



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The potential use of dendritic cells in mouse models of atherosclerosis

Habets, K.L.L.

Citation

Habets, K. L. L. (2009, December 8). *The potential use of dendritic cells in mouse models of atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14484>

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/1887/14484>

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

Nederlandse samenleving

Nederlandse samenvatting

Pijn op de borst (*angina pectoris*), beroerte, aneurysma, trombose, etalagebenen, longembolie, aderverkalking, enz. al deze ziektes vallen onder de noemer hart- en vaatziekten en zijn vaak het gevolg van het dichtslibben van (middel) grote slagaderen, ook wel aderverkalking of atherosclerose genoemd. Door de vernauwing van het vat (plaque) stroomt er steeds minder zuurstofrijk bloed richting het orgaan. Wanneer de plaque echter scheurt ontstaat er een bloedstolsel (*trombose*) die de bloedtoevoer helemaal kan afsluiten en daardoor een infarct kan veroorzaken. De meest belangrijkste risicofactoren voor hart- en vaatziekten zijn verhoogde cholesterol waarden, hoge bloeddruk, roken, zwaarlijvigheid, diabetes en te weinig lichaamsbeweging. Het is daarom ook niet verwonderlijk dat hart- en vaatziekten de meest voorkomende doodsoorzaak is in de westerse wereld. Huidige therapieën focussen zich voornamelijk op het verminderen van de risicofactoren zoals het verlagen van de bloeddruk en cholesterol. Bij patiënten met een belemmerde bloedtoevoer kan men chirurgisch ingrijpen door het vat te dotteren of een stent te plaatsen om zo het vat open te houden. In het geval van een geblokkeerd vat kan er een bypass uitgevoerd waarbij de bloedtoevoer wordt omgeleid.

Atherosclerose wordt tegenwoordig beschouwd als een combinatie van cholesterolstapeling en een chronische ontsteking van de vaatwand. Algemeen wordt geaccepteerd dat de binnenste laag van de vaatwand (*endothel*) wordt geïrriteerd door bijvoorbeeld roken of te hoge bloeddruk. Hierdoor wordt het endothel geactiveerd en kunnen de cholesterol deeltjes uit de circulatie de vaatwand binnendringen. Deze deeltjes worden chemisch veranderd en zijn "vreemd" voor het lichaam. Als gevolg wordt het immuunsysteem geactiveerd en worden er ontstekingscellen (*leukocyten*) naar de vaatwand gestuurd om de deeltjes op te ruimen. Macrofagen zijn ontstekingscellen die gespecialiseerd zijn in het opruimen van gemodificeerde cholesterol deeltjes. Na het opnemen van cholesterol worden macrofagen schuimcellen ook wel foamcellen genoemd. De macrofagen worden door de opname van cholesterol deeltjes geactiveerd en produceren allerlei ontstekingsmediatoren waardoor andere leukocyten worden aangetrokken. Hierdoor ontstaat er een vicieuze cirkel die leidt tot het ontstaan van een plaque. Als beschermingsmechanisme wordt er een kapsel gevormd van bindweefsel en collageen. Dit kapsel zorgt ervoor dat de inhoud van de plaque niet in contact komt met het bloed. In dit stadium spreekt men van een stabiele plaque en zijn er weinig klinische manifestaties. Bij de verdere ontwikkeling zal het kapsel steeds dunner worden door allerlei enzymen die worden geproduceerd door de foamcellen. Als het kapsel uiteindelijk scheurt, komen stollingsfactoren uit de plaque vrij en ontstaat er een bloedprop. Deze bloedprop kan een vat volledig afsluiten waardoor het achterliggend orgaan geen zuurstof meer krijgt met een hart- of herseninfarct als gevolg.

In dit proefschrift hebben we onderzoek verricht naar de rol van antigeen presenterende cellen, namelijk dendritische cellen en macrofagen. Deze cellen herkennen "vreemde" deeltjes. Vreemde deeltjes zijn bacteriën en virussen maar dus ook gemodificeerd cholesterol. Antigeen presenterende cellen ruimen deze deeltjes (*antigenen*) op door ze op te eten (*fagocytose*) en ze te "verteren" (*processen*) waarna ze de kleine stukjes (*peptiden*) presenteren aan T cellen. Specifieke T cellen herkennen deze peptiden en gaan over tot de aanval en produceren cytokinen. Ook B cellen worden geactiveerd en gaan antilichamen maken. Dit proces van het activeren van T en B cellen noemt men een immuunreactie. Wanneer er een immuunreactie wordt opgewekt tegen lichaamseigen deeltjes, spreekt men van een auto-immuunziekte. Ook atherosclerose wordt beschouwd als een auto-immuunziekte omdat er een immuunreactie wordt opgewekt tegen het lichaamseigen, slechte cholesterol, de gemodificeerde lage-dichtheid lipoproteïnen (LDL).

De meest potente antigeen presenterende cel is de dendritische cel (DCs). DCs hebben de unieke capaciteit om zowel antigeen specifieke als naïeve T cellen te activeren. Vooral door hun eigenschap van het activeren van naïeve T cellen zijn DCs uitermate geschikt voor vaccinatie strategieën. In **hoofdstuk 2** gebruiken we DCs om muizen te vaccineren tegen geoxideerd LDL (oxLDL). In dit hoofdstuk hebben we DCs beladen met oxLDL en deze intraveneus toegediend aan LDLr deficiënte muizen voor de inductie van atherosclerose door middel van een vetrijk dieet en collar plaatsing. Deze therapie leidde tot 87% reductie van de plaque grootte en meer stabiele laesies. Het bewijs dat de vaccinatie strategie gewerkt heeft, is te vinden in de verhoogde concentratie van oxLDL-specifieke IgG en het verhoogd aantal oxLDL-specifieke T cellen. OxLDL-specifieke IgG antilichamen in het serum vormen immuuncomplexen met oxLDL. Deze immuuncomplexen worden dan herkend en opgeruimd door macrofagen. Daarnaast zullen oxLDL-specifieke T cellen in de aanval gaan in de aanwezigheid van oxLDL. Het schadelijke oxLDL wordt dus geklaard door het immuunsysteem voordat het de vaatwand kan binnen dringen en een mogelijk bewijs hiervoor is te vinden in het verlaagd cholesterol gehalte in de behandelde muizen.

DCs zijn ook in staat om via CD1d lipide antigenen te presenteren aan natural killer T cellen (NKT). Juist omdat NKT cellen een respons geven op lipide antigenen, kan de manipulatie van NKT cellen een interessante toepassing zijn in de behandeling van atherosclerose. De precieze rol van NKT cellen in atherosclerose is afhankelijk van het stadium van de ziekte maar ook van het gebruikte muismodel met een beschermende rol in LDLr deficiënte muizen maar een atherogene rol in ApoE deficiënte muizen. Het endogene ligand voor NKT cellen is niet bekend maar er zijn 2 synthetische liganden: α -galactosylceramide (α -GalCer) en OCH waarbij α -GalCer leidt tot de productie van Th1 cytokinen (atherogeen) en OCH tot de productie van Th2 cytokinen (anti-atherogeen). In **hoofdstuk 3** tonen we aan dat LDLr deficiënte muizen die behandeld worden met OCH door middel van intra-peritoneale injecties verminderde Th1 cytokinen en meer Th2 cytokinen produceren maar dat het geen effect had op laesie ontwikkeling. Uit de literatuur blijkt dat NKT cellen langduriger worden geactiveerd door dendritische cellen. Daarom zijn

we overgestapt op het toedienen van OCH-beladen DCs wat resulteerde in 71% reductie in plaque grootte. Na injectie migreren DCs naar de lever waar een grote pool van NKT cellen aanwezig is. De behandeling leidde tot de inductie van NKT cellen in het bloed en deze produceerden meer Th2 cytokinen dan de NKT cellen in de controle dieren. Een verklaring voor de verlaagde cholesterol waarden kan gezocht worden in de verhoogde IL-10 productie die optrad in de behandelde muizen.

In de **hoofdstukken 2 en 3** hebben we ons gefocust op vaccinatiestrategieën. Dit zijn behandelingen die gestart werden voordat de muizen atherosclerose ontwikkelen. Aangezien de klinische manifestaties van atherosclerose zich voordoen bij een ver gevorderd stadium van de ziekte, zijn we in **hoofdstuk 4** gaan onderzoeken of we een DC therapie kunnen toepassen in dieren met reeds aanwezige atherosclerose. Omdat in atherosclerose het immuunsysteem reeds geactiveerd is, hebben we er voor gekozen om de muizen te behandelen met tolerogene DCs (immature DCs). Deze DCs presenteren wel de antigenen aan T cellen maar geven niet voldoende activatiesignalen. Hierdoor worden de antigeen specifieke T cellen anergisch en sterven af en wordt er op die manier tolerantie geïnduceerd. LDLr deficiënte muizen werden op een vetrijk dieet gezet gedurende 20 weken om een ver gevorderd stadium van atherosclerose te ontwikkelen. Daarna werden de muizen drie keer behandeld met immature DCs en werden de muizen verder het dieet gevoed gedurende tien weken. Het injecteren van tolerogene DCs leidde tot het stoppen van laesie groei in alle belangrijke plaatsen waar atherosclerose kan ontwikkelen. Een verhoogd aantal regulatoire T cellen werd gevonden in het bloed en er werd ook een verhoogde perifere/lever CD4/CD8 ratio vastgesteld. Beide processen zijn belangrijke onderdelen in tolerantie inductie. Ook zagen we dat de injectie van immature DCs leidt tot de inductie van tolerogene DX5 cellen in de milt en lever. Maar adoptieve transfer van deze cellen leidde niet tot een stop van plaque groei. Daarnaast hebben we vastgesteld dat injectie van immature DCs het cholesterol metabolisme beïnvloedt. Niet alleen waren de cholesterol waarden verlaagd, er werd ook een meer voordelig lipoproteïnenprofiel met lagere LDL en hogere HDL waarden gevonden. Ook werd er een verhoogde expressie van LIGHT en lymphotoxine mRNA vastgesteld wat dan weer gecorreleerd kan worden tot de verlaagde cholesterol waarden. In dit hoofdstuk tonen we aan dat DC-therapie ook toegepast kan worden in vergevorderde atherosclerose wat tot zeer interessante klinische applicaties kan leiden. Zeker omdat DCs al gebruikt worden in veel klinische studies in het veld van kanker.

In **hoofdstuk 5** onderzoeken we het effect van een verstoorde TGF- β signalisering in DCs. TGF- β heeft verschillende anti-atherogene werkingen. Zo ontwikkelen ApoE deficiënte muizen grotere laesies wanneer de TGF- β signalen worden geblokkeerd en omgekeerd, het injecteren van TGF- β in ApoE deficiënte muizen, vermindert de ontwikkeling van atherosclerose. TGF- β heeft dus een beschermende rol doordat het de activatie van T cellen en macrofagen vermindert maar ook door de aantrekking en migratie van leukocyten naar de vaatwand door de hoeveelheid adhesiemoleculen en de productie van chemokinen te verminderen. Daarnaast

bevordert TGF- β de productie van collageen en speelt het dus een belangrijke rol in het stabiliseren van de plaque. Het kweken van DCs in aanwezigheid van TGF- β creëert tolerogene DCs en DCs zelf produceren ook grote hoeveelheden TGF- β maar de precieze werking van TGF- β op cellen van het aangeboren (innate) immuunsysteem in de muis is nog niet onderzocht. Daarom hebben we de atherosclerose ontwikkeling onderzocht in ApoE deficiënte muizen die een defecte TGF- β signalisering hebben in CD11c positieve cellen. Deze ApoE^{-/-}CD11cDNR hebben grotere en onstabielere plaques dan gewone ApoE deficiënte muizen en de laesies bevatte meer T cellen. Dit is te verklaren door de verhoogde activatie status van T cellen in de milt. In ApoE^{-/-}CD11cDNR zijn de T cellen meer geactiveerd, produceren ze meer cytokinen en hebben meer CD44 expressie waardoor ze beter naar de plaats van ontsteking kunnen migreren, in dit geval de plaque. Dit leidt tot een verhoging van het aantal inflammatoire cellen en dit in combinatie met een vermindering van collageenproductie, kan de kans op plaque rupture aanzienlijk vergroten.

In **hoofdstuk 6** concentreren we ons op het effect van foamcelvorming op de functies van antigeen presenterende cellen (APCs). In de literatuur zijn er veel aanwijzingen te vinden dat macrofagen een DCs-achtig uiterlijk krijgen nadat ze foamcellen zijn geworden maar of ze daardoor ook DC-achtige functies verkregen was nog niet bekend. Daarom onderzochten we de antigeen presenterende en antigeen processing eigenschappen van DCs en macrofagen na foamcel vorming *in vitro*. Foamcel APCs werden geïncubeerd in de aanwezigheid van ovalbumine peptiden (om het effect op presentatie na te gaan) en ovalbumine zelf of ovalbumine-immuuncomplexen (om het effect op antigeen processing na te gaan). Wij stelden een DC-achtig uiterlijk vast in macrofagen na foamcel vorming met een verhoogde CD11c, MHC klasse I, MHC klasse II en CD86 expressie. Ook vonden we een verhoogde MHC klasse I afhankelijke antigeen presenterende en processing capaciteit in macrofaag foamcellen. De MHC klasse II presentatie en processing was niet beïnvloed door foamcelvorming. In LDLr deficiënte muizen die een vetrijk dieet hebben gekregen, is de expressie van CD11c verhoogd binnen de macrofaag populatie. Ook zijn de DCs en macrofagen meer geactiveerd zoals aangetoond wordt door de verhoogde CD86 expressie. Al deze bevindingen samen, suggereren dat hoge cholesterolwaarden (hypercholestermie) een invloed kan hebben op de functies van macrofagen en DCs. Om dit te bevestigen is verder onderzoek vereist en moet de antigeen presenterende en processing eigenschappen van APCs worden onderzocht in muizen met een extreem foamcel fenotype in de organen, bijvoorbeeld in ABCA1/ABCG1 dubbel knock-out of ABCA1/SRB1 dubbel knock-out muizen.

In **hoofdstuk 7** stappen we over op de rol van regulatoire T cellen (Tregs) in aneurysma vorming. Een aneurysma is een plaatselijke verwijding van een slagader, bijvoorbeeld de aorta. Normaal gezien is de aorta twee tot drie centimeter breed maar als de doorsnede meer dan anderhalf keer groter is spreken we van een aneurysma. Het scheuren van een aneurysma (*rupture*) is levensgevaarlijk en is meestal fataal. Er is een groeiende hoeveelheid bewijs dat het immuunsysteem een belangrijke rol speelt in aneurysmavorming. In hoofdstuk 7 tonen we aan dat

Nederlandse samenvatting

het wegnemen (*depletie*) van Tregs, het scheuren van de aneursyma's bevordert. Met behulp van micro-array hebben we de genexpressie van duizenden genen in de aorta's kunnen bestuderen. We hebben vastgesteld dat de genexpressie van genen betrokken in aneurysma vorming en energie metabolisme sterk beïnvloedt zijn. Vooral de genexpressie van genen die een rol spelen in de citroenzuurcyclus is sterk verminderd in muizen behandeld met een depleteren antilichaam voor Tregs. Daarnaast hebben we, met behulp van verschillende technieken, geprobeerd de Treg populatie te vergroten en het effect hiervan op aneurysmavorming te bestuderen. Tot nu toe zijn we daar nog niet in geslaagd. Daarom is in de toekomst zeker verder onderzoek vereist waarin Tregs worden geïnduceerd door bijvoorbeeld een behandeling met muis IL-2 antilichaam immuuncomplexen.

Samenvattend, laat dit proefschrift zien dat DCs een belangrijk middel kunnen zijn bij het verhinderen maar ook het verminderen van atherosclerose. We hebben aangetoond dat vaccinatiestrategieën gebruikmakend van oxLDL-beladen DCs en OCH-beladen DCs, respectievelijk oxLDL-specifieke T en B cellen activeert of NKT cellen. Beide vaccinatiestrategieën, ook al maken ze gebruik van verschillende mechanismen, verminderen laesie groei in LDLr deficiënte muizen. Daarnaast hebben we aangetoond dat tolerogene DCs de verdere voortgang van laesieontwikkeling in muizen met een ver gevorderd stadium van atherosclerose, kunnen stoppen. Ook tonen we aan dat ApoE deficiënte muizen die niet meer in staat zijn om tolerogene DCs te maken, grotere en meer instabielere plaques hebben. Daarnaast tonen de studies in dit proefschrift aan dat hypercholestermie belangrijke effecten heeft op de functies van DCs en macrofagen maar ook dat er mogelijkheden zijn via DCs-gebaseerde therapieën het eigen immuunsysteem te activeren, of af te remmen, naargelang het stadium van de ziekte. Mede door de grote vooruitgang die wordt geboekt in het gebruik van DC-therapie in kanker, hebben we er hoop op dat deze therapieën mogelijk ook kunnen worden toegepast in de vermindering van het aantal hart -en vaatziekten bij de mens.