



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Dyslipidemia, metabolism and autophagy : antigen-independent modulation of T cells in atherosclerosis**

Amersfoort, J.

### **Citation**

Amersfoort, J. (2019, January 23). *Dyslipidemia, metabolism and autophagy : antigen-independent modulation of T cells in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68336>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/68336>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/68336> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Amersfoort, J.

**Title:** Dyslipidemia, metabolism and autophagy : antigen-independent modulation of T cells in atherosclerosis

**Issue Date:** 2019-01-23

# Nederlandse samenvatting



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Jaarlijks zorgen hart- en vaatziekten wereldwijd voor meer dan 15 miljoen doden volgens de World Health Organization. In Europa is bij 45% van de overledenen hart- en vaatziekten de doodsoorzaak, en in de Europese Unie is het de doodsoorzaak bij 37% van alle sterfgevallen. Volgens cijfers gepubliceerd door de Nederlandse Hartstichting is in Nederland tussen 1980 en 2016 het sterftecijfer voor hart- en vaatziekten bij mannen gedaald met 69% en bij vrouwen met 59%. Desalniettemin heeft Nederland zo'n 1,4 miljoen hart- en vaatpatiënten en sterven er dagelijks 106 mensen aan een hart- of vaatziekte. Op jaarbasis sterven er alleen al aan hartinfarcten en beroertes 15.000 mannen en vrouwen in Nederland. De belangrijkste onderliggende oorzaak van hart- en vaatziekten is slagaderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd. Atherosclerose is een ziekte waarbij de vaatwand in slagaders verdikt is als gevolg van een ontsteking die het lumen van een slagader kan verkleinen en zo de bloedtoevoer naar achterliggend weefsel kan verstoren. Atherosclerose wordt veroorzaakt door een immuunrespons geassocieerd met hoge niveaus van lipiden, die zich ophopen in de vaatwand. Risicofactoren voor atherosclerose zijn dyslipidemie, obesitas, diabetes en een sedentaire levensstijl. Daarnaast is er een grote genetische risicofactor in de vorm van de ziekte familiale hypercholesterolemie (FH), die zonder behandeling dyslipidemie en vervolgens premature ontwikkeling van hart- en vaatziekten veroorzaakt. De ophoping van lipiden en de daaropvolgende immuunrespons vindt voornamelijk plaats op specifieke plekken in het bloedvatensysteem, waar afwijkende stroming van bloed zorgt voor verstoorde functie van cellen die de vaatwand bekleden waardoor lipiden ophopen. De kransslagaders van het hart zijn bij uitstek een plaats in het bloedvatensysteem waar deze afwijkende stroming aanwezig is en waar een verhoogde kans bestaat om atherosclerose te ontwikkelen.

In de eerste fase van atherosclerose vormen zich zogenaemde fatty streaks in de vaatwand. Deze fatty streaks bestaan voornamelijk uit accumulerende lipiden en ontstekingscellen die vanuit het bloed de vaatwand inkruipen en daar de vetdeeltjes opnemen in een poging ze te neutraliseren. Deze fatty streaks zijn op zich onschadelijk, maar wanneer deze zich verder ontwikkelen en toenemen in grootte kan atherosclerose tot vernauwing (stenose) van slagaders zorgen. Wanneer de stenose van een dusdanige ernst is dat er sprake is van een significante vermindering in bloedtoevoer naar het achterliggende weefsel spreekt men van ischemie, ofwel een verstoorde balans tussen de vraag en toevoer van zuurstof en voedingsstoffen. Ischemie is symptomatisch als het zorgt voor verminderde hartfunctie, electrocardiogram afwijkingen en druk op de borst (angina pectoris). Wanneer symptomen ontstaan onder stress en verdwijnen bij rust spreekt men van stabiele angina. Een atherosclerotische laesie kan zich ook dusdanig ver ontwikkelen dat deze onstabiel wordt en scheurt, waardoor de inhoud hiervan aan

de bloedbaan wordt blootgesteld. Dit induceert de vorming van een trombus (stolsel) welke in de kransslagader de bloedtoevoer naar het achterliggend hartweefsel blokkeert en in de halsslagader (carotis) de bloedtoevoer naar een deel van het brein. Bij langdurige ischemie tijdens een hartaanval sterft het hartweefsel, wat voor (blijvend) verminderde hartfunctie zorgt en mogelijk de dood tot gevolg heeft.

Tijdens een acute klinische situatie zoals een hartaanval is directe interventie nodig in de vorm van ballon angioplastiek (dotteren), mogelijk gecombineerd met het plaatsen van een stent om het bloedvat open te houden na de ingreep. Atherosclerose in de kransslagaders kan in de niet acute fase behandeld worden met een bypass operatie (ook wel omleidingsoperatie genoemd) waarbij een ader uit bijvoorbeeld het been van de patiënt wordt verwijderd en vervolgens gebruikt wordt om de bloedtoevoer naar ischemisch weefsel te herstellen. Een andere operatie is de endarterectomie waarbij atherosclerotische laesies chirurgisch worden verwijderd na het open leggen van het verstopte bloedvat. Endarterectomiën worden in niet acute situaties voornamelijk uitgevoerd in de carotiden (ofwel halsslagaders) en *arteria femoralis* (beenslagaders), die de benen voorzien van bloed. Bij een beroerte als gevolg van occlusie van een carotis worden endarterectomiën ook in de acute fase uitgevoerd. Grote nadelen van bovengenoemde chirurgische interventies als behandeling voor atherosclerose is dat deze invasief zijn en er een relatief grote kans bestaat op restenose. Gezien de rol van lipiden bij de vorming van atherosclerose worden mensen met een geschiedenis van of verhoogd risico op hart- en vaatziekten, zoals hartpatiënten of FH-patiënten, vaak farmacologisch behandeld met statines. Statines remmen de synthese van cholesterol in de lever en verminderen derhalve de hoeveelheid schadelijke vetten in het bloed, de zogenoemde LDL-deeltjes en verhogen de LDL receptor expressie. Statines zijn succesvol gebleken in de preventie van hart- en vaatziekten gezien ze de kans hierop met 25-30% verminderen. Echter, statines hebben weinig effect op reeds ontwikkelde atherosclerotische laesies en slaan niet aan bij alle patiënten. Sinds kort wordt nog een medicijn om lipiden in het bloed te verlagen in de kliniek gebruikt in de vorm van antilichamen die PCSK9 remmen. PCSK9 zorgt normaal voor lysosomale afbraak van de LDL receptor dus remming van PCSK9 zorgt voor een verhoogde opname van cholesterolrijke LDL deeltjes uit het bloed door de lever. Naast het verlagen van circulerende lipiden is een ander therapeutisch aangrijpingspunt het immuunsysteem omdat modulatie hiervan de ontwikkeling en stabiliteit van atherosclerotische laesies zou kunnen beïnvloeden. Klinisch onderzoek heeft al aangetoond dat het remmen van de ontstekingsfactor interleukine-1 $\beta$  geassocieerd is met een verlaging van 15% in het aantal doden als gevolg van een hartaanval, beroerte en hart- en vaatziekten gecombineerd. Dit benadrukt dat onderzoek naar de rol van ontstekingscellen (immuncellen) succesvol naar de kliniek vertaald kan worden als behandeling van atherosclerose en hart- en vaatziekten.

LDL-deeltjes die de bloedbaan verlaten en in het onderliggende weefsel in de vaatwand accumuleren kunnen cellen die de vaatwand bekleden, de zogenaamde endotheelcellen, activeren, wat leidt tot de rekrutering van immuuncellen om deze vetten op te ruimen. Een versterkende factor in deze initiële ontstekingsreactie is de lokale modificatie van LDL-deeltjes, die ervoor zorgt dat deze als lichaamsvreemd worden beschouwd door het immuunsysteem. Een van de eerste immuuncellen die vanuit het beenmerg en het bloed gerekruteerd worden naar de vaatwand zijn de monocytten. Onder invloed van lokale omgevingsfactoren rijpen monocytten verder in de vaatwand tot macrofagen. Macrofagen zijn cellen met grote 'fagocytotische capaciteit' hetgeen betekent dat ze gespecialiseerd zijn in het opnemen van extracellulair materiaal dat als lichaamsvreemd wordt herkend. Echter, de grote aanvoer van vetten en het onvermogen van de macrofagen om de vetten adequaat te verwerken en af te voeren zorgt ervoor dat de cellen zich verder ontwikkelen tot een specifiek type macrofaag, namelijk de schuimcel (foam cell). De hierboven genoemde fatty streaks bestaan voornamelijk uit schuimcellen en geaccumuleerde vetten. De macrofagen, endotheelcellen en schuimcellen scheiden ontstekingsfactoren uit die andere immuuncellen, zoals neutrofielen en T cellen, rekruteren om bij te dragen aan het neutraliseren van (gemodificeerde) LDL-deeltjes.

Het belangrijkste celtype dat in dit proefschrift aan bod komt is de T cel. T cellen zijn gespecialiseerde immuuncellen die voornamelijk geactiveerd worden door specifieke stukjes eiwit, zogenaamde peptiden. Mensen en muizen hebben een T cel repertoire waarbij elke T cel kloont een specifiek peptide herkent via zijn T cel receptor. Deze peptiden zijn vaak afkomstig van ziekteverwekkers en worden door andere immuuncellen, zoals macrofagen en dendritische cellen, verwerkt en aan T cellen gepresenteerd via zogenaamde MHC-moleculen. Het eiwit waarvan de peptide afkomstig is noemt men in de immunologie het antigeen. Antigenen die vanuit de omgeving zijn opgenomen worden gepresenteerd aan CD4<sup>+</sup> T cellen die aan de humorale immuniteit bijdragen, door bijvoorbeeld bij te dragen aan de productie van antilichamen door B cellen. Intracellulaire antigenen, zoals bij een virale infectie, worden gepresenteerd aan CD8<sup>+</sup> cytotoxische T cellen. Cytotoxische T cellen dragen bij aan de immunresponse door middel van het uitscheiden van ontstekingseiwitten, of het doden van een cel die het peptide op zijn membraan presenteert waar de T cel tegen gericht is. Afhankelijk van de ziekteverwekker wordt een T cel respons geïnitieerd die voornamelijk bestaat uit CD4<sup>+</sup> of CD8<sup>+</sup> T cellen. Na activatie door een peptide gaan T cellen in de effector fase delen en verder ontwikkelen in gespecialiseerde subtypes die de ziekteverwekker efficiënt kunnen bestrijden. Uiteindelijk ontwikkelt een klein percentage zich verder in memory T cellen die, bij een volgende blootstelling aan hetzelfde pathogeen, deze efficiënter kunnen bestrijden.

In het geval van atherosclerose zijn de peptiden waar T cellen uit atherosclerotische laesies op reageren vaak afkomstig van het ApoB100 eiwit, het belangrijkste eiwit in

LDL-deeltjes. Tijdens de vorming van atherosclerose worden cellen die LDL deeltjes verwerken tot peptide fragmenten naar de ontstekingsplaats gerekruteerd. Hierna migreren ze naar lymfeknopen die de vaatwand draineert om de peptide te presenteren aan een naïeve T cel, een T cel die nog geen antigeen gezien heeft, die door het lichaam circuleert, welke hierop wordt geactiveerd, gaat delen en naar de vaatwand migreert om aan de ontstekingsreactie deel te nemen. Op deze manier zorgt de verhoogde aanwezigheid van vetten in de bloedbaan voor meer antigeen in de vaatwand en een versterkte T cel gemedieerde ontstekingsreactie. In atherosclerose is de meerderheid van de T cellen  $CD4^+$  en in deze  $CD4^+$  T cel populatie is de T helper 1 (Th1) cel in de grootste hoeveelheden aanwezig. Th1 cellen zijn pro-inflammatoir, of ontstekingsversterkend, voornamelijk door het uitscheiden van een cytokine genaamd interferon-gamma. Een ander cruciaal type  $CD4^+$  T cellen in atherosclerose is de regulatoire T (Treg) cel die juist gespecialiseerd is in het onderdrukken van andere immuuncellen, voornamelijk door het uitscheiden van de cytokine interleukine-10. Omdat Treg cellen relatief weinig aanwezig zijn in atherosclerotische laesies is het bevorderen van de Treg cel populatie een veelbelovende invalshoek voor therapie gericht tegen atherosclerose en hart- en vaatziekten.

Het systemische metabolisme van vetten is een belangrijke determinant in de kracht van de T cel-gemedieerde immuunrespons in atherosclerotische laesies aangezien het de aanwezigheid van antigeen in de vaatwand kan beïnvloeden. Maar cellulair metabolisme, ofwel de stofwisseling die plaatsvindt binnenin cellen, is ook van grote invloed op T cellen. Cellulair metabolisme van glucose (suiker) en vetten in T cellen is cruciaal voor hun inflammatoire potentie. Metabolisme is grofweg te verdelen in katabolisme en anabolisme wat respectievelijk afbraak en opbouw van macromoleculen inhoudt. Bij katabolisme wordt bijvoorbeeld een vetzuur of glucose molecuul afgebroken tot metabole intermediären die in de mitochondriën worden gebruikt om energie in de vorm van ATP op te wekken. Bij anabolisme worden metabole intermediären gebruikt voor de vorming van biomoleculen zoals cholesterol. Tijdens de celdeling is metabolisme essentieel voor T cellen omdat er binnen korte tijd een hoop dochtercellen van een T cel kloon gevormd moeten worden. Dit betekent dat er veel celmembranen, organellen en nucleotiden gevormd moeten worden bestaande uit vetten, eiwitten en andere koolstofverbindingen. De activiteit van glycolyse, het biochemische proces van de afbraak van glucose, wordt verhoogd en dit zorgt voor de metabole intermediären die nodig zijn als voorloper voor de synthese van de voorgenoemde biomoleculen. Ook de synthese van cholesterol, een belangrijk onderdeel van celmembranen, wordt geïnduceerd bij de activatie van T cellen.

Waar metabolisme een verzameling biochemische processen omvat is er nog een intracellulair proces dat cruciaal is voor T cellen tijdens een immuunrespons, namelijk macro-autofagie. Macro-autofagie (hierna autofagie genoemd) is een intracellulair



proces waarbij eiwitten en organellen door middel van isolatiemembranen naar lysosomen worden gebracht, waarin ze worden afgebroken door lysosomale enzymen en zo gerecycled kunnen worden. Autofagie wordt in brede zin geïnduceerd door stress, bijvoorbeeld in een omgeving met weinig nutriënten. In die context vormt autofagie een intrinsiek mechanisme waarmee cellen met nutriënt-stress kunnen omgaan om zo toch de nodige macromoleculen tot de beschikking te hebben. Echter, autofagie kan ook als beschermend mechanisme werken om juist met een overmaat aan nutriënten om te kunnen gaan. In schuimcellen wordt autofagie van lipide druppels, organellen gespecialiseerd in de intracellulaire opslag van vetten, geïnduceerd om zo de lipidenbelading en lipotoxische stress te verminderen. Daarnaast kunnen middels autofagie slecht functionerende mitochondriën afgebroken worden en gerecycled worden voor bijvoorbeeld de vorming van nieuwe en goed functionerende mitochondriën. Autofagie en metabolisme zijn dus nauw met elkaar verbonden. Bij geactiveerde T cellen die gaan delen is autofagie verhoogd maar worden mitochondriën juist uitgesloten voor lysosomale degradatie omdat mitochondriën nodig zijn voor de energiehuishouding tijdens T cel deling. Grof gezegd heeft het remmen van autofagie dan ook een inhiberend effect op inflammatoire capaciteit van T cellen. Samengevat verhoogt dyslipidemie de kans op atherosclerose en hart- en vaatziekten onder andere door de aanwezigheid van antigeen voor T cellen te verhogen en is daarnaast bekend dat intracellulaire metabole processen, zoals autofagie en glycolyse, cruciaal zijn voor de inflammatoire capaciteit van T cellen. Verrassend genoeg is er weinig onderzoek gedaan naar hoe dyslipidemie intracellulaire metabole processen in T cellen moduleert en hierbij effect heeft op de inflammatoire capaciteit van T cellen en de vorming van atherosclerose.

In dit proefschrift worden een aantal mechanismes beschreven waarin dyslipidemie metabolisme en autofagie in verschillende subsets van T cellen beïnvloedt en zo bij zou kunnen dragen aan de T cel-gemedieerde immuunrespons in de vaatwand. In **hoofdstuk 2** zijn de belangrijkste metabole processen beschreven en door welke eiwitten deze gemoduleerd worden. Daarnaast wordt in hoofdstuk 2 beschreven op welke manier een omgeving die metabool gezien afwijkend is T cellen kan beïnvloeden en welke reeds bestaande medicijnen gebruikt kunnen worden om T cel metabolisme te beïnvloeden en zo ontsteking te remmen. In **hoofdstuk 3 en 4** wordt beschreven hoe dyslipidemie het metabolisme van Treg cellen en naïeve T cellen beïnvloedt en hoe dit bijdraagt aan hun inflammatoire capaciteit wanneer ze geactiveerd worden. In een deel van hoofdstuk 4 wordt beschreven hoe dyslipidemie autofagie in T cellen beïnvloedt en in **hoofdstuk 5** wordt beschreven wat het effect is van deficiëntie van een cruciaal autofagie eiwit, genaamd Atg7, op de inflammatoire capaciteit van T cellen in de context van dyslipidemie en atherosclerose. In **hoofdstuk 6** wordt beschreven wat het effect is van deficiëntie van lipocalin-2 (Lcn2), een eiwit wat geassocieerd is met hart- en vaatziekten, op de vorming van atherosclerose.

In **hoofdstuk 2** hebben we samengevat dat pro-inflammatoire T helper cellen voornamelijk glycolyse nodig hebben voor hun ontwikkeling, celdeling en activiteit terwijl Treg cellen voornamelijk afhankelijk zijn van vetzuur oxidatie voor hun celdeling. Verder is er in hoofdstuk 2 gediscussieerd over de manieren waarop een metabool afwijkende omgeving het metabolisme, en hiermee de inflammatoire capaciteit, van T cellen kan beïnvloeden. Wij hebben 5 manieren voorgesteld waarop dit kan plaatsvinden, te weten: 1) omdat er meer substraat aanwezig is in de omgeving; 2) doordat er meer intracellulaire reserves aangelegd zijn; 3) doordat het cellulair metabolisme voornamelijk via een specifiek proces plaatsvindt wat de activiteit van bifunctionele enzymen kan beïnvloeden; 4) doordat het de differentiatie van naïeve T cellen in subsets van effector T cellen kan sturen, en 5) doordat cellen in de omgeving minder nutriënten krijgen door de veranderde metabole activiteit van T cellen. Belangrijke eiwitten in de regulering van metabolisme in T cellen zijn mammalian target of rapamycin (mTOR) en AMP-activated kinase (AMPK). mTOR is een cruciaal metabool eiwit wat bij activatie van T cellen verhoogde activiteit heeft en processen aanstuurt die glycolyse stimuleren en de biosynthese bevorderen. Remming van mTOR door middel van bijvoorbeeld rapamycine om T cel gemedieerde ontsteking te remmen in patiënten waarbij een metabole ziekte hieraan bijdraagt is een therapeutische invalshoek die in de mens nog onvoldoende belicht is. Een ander medicijn dat reeds in de kliniek wordt gebruikt is metformine. Metformine stimuleert de activiteit van AMPK, wat inhibitie van mTOR als gevolg kan hebben en op deze manier vergelijkbare therapeutische effecten zou kunnen hebben als rapamycine of andere mTOR remmers. Metformine, een antidiabeticum, zou derhalve gebruikt kunnen worden ter immunomodulatie in patiënten van wie de T cellen zich op een pathologische manier hebben aangepast aan een systemische metabole ziekte.

In **hoofdstuk 3** zijn de effecten van dyslipidemie op het metabolisme en de migratie capaciteit van Treg cellen beschreven. Regulatorische T cellen zijn minder functioneel in atherosclerose en zijn relatief weinig aanwezig in atherosclerotische laesies. In literatuur is gesuggereerd dat dit laatste kan komen omdat de Treg cellen minder naar de vaatwand migreren, daar aangekomen doodgaan of daar aangekomen differentiëren in een ander celtype onder invloed van lokale (ontstekings)factoren. In hoofdstuk 3 hebben we beschreven dat dyslipidemie zorgt voor vetstapeling in regulatorische T cellen en dat dit de activiteit van het mTOR complex 1 remt waardoor de Treg cellen minder glucose-afhankelijk metabolisme hebben. Daarnaast stimuleert dyslipidemie de activiteit van de transcriptiefactor peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR $\delta$ ), wat ervoor zorgt dat Treg cellen een meer vetzuur-afhankelijk metabolisme krijgen. Omdat het genereren van energie essentieel is voor het vervormen van het cytoskelet, en daardoor de migratoire capaciteit van cellen, hebben we ook beschreven wat activatie van PPAR $\delta$  voor invloed heeft op migratie van Treg cellen. We hebben aangetoond dat activatie van PPAR $\delta$  met een synthetische ligand de migratie van Treg cellen verhoogt wat afhankelijk

is van de verhoogde vetzuuroxidatie die PPAR $\delta$  activatie als gevolg heeft. Daarnaast blijkt dat Treg cellen niet minder maar juist meer naar ontstekingshaarden, waaronder atherosclerotische laesies, migreren na langdurige blootstelling aan dyslipidemie. Als laatste hebben we aangetoond dat Treg cellen die in atherosclerotische laesies van muizen met dyslipidemie aanwezig zijn meer vetten bevatten dan Treg cellen van muizen met normolipidemie. Deze resultaten hebben aangetoond dat het metabolisme van Treg cellen wordt beïnvloed door het dieet van muizen en dat dit functionele gevolgen kan hebben voor hun migratie capaciteit.

In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of en hoe het blootstellen van naïeve CD4<sup>+</sup> T (Tn) cellen aan een dyslipidemische omgeving invloed heeft op hun fenotype na activatie. Dit is interessant omdat we op deze manier het 'priming' effect van extracellulaire vetten op Tn cellen bekijken, die door de vergroting van intracellulaire vetophoping een andere inflammatoire capaciteit hebben na activatie dan een 'normale' Tn cel. In hoofdstuk 4 hebben we ook gekeken naar de modulatie van autofagie van lipide druppels (zogenoemde lipofagie) door dyslipidemie en wat voor effect de remming van lysosomen heeft op de inflammatoire capaciteit van Tn cellen. Tn cellen stapelen vetten als ze geïncubeerd worden met geïsoleerde lipoproteïnen of serum wat uit dyslipidemische muizen gehaald is. Dit stapelen van vetten gaat daarnaast gepaard met een reactie van de transcriptiefactor liver-X-receptor (LXR) die na activatie de expressie van genen vergroot die de afvoer van cholesterol en andere vetten tot gevolg heeft. Het primen van Tn cellen met geïsoleerde lipoproteïnen verhoogde de proliferatie maar had geen duidelijke effecten op de proliferatieve capaciteit van de cellen of op de differentiatie van Tn cellen in specifieke subtypen. Interessant genoeg had de activatie van LXR met T0901317 voordat Tn cellen gestimuleerd werden wel remmende effecten op de proliferatie en stimuleerde het de differentiatie in Treg cellen. Dyslipidemie moduleerde autofagie niet in T cellen, wat suggereerde dat autofagie (of lipofagie) geen coping mechanisme is voor T cellen tijdens lipide overbelading. Hoewel autofagie dus niet gemoduleerd werd door dyslipidemie had de remming van lysosomen in Tn cellen wel een effect op hun effector T cel phenotype. Het remmen van lysosomen tijdens priming, om de endolysosomale opname en autofagie van lipiden te inhiberen, zorgde voor verlaagde proliferatie en daarnaast verlaagde differentiatie van Th1 cellen, specifiek onder dyslipidemische omstandigheden. Ook als we muizen met dyslipidemie behandelden met de lysosoom remmer chloroquine zagen we een hoger percentage Treg cellen. Interessant genoeg zorgde chloroquine in de muis juist voor verhoogde proliferatie wat waarschijnlijk door T cel aspecifieke effecten van chloroquine kwam. De resultaten in hoofdstuk 4 suggereerden dat het sturen van lipide metabolisme in Tn cellen specifiek onder dyslipidemische omstandigheden effect heeft op hun fenotype in de effector fase.

In **hoofdstuk 5** is beschreven wat het gebrek van T cel autofagie na deletie van het eiwit Atg7 doet met de ontwikkeling van atherosclerose. Dit hebben we onderzocht met behulp van muizen met T cel specifieke deficiëntie van Atg7 (de Lck-Cre Atg7<sup>fl/fl</sup> muis) die we vergeleken hebben met muizen met Atg7 sufficiënte T cellen (de Atg7<sup>fl/fl</sup> muis). Aangezien deze muizen normaal geen atherosclerose ontwikkelen hebben we dit moeten induceren met behulp van een virus dat het eiwit PCSK9 tot overexpressie brengt, hetgeen, samen met een vetrijk dieet, zorgt voor een vervette lever en de vorming van atherosclerose. De ontwikkeling van een vervette lever was sterk verminderd in Lck-Cre Atg7<sup>fl/fl</sup> muizen. Na verder onderzoek naar de T cellen in de lever bleek dat er procentueel een stuk minder T cellen aanwezig waren bij Atg7-deficiëntie maar dat relatief meer T cellen ontstekingsfactoren uitscheidde. Het grootste verschil zat echter in de natural killer (NK) T cel populatie die na Atg7 deletie vrijwel afwezig was in de lever, hetgeen overeenkomt met literatuur. De verminderde inflammatoire capaciteit van de totale T cel populatie in de lever is wellicht mede debet aan de verminderde ontwikkeling van vervetting. Naast verminderde leververvetting was de totale cholesterol concentratie in het serum sterk verminderd in muizen met T cel-specifieke deletie van Atg7. De combinatie van verminderd circulerend cholesterol en verminderde inflammatoire capaciteit van de T cel populatie hebben bijgedragen aan de sterke vermindering in atherosclerose in Lck-Cre Atg7<sup>fl/fl</sup> muizen ten opzichte van Atg7<sup>fl/fl</sup> muizen. De bevindingen uit hoofdstuk 5 suggereren dat de T cel specifieke remming van autofagie de vorming van atherosclerose kan remmen. Daarnaast zou systemische behandeling met een autofagie remmer vanuit de invalshoek van de T cellen ontstekingsremmende effecten kunnen hebben op atherosclerose en daarom wellicht als medicijn tegen hart- en vaatziekten gebruikt kunnen worden. Remmers van autofagie, zoals chloroquine, worden reeds gebruikt ter behandeling van auto-immuunziekten zoals reuma. Het onderzoek in hoofdstuk 5 onderschrijft dat remming van autofagie middels therapeutische interventie het immuunsysteem kan onderdrukken en zo wellicht bij kan dragen aan de preventie van hart- en vaatziekten.

In **hoofdstuk 6** hebben we het effect van Lcn2 deficiëntie onderzocht op de ontwikkeling van atherosclerose en systemische metabole parameters die het metabolisme van T cellen kunnen beïnvloeden. Lcn2 is betrokken bij de ontwikkeling van obesitas, wat samenhangt met de circulerende levels van het eiwit leptine. Leptine beïnvloedt verschillende metabole processen in T cellen, te weten, glucosemetabolisme en autofagie. Daarnaast heeft het effect op de activiteit van mTOR. Lcn2 draagt ook bij aan de ontwikkeling van insuline resistentie en lever vervetting, wat suggereert dat deficiëntie van Lcn2 indirect effect kan hebben op T cel metabolisme. In hoofdstuk 6 hebben we echter aangetoond dat de afwezigheid van Lcn2 in ons atherosclerose model geen effect heeft op gewichtstoename, gevaste glucose waarden of circulerende cholesterol- of triglyceride niveaus. Literatuur heeft beschreven dat Lcn2 directe effecten heeft op

andere ontstekingscellen. Zo kan Lcn2 de differentiatie van verschillende macrofaagfenotypes moduleren en is het betrokken bij neutrofiel migratie en functie. De focus van hoofdstuk 6 lag dan ook niet op de effecten van Lcn2 deficiëntie op het metabolisme van T cellen maar op de ontwikkeling van atherosclerose. Muizen zonder Lcn2 ontwikkelden grotere atherosclerotische laesies na 6 weken vetrijk dieet wat suggereerde dat Lcn2 in vroege fase van atherosclerose ontwikkeling van laesies remt. Omdat we een verhoogde activatie van monocytten observeerden postuleren wij dat Lcn2 deficiëntie in de vroege fase van atherosclerose de laesie ontwikkeling stimuleert door monocyt migratie naar de vaatwand te bevorderen. In latere fases van atherosclerose ontwikkeling was Lcn2 deficiëntie geassocieerd met een kleinere necrotische kern van de plaque en met een verminderde activiteit van eiwitten die de extracellulaire matrix afbreken in de vaatwand. Deze twee observaties suggereerden dat Lcn2 in de latere fases van atherosclerose ontwikkeling een negatief effect heeft op stabiliteit van de laesie. Dit komt overeen met klinische observaties waar hoge niveaus van Lcn2 in het bloed en de laesie geassocieerd zijn met symptomatische atherosclerose. Dus, Lcn2 heeft in proefdiermodellen voor atherosclerose verschillende effecten in verschillende fases van de ontwikkeling van atherosclerotische laesies, wat wellicht bij kan dragen aan het gebruik van Lcn2 als biomarker voor vroege fases van atherosclerose ontwikkeling. Aangezien Lcn2 een essentieel bacteriostatisch eiwit is tijdens de acute fase van bacteriële infectie is de ontwikkeling van therapieën die Lcn2 remmen ter preventie van hart- en vaatziekten wellicht minder wenselijk.

Het moduleren van het immuunsysteem voor therapeutische doeleinden in hart- en vaatziekten heeft de afgelopen tientallen jaren steeds meer aandacht gekregen als aanvulling op bestaande behandelingen voor atherosclerose. In dit proefschrift is met een nieuwe invalshoek gekeken naar een bekende risicofactor voor atherosclerose, namelijk dyslipidemie. We hebben beschreven wat een aantal antigen-onafhankelijke effecten van dyslipidemie zijn op metabole processen in T cellen en de functionele effecten hiervan. Aangezien metabolisme in T cellen een cruciale factor is in hun inflammatoire capaciteit en het metabole fenotype mede bepaald wordt door de metabole omgeving, is het een logisch doelwit voor immunosuppressieve therapie. Een complicerende factor bij het moduleren van T cel metabolisme als therapie voor atherosclerose is dat het lastig is om intracellulaire processen specifiek in T cellen te moduleren. Meer onderzoek is nodig om methoden te ontwikkelen om dit te bewerkstelligen. Wanneer dit eenmaal mogelijk is, zal de volgende stap naar therapie wellicht minder ingewikkeld zijn omdat reeds in de kliniek gebruikte medicijnen, zoals rapamycine, gebruikt kunnen worden met een minimale kans op bijwerkingen. Een groot voordeel van het moduleren van T cel metabolisme als therapie voor atherosclerose, ten opzichte van bijvoorbeeld vaccinatie, is dat het niet afhankelijk is van een antigeen. Dit is een voordeel omdat voor een groot aantal welvaartsziekten met een T cel component hét pathogene anti-

geen nog niet bekend is. Dit komt deels omdat er in mensen een grote heterogeniteit bestaat in het type humaan leukocytantigeen molecuul, wat bepaalt welke antigenen gepresenteerd worden aan T cellen. Het fine-tunen van metabolisme in T cellen voor therapeutische doeleinden overkomt dit probleem maar verder basaal en translationeel onderzoek is nodig om vast te stellen of deze benadering geschikt is voor de behandeling van atherosclerose en hart- en vaatziekten.

Dit onderzoek heeft een aantal antigeen-onafhankelijke pathofysiologische mechanismen beschreven waarmee dyslipidemie de T cel-gemedieerde immuunrespons kan moduleren. Daarnaast onderbouwt het onderzoek in dit proefschrift dat het moduleren van cellulair metabolisme en autofagie in T cellen geschikt is om ontsteking te verminderen, atherosclerose te remmen en zo hart- en vaatziekten te voorkomen. Verder onderzoek is nodig om uit te zoeken wat de effecten van dyslipidemie zijn op andere typen T cellen op verschillende locaties in het lichaam en gedurende verschillende fasen van de ontwikkeling van atherosclerose. Uiteindelijk zullen de bevindingen uit dit proefschrift vertaald moeten worden naar de humane situatie en zo hopelijk nieuwe therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van atherosclerose opleveren.