



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulation of T cell responses in atherosclerosis

Puijvelde, G.H.M. van

Citation

Puijvelde, G. H. M. van. (2007, June 28). *Regulation of T cell responses in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12149>

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/1887/12149>

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

Nederlandse samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn ondanks het vele onderzoek en de verschillende cholesterol en bloeddruk verlagende middelen nog steeds doodsoorzaak nummer 1 in Nederland. 33% van alle sterfgevallen in 2006 waren direct of indirect gerelateerd aan een hart- of een vaat-aandoening met als belangrijkste gevolg een beroerte of een acuut hartinfarct. Hart- en vaatziekten worden voornamelijk veroorzaakt door aderverkalking (atherosclerose). Zoals bij de meeste mensen wel bekend is, dragen veel factoren bij aan het ontstaan van hart- en vaatziekten, zoals hoge cholesterol waarden in het bloed, een verhoogde bloeddruk, roken, te weinig lichaamsbeweging en suikerziekte (diabetes). De aderverkalking uit zich als een verdikking van de bloedvatwand en wordt verkalking genoemd omdat in een later stadium veel calcium in de verdikking zit die leidt tot de vernauwing van een slagader. Dit proces begint al op vroege leeftijd en vlak na de puberteit zijn de eerste verdikkingen waar te nemen in verschillende slagaderen. Verwarrend is daarom de naam aderverkalking, want atherosclerose vindt alleen plaats in de slagaderen. Wat veel mensen echter niet weten is dat atherosclerose in feite een autoimmuun component bevat waarbij slechte voeding, roken en weinig lichaamsbeweging ook via het immuun systeem de progressie van atherosclerose kunnen beïnvloeden.

Ontstaan van atherosclerose; een grote rol voor het immuun systeem

Het begin van atherosclerose is een ophoping van vet en met name cholesterol in daarvoor gevoelige plaatsen in de vaatwand van de slagaderen. Deze plaatsen hebben vaak een turbulente bloedstroom waardoor het endotheel dat zorgt voor de bescherming van de vaatwand doorlaatbaar wordt voor vetten en bloedcellen. Het endotheel kan gevoeliger zijn voor de turbulente bloedstroom door bijvoorbeeld roken, maar ook door de hoeveelheid vet in het bloed. Het beschadigde endotheel zorgt vervolgens voor het aantrekken van allerlei ontstekingscellen, de witte bloedcellen. Monocyten en T cellen, twee soorten witte bloedcellen, migreren in eerste instantie via het endotheel de vaatwand in. Monocyten differentiëren in de vaatwand tot macrofagen en kunnen het opgehoopte vet in de vaatwand opnemen. Dit leidt tot de vorming van een zogenaamde 'foamcell' of schuim cel. De T cellen die worden aangetrokken in de vaatwand kunnen daar opnieuw geactiveerd worden doordat ze specifieke moleculen, antigenen, herkennen in de verdikking die nu een plaque genoemd wordt. Deze antigenen worden gepresenteerd door antigeen presenterende cellen zoals de macrofagen en dendritische cellen (DCs). Omdat er bij atherosclerose sprake is van een autoimmuun reactie betekent dit dat een immunologische reactie wordt opgewekt tegen lichaamseigen antigenen. De antigenen kunnen bijvoorbeeld immunogeen worden doordat ze een structurele verandering ondergaan. Dit is het geval bij lage-dichtheid lipoproteïnen (LDL). In de vaatwand kan dit niet-

immunogene LDL geoxideerd worden tot oxLDL. Deze gemodificeerde variant kan opgenomen worden door macrofagen en DCs en via MHC moleculen gepresenteerd worden aan T cellen. Naast de modificatie van lichaamseigen stoffen die zo immunogeen worden, zijn er ook moleculen die immunogeen worden doordat ze grote structurele overeenkomsten hebben met moleculen die op bacteriën tot expressie komen. De "heat shock proteïnen" zijn hier het bekendste voorbeeld van en ook zij vormen een belangrijke groep van auto-antigenen in atherosclerose.

De T cellen die dit antigeen herkennen raken geactiveerd en produceren cytokines. Deze cytokines zijn kleine moleculen die een grote invloed kunnen hebben op het verdere verloop van een ontsteking. Over het algemeen zijn de T cellen in atherosclerose Th1 cellen en produceren ze atherosclerose-bevorderende cytokines (Th1 cytokines). Tegenover Th1 cytokines staan de Th2 cytokines die geproduceerd worden door onder andere Th2 cellen. Deze cytokines hebben over het algemeen een positieve uitwerking op atherosclerose. Lang is er verondersteld dat een verstoring in de balans van deze Th1 en Th2 cellen aan de basis lag van de immunologische reactie in atherosclerose.

Regulatorische T cellen

Uit recent onderzoek is gebleken dat niet alleen de verstoorde balans tussen deze Th1 en Th2 cellen een belangrijke veroorzaker is van de schadelijke immunologische reactie in atherosclerose. Een verstoorde balans tussen pathogene T cellen (Th1 en Th2) aan de ene kant en regulatorische T cellen (Tregs) aan de andere kant vormt een nieuwe hypothese. Tregs zijn T cellen die gekenmerkt worden door de productie van atherosclerose-remmende cytokines als IL-10 en TGF- β . Natuurlijke Tregs zijn te herkennen aan de specifieke expressie van Foxp3 dat een rol speelt in de ontwikkeling van de Tregs. Naast de natuurlijke Tregs, zijn er ook adaptieve Tregs die na activatie Foxp3 tot expressie brengen (Th3 cellen). Deze Th3 cellen produceren voornamelijk TGF- β . In de **hoofdstukken 2 en 3** is gebruik gemaakt van een methode waarbij specifieke regulatorische T cellen kunnen worden geïnduceerd. Deze methode, orale tolerantie inductie, is een eenvoudige methode waarbij een antigeen, waartegen een regulatorische T cel response opgewekt dient te worden, toegediend wordt via de mond. Deze route zorgt ervoor dat het antigeen in de darmen komt. Daar wordt het door gespecialiseerde cellen opgenomen en uiteindelijk wordt het antigeen door tolerogene dendritische cellen gepresenteerd. Afhankelijk van de toegediende dosis kan het lokale cytokine milieu in de darmen zorgen voor een activatie van Tregs. In **hoofdstuk 2** werd aangetoond dat de orale toediening van oxLDL leidde tot een 71% reductie in initiële atherosclerotische plaque vorming. In een tweede experiment is aangetoond dat orale tolerantie inductie tegen oxLDL ook een remmend effect heeft op al aanwezige atherosclerose. De tolerantie inductie tegen oxLDL leidde ook tot een toename in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs in lymfeknopen en de milt. Miltcellen, geïsoleerd uit met oxLDL behandelde muizen, produceerden meer TGF- β dan miltcellen uit controle behandelde muizen. Dit wijst op een activatie van oxLDL-specifieke Tregs. Ook leidde de tolerantie inductie tot een verhoogde expressie van genen specifiek voor Tregs,

namelijk Foxp3, CD25 en CTLA-4 in de atherosclerotische plaque. Dezelfde techniek is gebruikt in **hoofdstuk 3**. Hier is echter gebruik gemaakt van HSP60 en een van HSP60 afgeleid peptide (HSP60(253-268)). Orale toediening van beide antigenen leidde tot een reductie in initiële plaque vorming (81%). In de met HSP60 behandelde muizen werd 4 dagen na de behandeling een toename in het aantal CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs waargenomen in het bloed en de Peyer's patches in de darmen. Na 2 weken was het aantal Tregs ook toegenomen in de mesenterische lymfeknopen en de milt terwijl het aantal in de Peyer's patches weer was afgenomen. Dit kan verklaard worden door de migratie van Tregs van de Peyer's patches via het bloed naar de lymfeknopen en de milt. In deze studie bleken de specifieke cellen uit de mesenterische lymfeknopen van HSP60 behandelde muizen in response op HSP60 niet alleen meer TGF- β te produceren maar ook meer IL-10 dan cellen uit een controle behandelde muis. Samengevat blijken de specifieke CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs een zeer positieve uitwerking te hebben op atherosclerose en beide studies ondersteunen dan ook de nieuwe kijk op de verstoorde balans tussen verschillende T cellen in atherosclerose. Het gebruik van orale tolerantie vormt dus een succesvolle methode om de immunologische reactie in atherosclerose ten gunste te keren.

Dendritische cellen

Dendritische cellen zijn belangrijke antigeen presenterende cellen en spelen een rol in de activatie van T cellen en ook natuurlijke killer T (NKT) cellen die later in het proefschrift behandeld zullen worden. Het feit dat ze zo potent zijn in het activeren van deze cellen maakt ze uitermate geschikt om ze bij vaccinatie te gebruiken. In verschillende studies was al beschreven hoe DCs kunnen worden beladen met antigenen en na teruggave aan de muizen een beschermend effect kunnen uitoefenen. De techniek van het toedienen van antigenen door ze toe te dienen via DCs die opgeladen zijn met het antigeen werd gebruikt in **hoofdstuk 4**. In deze studie werden DCs geladen met oxLDL en intraveneus toegediend aan LDLr deficiënte muizen alvorens atherosclerose werd geïnduceerd door een vetrijk dieet. Deze geladen DCs leidden tot een 87% tot 92% reductie in atherosclerose. Daarbij waren de laesies in met oxLDL geladen DCs behandelde muizen stabielere dan in de controle muizen. De stabielere plaques hebben minder kans om tot een ruptuur te leiden, mogelijk gevolgd door een stolling en afsluiting van het bloedvat. Een verklaring voor de reductie in plaquegrootte werd gevonden in het feit dat er een verhoogde concentratie van IgG antilichamen tegen oxLDL werd waargenomen in het serum van de muizen die met oxLDL geladen DCs zijn behandeld. Dit was toe te schrijven aan een activatie van oxLDL specifieke T cellen. Het serum van de behandelde muizen bleek ook een remmende werking te hebben op de vorming van met vet beladen macrofagen, de zogenaamde schuimcellen. Dit kan veroorzaakt worden door verschillende mechanismen. IgG antilichamen kunnen complexen vormen met oxLDL waardoor dit oxLDL sneller uit de circulatie wordt verwijderd, nog voordat het enig negatief effect kan hebben. Een ander verklaring zou kunnen zijn dat door de complex vorming, het oxLDL minder goed via scavenger receptoren opgenomen kan worden en daardoor minder vetstapeling geeft. De

exacte verklaring is echter nog onduidelijk en meer experimenten zullen hier uitsluitend over geven.

NKT cellen

Naast de Th1/Th2 cellen en Tregs is uit recent onderzoek gebleken dat ook NKT cellen een belangrijke rol spelen in atherosclerose. NKT cellen zijn Natural Killer cellen met T cel eigenschappen. De normale NK cellen zijn verantwoordelijk voor het specifiek verwijderen van lichaamsvreemde substanties terwijl NKT cellen een specifieke T cel receptor hebben waardoor ze alleen op bepaalde antigenen reageren. In tegenstelling tot de normale T cellen worden NKT cellen echter niet geactiveerd door eiwit-antigenen maar door vet (lipide)-antigenen. De activatie van NKT cellen leidt tot de productie van verschillende cytokines, zowel pro-atherogeen (Th1) als anti-atherogeen (Th2). Dit geheel, en met name de response op lipide-antigenen, maakt deze cellen extra interessant in het proces van atherosclerose. Uit een aantal recente publicaties is gebleken dat het uitschakelen van NKT cellen in muizen leidt tot een vermindering van atherosclerose. Daarnaast is het mogelijk om specifiek NKT cellen te activeren met een synthetisch ligand, het zogeheten α -galactosylceramide (α -GalCer). Naast α -GalCer is er op dit moment ook nog een tweede synthetisch ligand, OCH. OCH leidt net als α -GalCer tot activatie van de NKT cellen, maar in tegenstelling tot α -GalCer leidt dit tot de productie van meer anti-atherogene cytokines; voornamelijk IL-10.

In **hoofdstuk 5 en 6** is voor het eerst aangetoond dat NKT cellen ook een beschermende rol kunnen spelen in atherosclerose. In **hoofdstuk 5** werden LDL receptor (LDLr) en apolipoproteïne E (apoE) deficiënte muizen na de inductie van atherosclerose door een vetrijk dieet, gedurende 7 weken twee maal per week behandeld met α -GalCer. Dit leidde tot een 84% afname in plaque vorming in de LDLr deficiënte muizen. Er was echter geen significante afname van atherosclerose in apoE deficiënte muizen. De verschillen tussen beide muismodellen werden verder benadrukt door de verschillen in proliferatie en cytokine profiel na *in vitro* stimulatie van miltcellen met α -GalCer. LDLr deficiënte miltcellen prolifererden veel sterker in response op α -GalCer dan apoE deficiënte miltcellen, terwijl de toename in IL-4 en IL-10 productie na α -GalCer stimulatie in LDLr deficiënte muizen ook veel groter was. Ook resulteerde het vetrijke dieet in LDLr deficiënte muizen tot een toename in het percentage NKT cellen in de milt en de lever. Dit effect was afwezig in de eerste weken in de apoE deficiënte muizen, maar later na 4.5 week dieet werd ook in deze muizen een toename in NKT cellen in de lever waargenomen. Uit andere studies was al gebleken dat de behandeling van apoE deficiënte muizen met α -GalCer niet bevorderend was voor atherosclerose. Een verklaring voor de verschillen in response op α -GalCer tussen beide muismodellen kan worden gevonden in het feit dat apoE een belangrijke rol speelt in de presentatie van lipide antigenen. ApoE deficiënte muizen missen apoE en hebben daardoor een minder effectieve lipide antigen presentatie. Daarnaast lijkt het toedienen van een vetrijk dieet de NKT cellen in LDL deficiënte muizen al te activeren waarna α -GalCer een positieve uitwerking heeft en een toename in Th2 cytokines

veroorzaakt. Mede daardoor veroorzaakt dit een vermindering in plaque grootte. In apoE deficiënte muizen is deze activatie via het dieet afwezig op het moment dat α -GalCer wordt toegediend. We veronderstellen nu dat de latere effecten van het dieet in combinatie met α -GalCer resulteren in het feit dat er geen verschil in plaque grootte wordt waargenomen, terwijl in andere studies zonder een vetrijk dieet een enorme toename in plaque grootte in deze muizen werd beschreven.

In **hoofdstuk 6** is aangetoond dat NKT cellen dusdanig gestimuleerd kunnen worden zodat ze een positieve uitwerking hebben op de immunologische reactie tijdens atherosclerose. In dit hoofdstuk werd gebruik gemaakt van de α -GalCer analoog OCH. Het is bekend dat NKT cellen, geactiveerd door dit ligand, meer Th2 cytokines produceren. In een eerdere publicatie was gevonden dat dit ligand echter ook een negatieve werking had op atherosclerose geïnduceerd in apoE deficiënte muizen. In onze studie is dit bestudeerd maar dan in LDLr deficiënte muizen. In een eerste experiment werden LDLr deficiënte muizen waarin atherosclerose was geïnduceerd gedurende 7 weken twee maal per week behandeld met OCH door middel van intra-peritoneale injecties. Dit bleek echter niet succesvol. Daarop werd overgestapt op een ander vorm van toediening van OCH, namelijk geladen op DCs. Uit de literatuur bleek namelijk dat dit een effectieve manier kan zijn om een langdurige NKT cel activatie te induceren. DCs migreerden na intraveneus te zijn geïnjecteerd voornamelijk naar de longen en de lever, maar ook naar de milt. Migratie naar de lever is belangrijk aangezien daar de meeste NKT cellen aanwezig zijn. De behandeling van LDLr deficiënte muizen met OCH geladen DCs, nog voordat atherosclerose werd geïnduceerd, leidde tot een significante 58 tot 71% reductie in plaque vorming. De behandeling ging gepaard met een toename in NKT cellen in zowel het bloed als de lever. De NKT cellen bleken in response op OCH geladen DCs ook meer IL-10 te produceren dan NKT cellen uit muizen behandeld met controle DCs. De toegenomen productie van IL-10, met name in de lever, kan de oorzaak zijn van de reductie in cholesterol die werd waargenomen in muizen behandeld met OCH-geladen DCs aan het eind van het experiment.

NKT cel liganden

In **hoofdstuk 7** is getracht om de natuurlijke ligand voor de hierboven genoemde NKT cellen te achterhalen. Aangezien NKT cellen geactiveerd worden door lipide antigenen en er in atherosclerose veel lipide antigenen aanwezig zijn, werd het mogelijk geacht dat een van deze lipiden NKT cel activatie tot gevolg heeft. Deze gedachte werd ondersteund door het feit dat afwezigheid van CD1d een remmend effect had op atherosclerose. CD1d is een receptor voor lipide antigenen. In deze studie is net als in **hoofdstuk 5** aangetoond dat een vetrijk dieet een stimulerende werking heeft op NKT cellen. LDLr deficiënte muizen welke het vetrijke dieet hebben gegeten bezitten veel meer NKT cellen in de lever, de milt en lymfeknopen dan wanneer er geen vetrijk dieet wordt gegeten. Er is ook aangetoond dat oxLDL tot minder proliferatie van miltcellen leidt wanneer NKT cellen afwezig zijn. Het kruisen van LDLr deficiënte muizen met $J\alpha 281$ deficiënte muizen (missen NKT cellen) had echter verrassend genoeg geen

effect op de plaque grootte. Dit komt overigens overeen met een aantal eerdere studies, waarin CD1d deficiëntie alleen een vermindering in atherosclerose veroorzaakte in de initiële fase en niet beschermend voor meer gevorderde vaatvernauwing.

Samenvattend laat dit proefschrift zien dat de activiteit van verschillende soorten T en NKT cellen tijdens atherosclerose op verschillende manieren therapeutisch te beïnvloeden is. Regulatorische T cellen blijken een uitermate positieve uitwerking te hebben op atherosclerose. Daarnaast blijkt dat met behulp van DCs het activeren van oxLDL-specifieke T cellen en de daarop volgende toename in oxLDL specifieke antilichamen ook een positief effect heeft op atherosclerose. Verder is aangetoond dat NKT cellen een complexe rol spelen in de immunologie van atherosclerose. Ze kunnen een beschermende rol hebben in atherosclerose, wanneer ze 1) direct geactiveerd worden met behulp van α -GalCer, of wanneer ze 2) geactiveerd worden met een ligand (OCH) geladen op DCs. De studies in dit proefschrift leiden niet alleen tot meer inzicht in de rol van het immuunsysteem bij de vet-geïnduceerde aderverkalking, maar creëren een therapeutisch protocol dat in de toekomst mogelijk kan worden toegepast ter vermindering van de incidentie van hart- en vaatziekten bij de mens.