



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Vaccination against atherosclerosis

Es, T. van

Citation

Es, T. van. (2009, January 29). *Vaccination against atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13450>

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/1887/13450>

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

Nederlandse samenvatting

Thomas van Es

ADERVERKALKING

Hart- en vaatziekten zijn de voornaamste doodsoorzaak in de Westerse wereld. Het overtreft de aan kanker gerelateerde doodsoorzaken. Patiënten met hart- en vaatziekten ervaren pas op latere leeftijd de klinische symptomen zoals angina pectoris (drukkend/pijnlijk gevoel op de borst) of een infarct (hartaanval, beroerte). Deze symptomen zijn gerelateerd aan een vernauwd of geblokkeerd bloedvat, waardoor de bloedtoevoer naar distaal gelegen weefsel geblokkeerd of gelimiteerd wordt. De vernauwingen zijn het gevolg van een chronische ontsteking in het bloedvat wat resulteert in het ontstaan van een laesie. Deze laesie bestaat uit ontstekingscellen en cholesterol deposito's. Dit proces staat bekend als aderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd.

Atherosclerose begint al vroeg in het leven doordat er cholesterol wordt afgezet in de vaatwand en dit vormt de zogenoemde "fatty streak". Dit leidt echter niet tot klinische symptomen, omdat deze fatty streaks nog niet tot een obstructie van de doorbloeding leidt. Gedurende het leven worden deze laesies groter en dit kan uiteindelijk leiden tot klinische symptomen. De leeftijd waarop de symptomen optreden is in grote mate afhankelijk van de blootstelling aan risicofactoren. Bekende risicofactoren zijn overgewicht, een hoog bloed cholesterolgehalte, roken, hoge bloeddruk en te weinig lichaamsbeweging. Daarnaast dragen ziektes zoals diabetes en reuma ook bij aan een verhoogd risico voor hart- en vaatziekten. Het is dan ook niet verwonderlijk dat hart- en vaatziekten voornamelijk in de "Westerse wereld" voorkomen.

Op dit moment is behandeling van atherosclerose voornamelijk gericht op het verminderen van risicofactoren. Een veel voorgeschreven behandeling is de toediening van statines. Statines zijn in staat om het cholesterol gehalte te doen verlagen en in combinatie met aanbevolen lichaamsbeweging resulteert dit in een verbeterde klinische uitkomst. Ondanks deze behandeling blijft het sterftecijfer, dat gerelateerd is aan hart- en vaatziekten, erg hoog. Daarom is er ook een grote noodzaak om nieuwe behandelmethodes te ontwikkelen.

ONTSTEKING EN ADERVERKALKING

Recentelijk is geconstateerd dat het immuunsysteem (de cellen en organen die betrokken zijn bij een ontstekingsreactie) ook een grote bijdrage levert aan atherosclerose. Aangezien statines naast een cholesterol verlagende werking ook een ontstekingsremmend effect hebben, zou dit dus deels hun gunstige effect op atherosclerose verklaren.

De ontstekingsreactie tijdens atherosclerose begint wanneer de vaatwand beschadigd raakt. Beschadiging gebeurt voornamelijk op plaatsen in het bloedvat

waar een turbulente bloedstroom is, bijvoorbeeld bij een aftakking van een bloedvat. Door deze beschadiging raakt de vaatwand geactiveerd en wordt deze meer doorlaatbaar voor cholesterol vervoerende componenten, ook wel lipoproteïnes genoemd. De lipoproteïnes worden in de vaatwand gemodificeerd waardoor deze immunogeen worden en dus in staat zijn het immuunsysteem te activeren. Vervolgens worden macrofagen aangetrokken door de geactiveerde vaatwandcellen (endothelcellen) en de gemodificeerde lipoproteïnes. Macrofagen zijn ontstekingscellen die in staat zijn om ongewenste deeltjes zoals de gemodificeerde lipoproteïnes op te nemen, waarna deze geactiveerd raken en allerlei signaaleiwitten produceren (cytokines). De cytokines op hun beurt rekruteren andere immuuncellen en activeren deze cellen, zodat zij hulp kunnen bieden om de ongewenste deeltjes te verwijderen. In de vaatwand nemen de macrofagen de lipoproteïnes op en hierdoor veranderen de macrofagen langzaam in opgezwollen cellen die gevuld zijn met cholesterol, de "schuimcellen". Deze schuimcellen produceren veel ontstekingsstimulerende cytokines.

Een belangrijk celtype dat gerekruteerd wordt is de T-cel. Na activatie, kunnen T-cellen zich ontwikkelen in verschillende subklassen T-cellen. De verschillende typen T-cellen kunnen het immuunsysteem verder activeren of juist remmen. Een belangrijke functie van macrofagen is het "presenteren" van de opgenomen deeltje (antigenen) aan T-cellen. T-cellen die het antigeen herkennen worden geactiveerd en maken vervolgens allerlei cytokines om het ontstekingsproces in goede banen te leiden. In het geval van atherosclerose zijn er te veel ontstekingsstimulerende T-cellen, waardoor er een buitenproportionele ontstekingsreactie plaatsvindt. Dit leidt tot het aantrekken van een nieuwe golf ontstekingscellen. De laesie zal hierdoor groeien en uiteindelijk kunnen "scheuren". Hierdoor komen de verschillende componenten van de laesie in contact met het bloed, waardoor er een bloedstolsel ontstaat. Dit stolsel kan terplekke het bloedvat afsluiten, maar als het stolsel los raakt, kan het ook worden meegevoerd door de bloedstroom en kan het stolsel verder gelegen bloedvaten afsluiten. Door de afsluiting van een bloedvat krijgt het onderliggende weefsel te weinig voeding en zuurstof, wat leidt tot het afsterven en functieverlies van het weefsel/orgaan. Dit leidt tot de klinische symptomen zoals een hartaanval of een beroerte.

In dit proefschrift is onderzocht hoe verschillende ontstekingscellen betrokken zijn bij atherosclerose. Verder is er bestudeerd welke cytokines deze cellen maken en welke functie deze cytokines hebben in relatie tot atherosclerose. In hoofdstuk 1 is gedetailleerd weergegeven wat er tot nu toe bekend is over de ontstekingscellen die zijn betrokken bij atherosclerose. Verder is daar ook ingegaan op verschillende belangrijke cytokines. Om ontstekingscellen en cytokines in atherosclerose te kunnen bestuderen hebben we gebruik gemaakt van proefdieren.

In de studies die zijn beschreven in dit proefschrift wordt gebruik gemaakt van muizen die genetisch zijn veranderd zodat ze atherosclerose ontwikkelen. Als deze muizen worden gevoed met een vetrijk dieet (Western-type dieet), krijgen ze een verhoogde concentratie cholesterol in het bloed, waardoor atherosclerose ontstaat.

“NIEUWE” CELLEN EN CYTOKINES IN ATHEROSCLEROSE

INTERLEUKINE 15

In hoofdstuk 2 is een belangrijk ontstekingstimulerend cytokine bestudeerd, interleukine-15 (IL-15). IL-15 is een cytokine dat voornamelijk gemaakt wordt door macrofagen en vooral effect heeft op T-cellen. Aangezien zowel macrofagen als T-cellen belangrijk zijn in atherosclerose is het interessant om de rol van IL-15 in atherosclerose te bepalen. In dit hoofdstuk demonstreren wij dat het aantal cellen dat IL-15 tot expressie brengt sterk toeneemt door de muizen te voeden met een vetrijk dieet. Dit kan betekenen dat IL-15 is betrokken bij het ontstaan van atherosclerose.

Om de functie van IL-15 te bestuderen gebruikten we een vaccinatie-techniek die gebruik maakt van een levende, maar wel verzwakte, bacterie. In deze bacterie, de *Salmonella typhimurium*, hebben we DNA ingebracht dat codeert voor IL-15. Wanneer we deze bacterie toedienen wordt er een immuunrespons opgewekt die uiteindelijk zorgt voor het doden van cellen die IL-15 hoog tot expressie brengen. We zien in de tegen IL-15 gevaccineerde muizen een sterke afname van atherosclerose. Verder zien we ook dat het aantal cellen dat IL-15 tot expressie brengt wordt verminderd tot hetzelfde niveau voordat atherosclerose werd geïnduceerd. We zien echter wel meer macrofagen in de laesie, maar die brengen waarschijnlijk minder of geen IL-15 tot expressie en daardoor zal de laesie niet toenemen in grootte.

INTERLEUKINE 17 EN DE TH17 CEL

Zoals hierboven vermeld zijn er verschillende soorten T-cellen, waaronder de T-helper 1 (Th1) en T-helper 2 (Th2) cellen. De algemene gedachte is dat tijdens atherosclerose voornamelijk de Th1-cel verantwoordelijk is voor het verergeren van atherosclerose en de Th2-cel juist voor het verminderen van atherosclerose. Een balans tussen deze twee types T-cellen is van cruciaal belang voor een goede uitkomst van de ontsteking. In verschillende auto-immuun ziekten is een verstoorde balans richting Th1 verantwoordelijk voor de verergering van de ziekte. Echter niet alle resultaten kunnen hiermee verklaard worden. Dit leidde tot de

ontdekking van nieuwe T-cellen, de T-helper 17 (Th17) cel en de regulatoire T (Treg)-cel.

De Th17-cel is een T-cel die voornamelijk het ontsteking-stimulerende cytokine IL-17 produceert en zijn rol is geïdentificeerd in verschillende ziekte modellen, maar de rol van deze nieuwe Th17-cel is nog niet beschreven in atherosclerose.

In hoofdstuk 3 bestuderen we dan ook het effect IL-17, het prominent geproduceerde cytokine door Th17-cellen, doormiddel van het blokkeren van de functie van IL-17. Als eerste hebben we bestudeerd of de productie van IL-17 omhoog gaat na het voeden van de muizen met een vetrijk dieet. We hebben geconstateerd dat in de milt (een belangrijk orgaan betrokken bij het immuunsysteem) een verhoogde productie van IL-17 plaatsvindt, wat inhoudt dat IL-17 waarschijnlijk een rol speelt bij atherosclerose. Om dit verder te bevestigen vaccineren we de muizen tegen IL-17 door middel van een DNA vaccin, coderend voor IL-17. Dit resulteerde in een grote vermindering van 90% in atherosclerose in de tegen IL-17 gevaccineerde muizen.

In hoofdstuk 4 bestuderen we het effect van de receptor voor IL-17, door gebruik te maken van een beenmergtransplantatie. We hebben een beenmergtransplantatie uitgevoerd met het beenmerg van muizen waarvan de receptor van IL-17 (IL-17R) is verwijderd. Deze cellen kunnen dus niet meer reageren op IL-17. Op deze manier kunnen we de rol van IL-17 in atherosclerose bestuderen in het muismodel. We zien in muizen die het IL-17R deficiënte beenmerg hebben gekregen een sterke vermindering van atherosclerose. Verder zagen we een afname van IL-6 (dat betrokken is bij een verergering van atherosclerose) en een toename van IL-10 (een interleukine dat atherosclerose vermindert). Een interessante bevinding is de vermindering van antilichamen tegen gemodificeerde lipoproteïnes, welke in sommige gevallen atherosclerose kunnen verergeren en dus ook een verklaring kunnen vormen voor verminderde atherosclerose.

De resultaten uit hoofdstuk 3 en 4 bevestigen een rol voor IL-17 in de ontwikkeling van atherosclerose. Nu we hebben aangetoond dat IL-17 een belangrijke rol speelt in atherosclerose is het waarschijnlijk dat de Th17-cel ook een rol speelt in het ziekteproces.

Onlangs is een nieuw cytokine ontdekt, IL-23, die betrokken is bij het ontstaan van Th17-cellen. IL-23 is een interleukine dat uit twee subunits bestaat, p40 en p19. Het p40 deel is ook een onderdeel van een ander cytokine, het IL-12. IL-12 is een sterk ontstekingstimulerend interleukine en in een eerdere studie is gebleken dat na vaccinatie tegen p40 atherosclerose sterk verminderd wordt. Omdat p40 zowel een deel van IL-23 als IL-12 is, is het achteraf niet mogelijk vast te stellen welk interleukine exact voor de remming van in atherosclerose heeft

gezorgd. Om dit verder uit te zoeken hebben we de functie van IL-23 in atherosclerose bestudeerd door middel van een beenmergtransplantatie met beenmerg waarin het p19 deel van IL-23 is uitgeschakeld. De cellen zonder het p19 gen kunnen geen functioneel IL-23 meer maken en zodoende kan de rol van dit interleukine worden bestudeerd in atherosclerose, zoals is beschreven in hoofdstuk 5.

We vinden echter geen effect van p19 deficiëntie op atherosclerose in het beenmerg transplantatie model. We zien ook geen verschil in de Th17-cellen. Echter recent onderzoek heeft uitgewezen dat IL-23 waarschijnlijk niet betrokken is in de initiatie van de Th17, maar meer betrokken is bij de instandhouding van deze cellen. Mogelijk kan dit een verklaring bieden voor het feit dat we geen verschil in atherosclerose zien. Er dient echter nog meer onderzoek verricht te worden om de rol van IL-23 en p19 te begrijpen.

INTERLEUKINE 27

Een ander recentelijk ontdekt interleukine is IL-27, dat ook uit 2 subunits bestaat, een p28 subunit en een EBI3 deel. Dit interleukine werd in beginsel beschreven als ontstekingsstimulerend en betrokken bij een verergering van auto-immuunziekten. Door de jaren heen is echter meer onderzoek gedaan en is de aan IL-27 toegeschreven ontstekingsstimulerende rol herzien. Zo is er aan het licht gekomen dat IL-27 de potentie heeft om de Th17-cel te remmen en dit zou kunnen resulteren in een verminderd ziektebeeld.

IL-27 is echter nog niet bestudeerd in atherosclerose en gezien de rol van IL-17 en waarschijnlijk ook de Th17 cel in atherosclerose, is IL-27 een interessant interleukine om te bestuderen in de context van atherosclerose. In hoofdstuk 6 wordt een studie beschreven waarin muizen gevaccineerd worden tegen p28. Uit dit onderzoek blijkt dat de 2 delen van IL-27 (p28 en EBI3) sterk tot expressie komen in de atherosclerotische laesie, wat aangeeft dat IL-27 mogelijk betrokken is bij atherosclerose. Vervolgens zijn enkele muizen gevaccineerd met DNA, coderend voor het interleukine p28, en is atherosclerose geïnduceerd.

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat atherosclerose was verergerd in de muizen die gevaccineerd waren tegen p28. Dit betekent dat IL-27 beschermend werkt in atherosclerose. De verergering van atherosclerose zou verklaard kunnen worden door de gevonden toename van Th17-cellen. Daarnaast hadden de gevaccineerde muizen ook minder Treg-cellen. Treg-cellen zijn betrokken bij vermindering van atherosclerose. Het lijkt er dus op dat de balans tussen de Th17-cellen en Treg-cellen is omgeslagen naar Th17-cellen in de gevaccineerde muizen tegen p28, met verergerde atherosclerose tot gevolg.

REGULATOIRE T-CELLEN

Treg-cellen verminderen ontsteking en kunnen daardoor beschermend zijn in auto-immuunziekten, wellicht ook in atherosclerose. Een manier om Treg cellen te stimuleren is door een antigeen oraal toe te dienen. Door dit via het spijsverteringskanaal toe te dienen, ontstaat er in de darmen een immuunreactie die ervoor zorgt dat er tolerantie ontstaat tegen dit antigeen. Bij het ontstaan van tolerantie wordt het antigeen herkend en vindt er activering van Treg-cellen plaats. Hierdoor wordt vervolgens de immuunrespons afgeremd. Dit is bijvoorbeeld van belang bij tolerantie opwekking tegen voedingsmiddelen. Deze methode is al eerder uitgetoetst tegen gemodificeerde lipoproteïnes, wat resulteerde in meer Treg-cellen en minder atherosclerose.

In hoofdstuk 7 zijn door middel van orale toediening van HSP60 Treg cellen geïnduceerd. HSP60 is een antigeen dat is geïdentificeerd in atherosclerose. In atherosclerose is er een immuunreactie tegen HSP60 die niet wenselijk is. Door Treg-cellen te induceren kunnen we deze immuunreactie remmen om atherosclerose te verminderen. We zien in deze studie dat atherosclerose inderdaad afneemt en dat dit komt door meer Treg cellen.

Vervolgens willen wij ook het effect bestuderen van de blokkering van Treg cellen om de rol van Treg cellen in atherosclerose verder te bevestigen. Dit is beschreven in hoofdstuk 8. In dit hoofdstuk wordt een vaccinatiemethode beschreven waarbij dendritische cellen de "opdracht" hebben gekregen om een immuunrespons op te wekken tegen een antigeen. Dendritische cellen zijn speciale cellen van het immuunsysteem die zeer goed in staat zijn een bepaald antigeen te presenteren aan andere immuuncellen om zo een immuunrespons op te wekken. In deze studie hebben we de dendritische cellen speciaal gericht tegen cellen die Foxp3 tot expressie brengen. Foxp3 is een eiwit dat voornamelijk gemaakt wordt door Treg cellen. Door cellen die Foxp3 tot expressie brengen te vernietigen kan de bijdrage van Treg cellen in atherosclerose bestudeerd worden. We zien in deze studie dat de vaccinatie leidt tot minder Treg cellen in de muis. Dit heeft tot gevolg dat door de Foxp3 vaccinatie, de atherosclerotische laesie toeneemt in grootte. Hetzelfde is ook waargenomen in muizen met een vergevorderde atherosclerotische laesie. Dit geeft aan dat Treg cellen zowel bij beginnende als gevorderde atherosclerose betrokken zijn. Verder zien we dat de laesie van gevaccineerde muizen veel meer cellen bevat. Mogelijk duidt dit op meer ontsteking in de laesie, waardoor deze in grootte toeneemt. Welke cellen dit precies zijn moet nog worden uitgezocht in een toekomstig onderzoek. Kortom, in de hoofdstukken 7 en 8 hebben we aangetoond dat Treg cellen een belangrijk celtype is in de regulatie van atherosclerose en mogelijk kan dit leiden tot een therapeutische toepassing.

CONCLUSIE

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is er op gericht meer inzicht te verkrijgen in de rol van ontstekingscomponenten in atherosclerose. De nieuwe bevindingen kunnen leiden tot nieuwe inzichten en idealiter resulteren in een klinische toepassing zodat patiënten met atherosclerose in de toekomst beter behandeld kunnen worden. In dit proefschrift wordt veel gebruik gemaakt van vaccinatietechnieken om de functie van bepaalde cellen en interleukines te bestuderen. In hoofdstuk 9 staat beschreven hoe deze inzichten, die zijn verkregen door onder andere een bijdrage uit dit proefschrift, kunnen leiden tot therapeutisch haalbare toepassingen.

Vooralsnog is de beste remedie om atherosclerose te verminderen het voorkomen van blootstelling aan risico factoren. Helaas is dit niet altijd mogelijk, door bijvoorbeeld erfelijke factoren, en zal de zoektocht naar een behandelmethode tegen atherosclerose voort blijven gaan. Een veel belovende toepassing kan het induceren van tolerantie tegen atherosclerose gerelateerde eiwitten kunnen zijn. Deze non-invasieve behandeling die tolerantie opwekt tegen ziekte specifieke antigenen kan een uitkomst bieden in veel auto-immuunziekten en dus ook in atherosclerose. Echter, er dient nog veel onderzoek te worden verricht naar de haalbaarheid en effectiviteit in patiënten.

