenuate Atherosclerosis by Expanding Polyreactive IgM Producing B1a lymphocytes. *Cardiovasc. Res.* (2015). doi:10.1093/cvr/cvv037
18. Shiffman, D. *et al.* Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 37324–32 (2000).
19. Kiss, R. S., Elliott, M. R., Ma, Z., Marcel, Y. L. & Ravichandran, K. S. Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. *Curr. Biol.* 16, 2252–8 (2006).
20. A-Gonzalez, N. *et al.* Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31, 245–58 (2009).
21. Geyeregger, R. *et al.* Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* 109, 4288–95 (2007).

## Dutch Summary

22. Chen, X., Doffek, K., Sugg, S. L. & Shilyansky, J. Phosphatidylserine regulates the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 173, 2985–94 (2004).
23. Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–16 (1992).
24. Fadok, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85–90 (2000).
25. Harel-Adar, T. *et al.* Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1827–32 (2011).
26. Jiang, A. *et al.* Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27, 610–24 (2007).
27. Vander Lugt, B. *et al.* TGF- $\beta$  suppresses  $\beta$ -catenin-dependent tolerogenic activation program in dendritic cells. *PLoS One* 6, e20099 (2011).
28. Manicassamy, S. *et al.* Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 329, 849–53 (2010).
29. Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D. A., Mowat, A. M. & Randolph, G. J. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 453–60 (2010).
30. Wu, H. *et al.* Functional role of CD11c<sup>+</sup> monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* 119, 2708–17 (2009).
31. Schaale, K., Neumann, J., Schneider, D., Ehlers, S. & Reiling, N. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 553–9 (2011).
32. Merad, M. & Manz, M. G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418–27 (2009).
33. Ahmed, M. S. & Bae, Y.-S. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: past, present and future. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 3, 113–6 (2014).
34. Keramaris, N. C. *et al.* Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in bone healing. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 7, 293–301 (2012).
35. Glavaski-Joksimovic, A. & Bohn, M. C. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 247, 25–38 (2013).
36. Wen, Z., Zheng, S., Zhou, C., Wang, J. & Wang, T. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1032–43 (2011).
37. Zappia, E. *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106, 1755–61 (2005).
38. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R. & Pennesi, G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 56, 1175–86 (2007).
39. Chen, M. *et al.* Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of regulatory T cell differentiation. *Arthritis Rheum.* 65, 1181–93 (2013).
40. Shin, L. & Peterson, D. A. Impaired Therapeutic Capacity of Autologous Stem Cells in a Model of Type 2 Diabetes. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 125–135 (2012).
41. Le Blanc, K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579–86 (2008).
42. Bai, L. *et al.* Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat. Neurosci.* 15, 862–70 (2012).
43. Von Der Thüsen, J. H. *et al.* Attenuation of atherosclerosis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J.* 15, 2730–2 (2001).
44. Ruan, H. *et al.* Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176–88 (2002).
45. Benedek, I., Bucur, O. & Benedek, T. Intracoronary infusion of mononuclear bone marrow-derived stem cells is associated with a lower plaque burden after four years. *J. Atheroscler. Thromb.* 21, 217–29 (2014).
46. Lin, Y.-L., Yet, S.-F., Hsu, Y.-T., Wang, G.-J. & Hung, S.-C. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Atherosclerotic Lesions via Restoring Endothelial Function. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 44–55 (2014).
47. Wang, Z. X. *et al.* Mesenchymal stem cells alleviate atherosclerosis by elevating number and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T-cells and inhibiting macrophage foam cell formation. *Mol. Cell. Biochem.* 400, 163–172 (2014).
48. Westerterp, M. *et al.* ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* 114, 157–70 (2014).
49. Saraiva, M. & O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–81 (2010).
50. Frodermann, V. *et al.* A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 204, 253–62

- (2011).
51. Netea, M. G. *et al.* Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* 172, 3712–8 (2004).
  52. Boonstra, A. *et al.* Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J. Immunol.* 177, 7551–8 (2006).
  53. Wilck, N. *et al.* Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1418–26 (2012).

