



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Bone marrow transplantation in mice as a tool to study M2 macrophage activation in atherogenesis

Ren, B.

Citation

Ren, B. (2017, December 14). *Bone marrow transplantation in mice as a tool to study M2 macrophage activation in atherogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/57798>

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/1887/57798>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57798> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Ren, Baoyan

Title: Bone marrow transplantation in mice as a tool to study M2 macrophage activation in atherogenesis

Date: 2017-12-14

6

Summary and perspectives



Table of contents

6.1	English summary.....	120
6.1.1	Introduction	121
6.1.2	Therapeutic targeting of M2 macrophages for atherosclerosis treatment	121
6.1.3	The importance of macrophage phenotype markers in atherogenesis.....	122
6.1.4	The importance of protein kinase pathways in macrophage phenotype polarization and atherogenesis.....	123
6.1.5	The importance of upstream stimulatory factor 1 in atherogenesis	125
6.1.6	Concluding remarks and future perspectives.....	126
6.2	Nederlandse samenvatting	129
6.2.1	Inleiding.....	129
6.2.2	M2 macrofagen als therapeutisch doelwit voor de behandeling van atherosclerose	129
6.2.3	Het belang van macrofaagfenotype-merkers in de ontwikkeling van atherosclerose	129
6.2.4	Het belang van eiwitkinase-signaleringsroutes in macrofaagpolarisatie en atheroscleroseontwikkeling.....	132
6.2.5	Het belang van upstream stimulatory factor 1 in atheroscleroseontwikkeling .	134
6.2.6	Concluderende opmerkingen en toekomstperspectieven	134

English summary

6.1.1 Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the number one cause of death in the Western world. In 2012, the World Health Organization reported that more than 30% of total deaths was caused by CVD, which often results from atherosclerosis.¹ Atherosclerosis is a blood vessel narrowing and hardening disease characterized by deposition of cholesterol locally in the arterial wall and leading to a low-grade chronic inflammation.² Strikingly, based on 2011-2014 data, 11% of United States' adults have total serum cholesterol levels that exceed the threshold of "high blood cholesterol" (>240 mg/dL) for increased CVD risk.³ Current therapeutic strategies to prevent atherosclerosis are mainly aimed at lowering serum low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, e.g. by using statins to inhibit *de novo* cholesterol synthesis.⁴ Although an approximate 25% to 35% death rate reduction is achieved by the use of cholesterol lowering drugs in the last several tens of years,⁵⁻⁷ the remaining high incidence of CVD indicates a clear necessity for exploring alternative therapeutic targets for reducing the residual risk of atherosclerosis.

6.1.2 Therapeutic targeting of M2 macrophages for atherosclerosis treatment

The development of atherosclerosis is a complex multi-factorial process.^{8,9} Deposition of modified lipoproteins, rich in cholesterol, in the arterial wall causes monocytes to be attracted to the intimal area, where they differentiate into macrophages that ingest the modified lipoproteins. This process, leading to the formation of macrophage foam cells, hallmarks the development of atherosclerosis. Thus, being the major cell type of the early atherosclerotic lesion, macrophages significantly contribute to the lesional microenvironment and strongly influence atherosclerosis progression.

Increasing evidence indicates that the heterogeneity of macrophages plays an important role in shaping the size, composition, and clinical consequences of atherosclerotic lesions. Two major types of macrophages can be distinguished in lesions: pro-inflammatory M1 macrophages and anti- or less inflammatory M2 macrophages.¹⁰ The distribution of the different types of macrophages in the lesion are both regional and stage-specific. In the early stage of atherosclerosis, the lesion is mainly comprised of M2 macrophages, whereas in the advanced stage, M1 macrophages represent the leading macrophage phenotype.¹¹ Furthermore, M1 macrophages dominate the rupture-prone shoulder regions of the atherosclerotic lesion,¹⁰ whereas M2 macrophages are more often found in stable locations like peripheral regions in asymptomatic plaques.¹² These findings imply that the macrophage phenotype distribution is an important determining factor in the development of atherosclerosis.

M1 macrophages express high levels iNOS which facilitates the production of NO. High levels of NO produced by lesional macrophages, thus indicating an enhanced production of oxidative species, were shown to be pro-atherogenic.¹³⁻¹⁵ Moreover, M1 macrophages produce many pro-inflammatory cytokines, which aggravate atherosclerosis progression. Besides modulating the inflammatory response, M1 macrophages are also negatively correlated with cap thickness of the lesion,¹⁶ an important determinant of the susceptibility to plaque rupture. Plaque rupture in advanced atherosclerosis can lead to thrombus formation and the blockade of the arterial lumen, which represent the underlying cause of acute cardiovascular symptoms such as myocardial infarction and stroke. In contrast, M2 macrophages have long been regarded to be atheroprotective.¹⁷ M2 macrophages produce high levels of anti-inflammatory cytokines such as

IL-10 and TGF- β , which inhibit atherosclerosis development.^{18,19} Furthermore, M2 macrophages express high levels of Arg1, a major player in L-arginine metabolism. By regulating the synthesis of proline, the major precursor of collagen, M2 macrophages can contribute to plaque stability by increasing collagen production.²⁰ In addition, Arg1 reduces NO production by competing with iNOS for the common substrate L-arginine. Therefore, M2 macrophages protect against atherosclerosis, by inhibiting lesion progression and by increasing plaque stability. Collectively, inducing the repolarization of M1 to M2 macrophage thus seems a promising therapeutic strategy for the treatment of atherosclerosis.

We therefore first studied the role of the M2 marker Arg1 in atherosclerosis development. Subsequently the importance of Akt2 and MKP2, kinases that both have been implied in M2 macrophage polarization, in atherosclerotic lesion development was investigated. Evidence is accumulating showing that identification of disease-associated gene mutations is a successful strategy for the identification of novel drug targets. Therefore, finally, the contribution of hematopoietic *Usf1*, a gene associated with familial combined hyperlipidaemia, to atherosclerotic lesion formation was characterized.

6.1.3 The importance of macrophage phenotype markers in atherogenesis

Arg1 and iNOS, classic macrophage phenotype marker genes, share the same substrate L-arginine and hence negatively regulate each other's activity.²¹ The role of iNOS which facilitates the production of NO, a potent signaling molecule, in atherosclerosis, has been well-studied.^{17,18, 22-27} However, about the role of Arg1 in atherosclerotic lesion development still little is known. Hence, in **Chapter 2**, we aimed to unravel the role of macrophage Arg1 in atherosclerosis. LDLr KO mice received a transplantation of Arg1 KO or wild-type bone marrow, in order to specifically investigate the role of hematopoietic Arg1. We found that, deletion of Arg1 in macrophages induces a more M2-like phenotype *in vitro*. M2 macrophages have previously been reported to be more prone to foam cell formation.²⁸ In line, loss of Arg1 in macrophages led to an increased susceptibility to foam cell formation in response to acetylated LDL (acLDL) loading *in vitro*. In agreement with these findings, bone marrow Arg1 deficiency also resulted in enhanced foam cell formation *in vivo*, in absence of effects on circulating cholesterol levels in LDLr KO recipients fed a Western-type diet. However, the enhanced macrophage foam cell formation did not alter the susceptibility to atherosclerotic lesion development, as similar lesion sizes were found in LDLr KO recipients that received either Arg1 KO or WT bone marrow. Furthermore, the lesional collagen content was also not affected by macrophage-specific Arg1 loss. This might be explained by the fact that smooth muscle cells, the main producers of lesional collagen, are not affected by the bone marrow transplantation procedure. To further clarify the compensatory mechanisms that might counteract the enhanced foam cell formation, we investigated the leukocyte profile in the circulation and spleen of the Arg1 KO bone marrow transplanted mice. Deletion of Arg1 in bone marrow led to a decrease in B cells. B cells can protect against atherosclerosis by mediating the production of antibodies against oxLDL.²⁹ However, despite the observed reduction in B cells, oxLDL-specific antibodies were increased in LDLr KO mice transplanted with Arg1 KO bone marrow. Deletion of Arg1 in bone marrow-derived cells also led to significantly lower amounts of CD11b⁺ cells, CD11b⁺/ly6C^{low+med} monocytes and neutrophils in the spleen of LDLr KO mice and a tendency towards decreased in pro-inflammatory CD11b⁺/ly6C^{high} cells. Considering that 30% of the total number of monocytes in atherosclerotic lesions are derived from the spleen,³⁰ this might provide an atheroprotective mechanism, counteracting the increased foam cell formation in the LDLr KO mice transplanted with Arg1 KO bone marrow. In conclusion, Arg1 in bone marrow-derived cells

affects foam cell formation and circulating B cells, but does not affect atherosclerosis development in LDLr KO mice, suggesting that hematopoietic Arg1 is unlikely a therapeutic target for atherosclerosis treatment.

Repolarization of pro-inflammatory M1 macrophages to less inflammatory M2 macrophages is considered a promising strategy to reduce atherosclerosis. However, simply changing one of the markers used to discriminate between the M1 and M2 macrophage phenotype, namely Arg1, is too simplistic and one should merely consider a more holistic approach to metabolically and immunologically reprogram macrophages.

Macrophages represent a continuous spectrum of cells with different markers. The current M1/M2 classification of the macrophage system is not sufficient for illustrating the full spectrum of macrophage functions and activation pathways. *In vitro*, macrophages can be skewed to an M1 phenotype by incubation with LPS/IFN- γ and to an M2 phenotype by IL-4/IL-13. *In vivo*, however within the atherosclerotic lesion, however, a wide variety of factors are present that may not induce such a clear-cut M1 or M2 phenotype as *in vitro*.^{31,32} This indeed results in a bunch of macrophage phenotypes that lack or express the classic M1/M2 macrophage phenotype markers only to a limited extend.³³ This largely limits the potential value of known macrophage phenotype marker genes as diagnostic indicators and therapeutic targets.

M1 and M2 macrophages use different signaling pathways to fuel their effector functions.³⁴ For a more holistic approach to influence macrophage metabolic and inflammatory functions, targeting microRNAs, have been suggested as a successful strategy, as they are important posttranscriptional fine tuners of many biological and metabolic programs, have been suggested as a successful strategy. Notably, recently it was shown that inhibition of microRNA-33 skews macrophages to an M2 phenotype and reduces atherosclerosis.³⁴ Interestingly, this apparently works via the protein kinase AMPK. Protein kinases are pivotal for stimulus-triggered cellular processes.³⁵ Except AMPK, macrophage activation is also tightly regulated by the phosphoinositide-3-kinase/protein B (PI3K/Akt) pathway and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.³⁶⁻³⁸ In the context of this thesis, we studied the role of Akt2, a member of the PI3K/Akt pathway and MKP2, a phosphatase involved in the de-activation of MAPK in atherogenesis.

6.1.4 The importance of protein kinase pathways in macrophage phenotype polarization and atherogenesis

Akt2 is a potent macrophage polarization regulator.³⁹⁻⁴¹ Macrophage Akt2 deficiency skews macrophages towards an M2 phenotype and protects against diet-induced atherosclerosis in non-diabetic LDLr KO mice.^{42,43} In addition to regulating macrophage polarization, Akt2 is also a major regulator of the insulin pathway. Total body Akt2 deficiency leads to impaired glucose tolerance in mice, however, it has little to no effect on atherosclerosis development.^{43,44} To better understand the role of macrophage Akt2 in atherosclerosis under glucose intolerant conditions, glucose intolerant Akt2/LDLr dKO mice were transplanted with either LDLr KO or Akt2/LDLr dKO bone marrow, thereby enabling investigation of macrophage-specific restoration of Akt2 expression. In **Chapter 3** data are presented that indicating that macrophage Akt2 does not significantly contribute to the type 2 diabetic phenotype and atherosclerosis development in Akt2/LDLr dKO mice. Previous studies showed that macrophage Akt2 deficiency is associated with a decreased susceptibility to foam cell formation.⁴³ In agreement, we found that Akt2 restoration increased

foam cell formation. In line with the augmented foam cell formation,⁴³ LDLr KO macrophages with functional Akt2 signaling exhibited an M2 macrophage phenotype. Interestingly, this finding is in contrast to previous studies showing that Akt2 *deficiency* promotes M2 macrophage polarization.^{42,45,46} In this view, it is worth to note that in our study, the effects of Akt2 were studied in LDLr KO macrophages, whereas previous studies investigated Akt2 function in wild-type macrophages. Overall, the results described in chapter 3 indicate that macrophage Akt2 restoration leads to more pronounced foam cell formation, but a less inflammatory M2 macrophage phenotype; ultimately, leading to unaltered atherosclerosis development in the transplanted Akt2/LDLr dKO mice. In addition to the counteracting effects of enhanced foam cell formation and reduced inflammation upon Akt2 restoration, likely also the glucose intolerant background contributes to the observed unchanged atherosclerosis susceptibility of Akt2/LDLr dKO mice transplanted with Akt2 positive/LDLr KO bone marrow. It is worth noting that the macrophages investigated in the current study were LDLr deficient, which is different as compared to the previously published studies.^{42,45,46} Macrophage activation is the result of a collaborative interaction of several gene products in response to an extra cellular signaling stimulus.⁴⁷ Genetic variation could possibly disturb the cellular signaling pathways, thereby affecting macrophage activation and ultimately lead to a totally different phenotype.⁴⁸ Hence, we speculate that the presence of the LDLr on macrophages might have important consequences for M2 macrophage polarization induced by Akt2 deficiency. To confirm this further dedicated research is needed. Our study in this thesis expanded the knowledge of Akt2 in macrophage polarization and atherosclerosis. It underlined that the atherosclerotic role of Akt2 might be influenced by the genetic and metabolic background of the atherosclerosis-prone mouse model used.

MAPK phosphatases (MKP) represent a family of phosphatases that are tightly related to mitogen-activated protein kinases (MAPKs).⁴⁹ The MKP family consists of at least ten different members, each MKP family member being able to bind and de-activate their substrate MAPKs by dephosphorylating their phosphoserine/threonine and phosphotyrosine residues.^{50,51} The specific functions of MKPs are different for each family member, which is at least partly due to their distinct MAPK substrate preference.⁴⁹ Interestingly, MPK2 is involved in macrophage polarization⁵², and thus represents a potential target for the treatment of atherosclerosis. **Chapter 4** therefore focuses on the effect of MKP2 on macrophage function and atherosclerosis development. We demonstrated that MKP2 deficiency enhanced the activation of the MAPK member JNK in thioglycollate-elicited macrophages. In addition, macrophages lacking MKP2 express an M2-like phenotype, and in line, display an enhanced susceptibility to foam cell formation in response to oxLDL. Next, MKP2 deficient bone marrow was transplanted into LDLr KO mice. After 9 weeks WTD feeding, the lipoprotein cholesterol distribution profile of the recipient mice was not affected by bone marrow MKP2 loss. In agreement with the M2 macrophage polarization *in vitro*, peritoneal macrophages from MKP2 KO bone marrow recipients showed a decreased expression of the M1 markers CD86 and MHCII. Furthermore, MKP2 KO bone marrow recipients displayed increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10, whereas the production of the pro-inflammatory cytokine IL-12 was reduced. Strikingly, despite the observed decrease in pro-atherogenic cytokines, an increase in atherosclerotic lesion size was observed after 9 weeks of WTD diet feeding. This result indicated that the anti-inflammatory effect induced by MKP2 deletion in the end was likely overruled by the augmented foam cell susceptibility of the MKP2 knockout macrophages. Importantly, the collagen content in the lesions of the MKP2 bone marrow recipients was lower than in the lesions of the WT bone marrow recipients, indicating that bone marrow MKP2 also leads to an unstable atherosclerosis phenotype. *In vitro*, the MKP2 deficiency-

induced M2 macrophage phenotype had only a limited effect on foam cell formation in absence of oxLDL stimulation. Therefore, it is likely that high levels of circulating cholesterol magnify the effect of MKP2 deficiency on foam cell formation and ultimately overrule the beneficial anti-inflammatory effects in the LDLr KO recipients. From this view, it would be very interesting to expand the current study and investigate the role of MKP2 in atherosclerosis development under cholesterol-lowering conditions.

The protein kinase superfamily members and the proteins regulating their activity are the most intensively studied protein drug targets in current pharmacological research. Based on a 2014 report, there were more than 3000 approved and experimental kinase-based drugs in active clinical trials.⁵³ The majority of the trials with kinase-targeting agents focus on the treatment of cancer, but the field is now expanding to the treatment of inflammatory diseases.⁵³ Emerging evidence indicates that modulation of the kinase pathway could effectively alter macrophage polarization in a beneficial way.⁵⁴⁻⁵⁹ Therefore, targeting kinases is considered a potent strategy for the development of novel pharmaceutical therapies for the treatment of atherosclerosis. In this thesis, it is indeed shown that targeting protein kinase activity, i.e. by restoration of kinase AKT2 or disruption of kinase-inactivating MKP2, is an effective way to stimulate macrophage M2 polarization and induce anti-inflammatory effects. In both studies, however, the M2 polarization also led to augmented foam cell formation and eventually had either no effect on atherosclerotic lesion development or even led to larger lesions.

6.1.5 The importance of upstream stimulatory factor 1 in atherogenesis

The hallmark of atherosclerosis is foam cell formation, a pathological process for which both macrophages and lipids are indispensable. In the first part of this thesis, we focused on genes involved in M2 macrophage polarization. In the second part of thesis, we focused on *Usf1*, a gene involved in lipid metabolism. Patients suffering from familial combined hyperlipidemia (FCHL) display a high risk to develop premature coronary artery disease.^{60,61} *Usf1* is a gene associated with familial combined hyperlipidemia (FCHL), characterized by increased LDL and triglycerides concentrations, an effect often accompanied by decreased HDL levels.⁶⁰ A previous study suggested an important role of total body *Usf1* in lipid metabolism and atherogenesis.⁶² In **chapter 5**, we investigated the role of hematopoietic *Usf1* in atherosclerosis. In this study, we found that bone marrow restricted *Usf1* deficiency induced a different phenotype in LDLr KO mice as compared to total body *Usf1* deficiency. For instance, total body *Usf1* deletion led to a beneficial cardiometabolic lipid profile, marked by decreased athero-promoting VLDL cholesterol and triglyceride levels, and increased levels of athero-protective HDL cholesterol. In contrast, bone marrow *Usf1* deletion led to elevated VLDL cholesterol levels and increased susceptibility to atherosclerosis. This effect can likely be attributed to an impaired clearance of VLDL by white adipose tissue. Overall, both literature and our study demonstrated that *Usf1* alteration significantly affect atherosclerosis development.⁶² Interestingly, in contrast to the pro-atherogenic role of total body *Usf1*,⁶² hematopoietic-specific *Usf1* is athero-protective. Our study thus highlighted a tissue specific role of *Usf1* in atherosclerosis development. This should be taken into account when developing novel pharmaceuticals aimed at inhibiting *Usf1* activity or downregulating its expression to combat atherosclerosis.

6.1.6 Concluding remarks and future perspectives

Using knockout mice and the bone marrow transplantation tool, we evaluated the effects of genetic modulation involved in macrophage polarization and lipid metabolism on the pathogenesis of atherosclerosis. First a classic M2 marker gene *Arg1* was studied (**Chapter 2**), followed by key regulators of M2 macrophage activation, *Akt2* (**Chapter 3**) and *MKP2* (**Chapter 4**). In the end we discussed the role of *Usf1* (**Chapter 5**), a gene associated with familial combined hyperlipidaemia associated gene, in atherosclerosis. Besides these selected genes, many other molecules, that are possibly also involved in macrophage activation and lipid metabolism, are still open for evaluation.

Macrophages are essential for the maintenance of tissue homeostatic functions by regulating gene expression in response to the local tissue environment. The plasticity of macrophage phenotypes is highly manipulable, which is interesting as the different types of macrophage phenotypes contribute to atherogenesis in a distinct way. These features provide a possibility to develop cell- or gene-based therapies for treating atherosclerosis by modifying macrophage phenotypes. The most successful therapy targeting macrophage function to date, is pulmonary macrophage transplantation to treat hereditary pulmonary alveolar proteinosis.^{63,64} The idea of therapeutic targeting of macrophage phenotype was developed first for the treatment of tumors.^{65,66} However, all clinical trials failed until now,⁶⁷⁻⁷⁴ which is largely due to the rapid loss of the anti-tumor M1 phenotype when the pre-educated macrophages are re-exposed to the tumor microenvironment.⁷⁵⁻⁷⁷ Therefore, establishing how to “lock” the macrophage polarization phenotype *in vivo*, and consequently modulate the microenvironment, rather than be exposed to modulation by the local microenvironment is the key point for improving the efficiency of macrophage-based therapies.

Targeting macrophage genes at the molecular level to modify macrophage polarization as described in this thesis, is an alternative. By modifying the expression of genes involved in macrophage polarization, the phenotype can be favorably altered and may lock polarization of the macrophage into a specific phenotype. For example, *MKP2* loss skews macrophages from an M1 to a more M2-like phenotype. Furthermore, after bone marrow transplantation, *LDLr* KO mice transplanted with *MKP2* deficient bone marrow showed an anti-inflammatory plasma cytokine profile. This finding suggests that genetic modulation of the macrophage phenotype and “locking” of the favorable phenotype is feasible in mice. Therapeutic strategies aimed at altering protein kinase activity, as shown in this thesis, are an effective way to stimulate macrophage M2 polarization and induce anti-inflammatory effects.

Another interesting strategy is to interfere in epigenetic regulation of monocyte/macrophage gene expression. Epigenetic modifications, such as DNA methylation, histone modification and regulation via non-coding RNAs, alter DNA accessibility and chromatin structure, thereby regulating the patterns of gene expression.⁷⁸⁻⁸³ Emerging literature suggests an important role for epigenetic regulation in macrophage polarization and the development of atherosclerosis.⁸⁴⁻⁸⁸ For instance, *Jmjd3*, a histone 3 Lys27 (H3K27) demethylase, facilitates expression of *IRF4*, a key M2-promoting transcription factor, and regulates the M2 macrophage polarization without affecting M1 macrophages.^{89,90} Deleting histone deacetylase 3 (*Hdac3*) skews macrophage to the M2 phenotype, improves lipid handling and increases atherosclerosis plaque stability.⁹¹ Moreover, treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine, an inhibitor of DNA methylation, decreases macrophage inflammation and reduces atherosclerosis development in *LDLr* KO mice.^{92,93} Besides, the

epigenetic changes seem also transplantable. Van Kampen and colleagues found that bone marrow from mice exposed to long-term Western-type diet challenge shows hypomethylation of CpG regions in the genes encoding Pu.1 and IRF8 and that transplantation of these bone marrow cells to LDLr KO mice on a low-fat, no cholesterol chow diet leads to increased monocyte/macrophage proliferation and differentiation, and aortic root atherosclerosis plaque formation.⁹⁴ Further research to increase the understanding of epigenetic changes in macrophages during atherosclerotic lesion development and the epigenetic pathways controlling their inflammatory repertoire would greatly help the future development of novel therapies in the combat against atherosclerosis.⁷⁸

From an inflammation point of view, the anti-inflammatory M2 macrophage phenotype is beneficial for slowing down the progression of atherosclerosis. However, M2 macrophages accelerate foam cell formation which largely reduces the therapeutic value of M2 macrophages under high cholesterol conditions. The enhanced foam cell formation results in pro-atherogenic effects and may counteract the anti-inflammatory atheroprotective effects of the M2 macrophage (**Chapter 3 and 4**). Therefore, it is important that novel therapeutic strategies aimed at skewing macrophages to an anti-inflammatory M2 phenotype are combined with plasma cholesterol lowering drugs.

Massive lowering of plasma cholesterol is a valuable strategy to induce regression of atherosclerotic lesions in mouse models of atherosclerosis. Interestingly, in regressing plaques a consistent increase in M2 over M1 macrophages is observed.⁹⁵⁻⁹⁷ A very recent study indicated that influx of macrophages is important to induce lesion regression, likely to remove debris from regressing plaques.⁹⁸ Upon transplantation of apoE KO aorta's with plaques to a CCR2 KO mouse, no recruitment of new macrophages was seen into the existing lesions was seen and no regression of atherosclerosis could be induced. CCR2 is a chemokine receptor crucial for monocyte recruitment to atherosclerotic lesions and a marker of classical, pro-inflammatory monocytes.⁹⁹ It has been speculated that the classical Ly6C^{high}/CCR2⁺ monocytes are the precursors for M1 macrophages, but this has not been firmly established. Considering that the majority of the patients enter the clinic with established atherosclerotic lesions, it will be important to investigate if induction of M2 macrophages on top of cholesterol lowering, can promote or impede atherosclerosis regression.

As described in this thesis, bone marrow transplantation is an effective way to modify gene expression in macrophages. Bone marrow transplantation is an excellent tool to uncover if, and via which mechanisms, a gene of interest influences atherosclerosis development, and to provide essential information on macrophage gene candidates as potential pharmacological targets. However, with respect to clinical application, bone marrow transplantation requires myeloablation, and hence is not suitable as a direct therapy for atherosclerosis treatment not suitable. To modulate macrophage gene expression, several strategies can be pursued. For instance, small interfering RNA (siRNA), short hairpin RNA (shRNA), and microRNA (miRNA) can be used for gene-silencing,¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ while lentiviral vectors and plasmid vectors are suitable for overexpression of a gene of interest.^{105,106} Besides using genetic engineering methods to directly target gene expression, pharmacological inhibitors and agonist/antagonists of a gene of interest can also be specifically delivered to macrophages using macrophage-receptor-based or ligand-anchored micro-/nano-carriers.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ In fact, nanoparticles loaded with pioglitazone, a potent activator of PPAR- γ , significantly skew monocyte/macrophage to an anti-inflammatory phenotype in ApoE KO mice.¹¹⁰ Furthermore, nanoparticles containing contrast agents used in computed

tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), are also a potent tool to image and characterize the plaque *in vivo*, providing basis for the further clinical treatment strategies.¹⁰⁹ Overall, these strategies offer possibilities to specifically target genes and signaling pathways that skew macrophage functions and might prove interesting in further future clinical treatment.

Macrophage heterogeneity is not only pivotal for atherosclerosis, but also for various other diseases with extensive inflammation components, such as cancer, Parkinson's disease, obesity, diabetes, and arthritis.¹¹¹⁻¹¹⁷ Therefore, targeting macrophages would not only provide possibilities for the treatment of cardiovascular disease, but can also be beneficial for multiple other inflammation-based pathologies.

In conclusion, modulation of macrophage polarization combined with cholesterol lowering agents, might provide a promising strategy to treat atherosclerosis. It would be interesting to evaluate whether selective targeting of macrophage polarization is indeed an effective approach for the treatment of atherosclerosis and for the reduction of cardiovascular risk.

6.2 Nederlandse samenvatting

6.2.1 Inleiding

Hart- en vaatziekten (HVZ) is de nummer één doodsoorzaak in de Westerse wereld. In 2012 rapporteerde de internationale *World Health Organization* that meer dan 30% van het totaal aantal overlijdens in de wereld waren veroorzaakt door HVZ, dat vaak het gevolg is van slagaderverkalking ofwel atherosclerose.¹ Atherosclerose, een aandoening die leidt tot vernauwing en verstijving van bloedvaten, wordt gekarakteriseerd door een afzetting van cholesterol lokaal in de vaatwand met een chronische ontsteking van de bloedvatwand als gevolg.² Een belangrijke oorzaak voor deze cholesterolafzettingen is onder andere een hoog totaal cholesterolniveau in het bloed. In dit kader is het belangrijk te vermelden dat gegevens uit de jaren 2011-2014 laten zien dat een opmerkelijke hoeveelheid van 11% van de Amerikaanse volwassenen een totaal serum-cholesterolniveau heeft dat de drempelwaarde voor de definitie van 'hoog cholesterol' (>240 mg/dL) als risicofactor voor HVZ overschrijdt.³ De huidige therapieën voor atherosclerose zijn er vooral op gericht om de hoge cholesterol niveaus getransporteerd door het zogeheten lage-dichtheidslipoproteïne (LDL) in het bloed te verlagen, bijvoorbeeld door het gebruik van statines om *de novo* cholesterol synthese te remmen.⁴ In de afgelopen decennia heeft men dankzij deze cholesterolverlagende therapieën een afname van het risico op HVZ van ongeveer 25-35% kunnen bewerkstellingen.⁵⁻⁷ Echter, de resterende hoge incidentie van HVZ geeft aan dat er een duidelijke noodzaak is voor alternatieve therapeutische doelwitten teneinde het restrisico van atherosclerose te verlagen.

6.2.2 M2 macrofagen als therapeutisch doelwit voor de behandeling van atherosclerose

De ontwikkeling van atherosclerose is een complex en multifactorieel proces.^{8,9} De afzetting van gemodificeerde cholesterolrijke lipoproteïnen in de intima van de arteriële vaatwand zorgt ervoor dat monocytën naar dit gebied van de vaatwand worden getrokken, waar zij differentiëren in macrofagen die de gemodificeerde lipoproteïnen opnemen. Dit proces, dat resulteert in de vorming van zogeheten macrofaag-schuimcellen, is het belangrijkste kenmerk van atheroscleroseontwikkeling. Omdat macrofagen het belangrijkste celtype vertegenwoordigen dat aanwezig is in de vroege atherosclerotische plaque, leveren zij een significante bijdrage aan het micromilieu in de plaque en hebben zij een sterke invloed op de vordering van het atherosclerotisch ziekteproces.

In toenemende mate wordt bewezen dat de heterogeniteit van macrofagen een belangrijke rol speelt in het bepalen van de grootte, compositie en klinische consequenties van atherosclerotische plaques. In deze plaques kunnen twee macrofaag-subtypen gedefinieerd worden: pro-inflammatoire M1 macrofagen en anti-, of minder, inflammatoire M2 macrofagen.¹⁰ De verdeling van de verschillende type macrofagen in de plaque is zowel regio- als fasespecifiek. In de vroege fase van atherosclerose ontwikkeling bestaat de plaque vooral uit M2 macrofagen, terwijl in de meer gevorderde fase juist M1 macrofagen het voornaamste fenotype vertegenwoordigen.¹¹ Daarnaast zijn M1 macrofagen dominant aanwezig in de schouderregio's van de atherosclerotische plaque, een deel van de plaque dat erg gevoelig is voor een ruptuur. M2 macrofagen worden in aan de andere kant juist vaker aangetroffen in locaties waar de plaque meer stabiel is, zoals de perifere regio's in asymptomatische plaques.¹² Deze bevindingen impliceren dat de verdeling van het macrofaagfenotype een belangrijke bepalende factor is voor het ontwikkelen van atherosclerose.

M1 macrofagen brengen grote hoeveelheden iNOS tot expressie, een enzym dat de productie van NO faciliteert. Eerdere studies hebben laten zien dat het atherosclerotisch ziekte proces wordt gestimuleerd door juist die macrofagen in de atherosclerotische plaque met een hoge NO-productie.¹³⁻¹⁵ M1 macrofagen produceren daarnaast veel pro-inflammatoire cytokinen, die de ontwikkeling van atherosclerose versnellen. Naast de modulatie van de ontstekingsreactie zijn de hoeveelheden M1 macrofagen in de plaque ook negatief gecorreleerd met de dikte van het kapsel dat de plaque afdekt.¹⁶ Een afname in de dikte van dit kapsel is een belangrijke risicofactor voor het scheuren van de plaque, een complicatie waardoor er een bloedprop kan ontstaan die het bloedvat lokaal of verderop in de bloedstroom kan afsluiten en daarmee acute cardiovasculaire symptomen zoals een hart- of herseninfarct kan veroorzaken. In tegenstelling tot de M1 macrofagen, worden M2 macrofagen juist veelal beschouwd als beschermend ten aanzien van atheroscleroseontwikkeling.¹⁷ M2 macrofagen produceren hoge niveaus van anti-inflammatoire cytokinen zoals IL-10 en TGF- β die erom bekend staan de ontwikkeling van atherosclerose te remmen.^{18, 19} Daarnaast brengen M2 macrofagen grote hoeveelheden Arg1 tot expressie, een enzym dat een sleutelrol speelt in het metabolisme van L-arginine. Arg1 kan met iNOS concurreren voor hun gedeelde substraat L-arginine. Op deze manier verlaagt de Arg1 expressie in M2 macrofagen de NO productie door deze cellen, waardoor M2 macrofagen de ontwikkeling van atherosclerose kunnen tegengaan. Daarnaast kunnen M2 macrofagen de stabiliteit van een plaque vergroten door de synthese van proline, de belangrijkste voorloper van collageen, te verhogen.²⁰ M2 macrofagen beschermen dus tegen atherosclerose door enerzijds de groei van de plaque te remmen en anderzijds de stabiliteit van de plaque te verhogen. Op basis van deze bevindingen kan de verschuiving van de macrofaagpolarisatie van een M1 naar een M2 fenotype beschouwd worden als een veelbelovende therapeutische strategie voor de behandeling van atherosclerose.

Om deze hypothese te testen, hebben we eerst onderzocht welke rol de M2 marker Arg1 speelt in de ontwikkeling van atherosclerose. Daarna hebben we de relevantie van Akt2 en MKP2, beide kinases waarvan gesuggereerd wordt dat ze betrokken zijn bij de polarisatie van macrofagen naar het M2 fenotype, in de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd. Tot slot, omdat er in toenemende mate bewijs wordt gevonden dat de identificatie van ziekte-geassocieerde genmutaties een succesvolle strategie is voor het ontdekken van nieuwe therapeutische doelwitten, hebben we onderzocht welke rol USf1, een gen dat geassocieerd wordt met familiäre hyperlipidemie, speelt in het ontstaan van atherosclerose.

6.2.3 Het belang van macrofaagfenotype-merkers in de ontwikkeling van atherosclerose

Arg1 en iNOS, klassieke merkers voor respectievelijk het M2 en M1 macrofaagfenotype, delen het gezamenlijke substraat L-arginine en remmen hiermee elkaars activiteit.²¹ De rol van iNOS, dat de productie van het potente signaleringsmolecuul NO faciliteert, is reeds uitgebreid bestudeerd.^{17,18,22-27} Echter, de rol van Arg1 in de ontwikkeling van atherosclerose is nog onbekend. In **hoofdstuk 2** hebben we daarom getracht om de rol van macrofaag-specifiek Arg1 in de ontwikkeling van atherosclerose te ontrafelen. Hiertoe werd in LDLr KO muizen het eigen beenmerg vervangen door beenmerg van ofwel Arg1 KO of wildtype donoren. Na herstel van de beenmergtransplantatie werden de dieren een Westers dieet gevoed om de ontwikkeling van atherosclerose te stimuleren. Allereerst vonden we dat uitschakeling van Arg1 in macrofagen *in vitro* een meer M2-gelijkend fenotype veroorzaakte. Zo waren Arg1 KO macrofagen meer gevoelig voor het ontwikkelen van schuimcellen na blootstelling aan geacetyleerd LDL (acLDL) *in vitro*. Dit

is in overeenstemming met de literatuur, waarin eerder is laten zien dat M2 macrofagen meer gevoelig zijn voor schuimcelvorming.²⁸ In overeenstemming met deze *in vitro* bevindingen, leidde beenmerg-specifieke deficiëntie van Arg1 in LDLr KO muizen ook tot een verhoogde schuimcelvorming, zonder dat er een effect op de bloedcholesterolspiegels waargenomen werd. Echter, deze verhoogde schuimcelvorming had geen effect op de gevoeligheid voor atheroscleroseontwikkeling, aangezien de plaquegroottes in de Arg1 KO beenmerggetransplanteerde LDLr KO muizen vergelijkbaar waren aan die van WT beenmerggetransplanteerde LDLr KO muizen. Daarnaast was ook de hoeveelheid collageen in de plaques niet verschillend tussen de twee groepen, wat verklaard zou kunnen worden door het feit dat de gladde spiercellen, de belangrijkste producenten van collageen in de atherosclerotische plaque, niet aangedaan worden door de beenmergtransplantatieprocedure. Desalniettemin is er, ondanks de verhoogde schuimcelvorming als gevolg van beenmergspecifieke Arg1-deletie in LDLr KO muizen, geen sprake van een verhoogde atheroscleroseontwikkeling. Dit duidt op de mogelijkheid dat er een compenserend mechanisme in werking is getreden dat de effecten van de verhoogde schuimcelvorming tegengaat. Om deze mechanismen te kunnen verklaren hebben we de leukocytoprofielen in zowel het bloed als in de milt van de muizen onderzocht. Hieruit bleek dat beenmergspecifieke Arg1-deletie leidde tot een significante verlaging van het aantal monocyt en neutrofiële granulocyten in de milt. Aangezien 30% van het totaal aantal monocyt en in de atherosclerotische plaque vanuit de milt komen,³⁰ kan deze gevonden verlaging van het aantal monocyt en in de milt mogelijk een verklaring vormen voor het feit dat de ontwikkeling van atherosclerose niet is verhoogd in LDLr KO muizen met Arg1 deficiënt beenmerg ondanks de verhoogde schuimcelvorming. Samenvattend beïnvloedt Arg1 in beenmergaafgeleide cellen de schuimcelvorming door macrofagen, maar heeft het geen effect op de ontwikkeling van atherosclerose in LDLr KO muizen. Arg1 in beenmergaafgeleide cellen is daarom waarschijnlijk geen goed therapeutisch doelwit voor de behandeling van atherosclerose.

De repolarisatie van pro-inflammatoire M1 macrofagen naar minder inflammatoire M2 macrofagen wordt beschouwd als een veelbelovende strategie om atherosclerose te verminderen. Echter, het simpelweg veranderen van een van de specifieke M1-markergenen, zoals verlaging van Arg1, is een te simplistische benadering voor deze strategie. Men zal daarom op een meer holistische wijze het metabolisme van en het afweermechanisme in macrofagen moeten herprogrammeren om daadwerkelijk een effect op atherosclerose te kunnen bewerkstelligen.

Macrofagen vertegenwoordigen een groot spectrum van cellen die elk gekenmerkt worden door verschillende markers. De huidige M1/M2 classificatie van macrofagen is onvoldoende om het volledige spectrum van macrofaagfunctie en -activering weer te kunnen geven. Macrofagen kunnen *in vitro* door incubatie met LPS/IFN- γ gestimuleerd worden tot verandering in macrofagen met een M1 fenotype, terwijl incubatie met IL-4/IL-13 er juist voor zorgt dat macrofagen verandering in cellen met een M2 fenotype. In de atherosclerotische plaque *in vivo* is er echter een grote variëteit aan cytokinen en andere signaleringsmoleculen aanwezig, waardoor de aanwezige macrofagen mogelijk ook minder duidelijke fenotypen kunnen aannemen.^{31,32} In atherosclerotische plaques worden inderdaad veel macrofaagfenotypen gevonden waarin de expressie van de klassieke M1/M2 markers slechts beperkt of zelfs geheel niet aanwezig is.³³ Dit zorgt ervoor dat het gebruik van macrofaagfenotype-markergenen als diagnostisch hulpmiddel of therapeutische doelwit voor de behandeling van atherosclerose lastig is.

M1 en M2 macrofagen maken gebruik van verschillende signaleringspaden om hun effectorfunctie tot uiting te kunnen brengen.³⁴ Om op een meer holistische wijze het metabolisme van en het

afweermechanisme in macrofagen te reprogrammeren, kan het lonen om de strategie te richten op microRNA's aangezien deze veel biologische en metabole programma's op posttranscriptioneel niveau reguleren. In dit opzicht is het belangrijk om te melden dat recent is aangetoond dat remming van microRNA-33 macrofagen naar een M2 fenotype kan drijven en atherosclerose kan verminderen.³⁴ Dit proces lijkt gemedieerd te worden door de eiwitkinase AMPK. Eiwitkinases zijn essentieel voor stimulus-geïnduceerde cellulaire processen.³⁵ Macrofaagactivatie wordt, naast de AMPK-signaleringsroute, ook gereguleerd door de fosfoinositide-3-kinase/eiwit B (KI3K/Akt) en mitogen-geactiveerde eiwitkinase (MAPK) signaleringsroutes.³⁶⁻³⁸ Binnen de context van dit proefschrift hebben wij zowel de rol van Akt2 als lid van de KI3K/Akt-route, als de rol van het fosfatase MKP2 die de MAPK-route deactiveert, in de ontwikkeling van atherosclerose bestudeerd. Deze signaleringsroutes worden hieronder in meer detail beschreven.

6.2.4 Het belang van eiwitkinase-signaleringsroutes in macrofaagpolarisatie en atheroscleroseontwikkeling

Akt1 is een sterke regulator van macrofaagpolarisatie.³⁹⁻⁴¹ Akt2-deficiëntie in macrofagen leidt tot een sterker M2 macrofaag fenotype en beschermd tegen dieet-geïnduceerde atherosclerose in niet-diabetische LDLr KO muizen.^{42, 43} Naast het effect op macrofaagpolarisatie is Akt2 ook een belangrijke speler in de signaleringsroute van insuline. Wanneer Akt2 in het gehele lichaam afwezig is, resulteert dit in een verlaagde glucosetolerantie in muizen terwijl er weinig tot geen effect zichtbaar was op de ontwikkeling van atherosclerose.^{43, 44} Om de rol van macrofaag-specifiek Akt2 in atherosclerose onder glucoseintolerante condities beter te begrijpen, hebben wij in **hoofdstuk 3** glucoseintolerante Akt2/LDLr dKO muizen getransplanteerd met LDLr KO of Akt2/LDLr dKO beenmerg, om zodoende het effect van macrofaag-specifiek herstel van Akt2-expressie te kunnen bestuderen. De resultaten laten zien dat Akt2 in macrofagen geen significante bijdrage levert aan het type 2 diabetes fenotype, noch aan de ontwikkeling van atherosclerose in Akt2/LDLr dKO muizen. Eerdere studies hebben aangetoond dat macrofaag-specifieke Akt2-deficiëntie geassocieerd is met een verlaagde vatbaarheid voor macrofaag-schuimcelvorming.⁴³ Onze studie ondersteunt deze bevindingen, omdat in onze opzet het herstel van Akt2 expressie in macrofagen de schuimcelvorming van deze cellen juist verhoogde. In tegenstelling tot de eerdere bevindingen dat Akt2-deficiëntie leidt tot een M2 macrofaag fenotype, laten onze studies in de LDLr KO achtergrond zien dat Akt2 expressie in macrofagen leidde tot een M2 macrofaag fenotype. Samengevat laten wij in hoofdstuk 3 zien dat het herstel van Akt2 specifiek in macrofagen resulteerde in een sterke schuimcelvorming, maar het M2 macrofaag fenotype versterkt waardoor naar verwachting de macrofagen minder inflammatoir zijn. Gezamenlijk leidde dit uiteindelijk tot een onveranderde atheroscleroseontwikkeling in de getransplanteerde Akt2/LDLr dKO muizen. Naast de tegenhangende effecten van een verhoogde schuimcelvorming en verlaagde inflammatoire repons na Akt2-herstel, speelt de glucoseintolerante achtergrond van de muizen waarschijnlijk ook een rol in de onveranderde gevoeligheid voor de ontwikkeling atherosclerose in onze muizen. In dit kader is het belangrijk om te vermelden dat de macrofagen die wij in ons onderzoek hebben bestudeerd een LDLr-deficiënte achtergrond hadden, terwijl eerdere studies vaak op een wildtype achtergrond zijn uitgevoerd.^{42, 45, 46} Macrofaagactivering is het gevolg van een samenwerkende interactie tussen verschillende genproducten, in reactie op een extracellulaire signaleringsstimulus.⁴⁷ Genetische variatie, zoals een LDLr KO *versus* wildtype achtergrond, kan mogelijk de cellulaire signaleringsroutes beïnvloeden. De activatie van macrofagen in verschillende genetische achtergronden zou daarmee uiteindelijk kunnen leiden tot heel verschillende effecten op macrofaagfenotype en functie.⁴⁸ We speculeren daarom dat de aanwezigheid van de LDLr op macrofagen mogelijk belangrijke consequenties heeft voor de

polarisatie van macrofagen naar een M2 fenotype onder Akt2-deficiënte omstandigheden. Om deze hypothese te kunnen bevestigen is echter verder onderzoek nodig. Desalniettemin heeft onze studie, zoals beschreven in hoofdstuk 3 van dit proefschrift, de kennis over de rol van Akt2 in macrofaagpolarisatie en atherosclerose vergroot, en onderstreept deze de notie dat de genetische en metabole achtergrond van het muismodel dat wordt gebruikt de rol van Akt2 in atheroscleroseontwikkeling kan beïnvloeden.

MAPK fosfatases (MKP's) vertegenwoordigen een familie van minstens tien verschillende fosfatases die elk sterk gerelateerd zijn aan de MAPK's.⁴⁹ MKP's hebben elk een verschillende voorkeur voor specifieke MAPK's, die ze kunnen deactiveren via binding en daaropvolgende defosforylatie van de fosfoserine/treonine- en fosfotyrosine residuen.^{50,51} Elk MKP-familielid heeft een andere functie, wat deels veroorzaakt wordt door diens specifieke voorkeur voor het MAPK-substraat.⁴⁹ In dit kader is het interessant om te melden dat MKP2 betrokken is bij macrofaagpolarisatie⁵², en daarmee dus een potentieel therapeutisch doelwit is voor de behandeling van atherosclerose. **Hoofdstuk 4** richt zich daarom op het effect van MKP2 op macrofaagfunctie en atheroscleroseontwikkeling. We hebben laten zien dat MKP2-deficiëntie de activatie van het MAPK-familielid JNK verhoogt in thioglycollaat-opgewekte macrofagen. Daarnaast laten we zien dat macrofagen die geen MKP2 tot expressie brengen een M2-macrofaagfenotype laten zien en, in lijn daarmee, meer vatbaar zijn voor schuimcelvorming na blootstelling aan geoxideerd LDL. Om de rol van MKP2 in atheroscleroseontwikkeling verder te ontrafelen, hebben we MKP2-deficiënt beenmerg getransplanteerd naar LDLr KO muizen. Deze muizen lieten, na 9 weken een Westers dieet gevoerd te zijn, geen verandering zien in het distributieprofiel van cholesterol over de lipoproteïne-fracties in het bloed. In lijn met de *in vitro* aangetoonde versterkte M2-macrofaagpolarisatie, observeerden we minder M1 markers op peritoneale cellen in de macrofaag-specifieke MKP2-deficiënte muizen, en zagen we dat deze muizen meer anti-inflammatoire en juist minder pro-inflammatoire cytokinen produceerden. Echter, ondanks de verlaging in pro-atherogene cytokineproductie, zagen we dat transplantatie met MKP2-deficiënt beenmerg leidde tot een verhoogde atheroscleroseontwikkeling na 9 weken van Westerse dieetvoeding. Belangrijk om te vermelden is dat de hoeveelheid collageen in de plaques van dieren die met MKP2-deficiënt beenmerg getransplanteerd waren lager was dan in de plaques van de controledieren. Samengevat laten deze resultaten zien dat de anti-inflammatoire effecten van MKP2-deficiëntie uiteindelijk tenietgedaan werden door de verhoogde vatbaarheid voor schuimcelvorming van de MKP2-deficiënte macrofagen. Het is denkbaar dat de hoge cholesterolniveaus in het bloed van de macrofaagspecifieke MKP2-deficiënte LDLr KO muizen op een Westers dieet het effect van MKP2-deficiëntie op schuimcelvorming dusdanig vergroot heeft, dat de gunstige anti-inflammatoire effecten van MKP2 overstemd werden. In dit kader zou het interessant zijn om de huidige studie verder uit te breiden en de rol van MKP2 in atheroscleroseontwikkeling te bestuderen onder condities waarin de cholesterol-bloedspiegels actief verlaagd worden.

De eiwitkinase-superfamilie, alsmede de regulatoren van hun activiteit, zijn de meest intensief onderzochte geneesmiddel-doelwitten in het huidige farmacologische onderzoek. Op basis van een rapport uit 2014, bestaan er meer dan 3000 goedgekeurde en experimentele geneesmiddelen in klinische trials die gebaseerd zijn op kinases.⁵³ Hoewel de meerderheid van de klinische trials die gebruikmaken van kinase-gerichte geneesmiddelen zich richten op de behandeling van kanker, breid dit veld zich inmiddels ook uit naar de behandeling van ontstekingsziekten.⁵³ Er komt steeds meer bewijs dat laat zien dat de modulatie van de kinase-signaleringsroute op een effectieve en gunstige manier macrofaagpolarisatie kan beïnvloeden.⁵⁴⁻⁵⁹ Vanuit dit oogpunt wordt het gebruik

van kinase-gerichte middelen beschouwd als een potente strategie om nieuwe therapieën voor de behandeling van atherosclerose te ontwikkelen. In dit proefschrift laten wij inderdaad zien dat het moduleren van eiwitkinase-activiteit, bijvoorbeeld door het herstellen van de expressie van de kinase Akt2 (**hoofdstuk 3**) of het verstoren van expressie van de kinase-inactiverende fosfatase MKP2 (**hoofdstuk 4**), een effectieve manier is om macrofaagpolarisatie richting het M2-fenotype te drijven en om anti-inflammatoire effecten te bewerkstelligen. Beide studies laten echter zien dat de verhoogde M2-polarisatie ook leidde tot een verhoogde schuimcelvorming, waardoor de atheroscleroseontwikkeling uiteindelijk niet aangedaan of zelfs versterkt werd.

6.2.5 Het belang van upstream stimulatory factor 1 in atheroscleroseontwikkeling

Het belangrijkste kenmerk van atherosclerose is schuimcelvorming, een pathologisch proces waarvoor zowel macrofagen als lipiden onmisbaar zijn. In het eerste deel van dit proefschrift hebben we ons gericht op genen die betrokken zijn bij de polarisatie van macrofagen richting een M2 fenotype. In het tweede deel van dit proefschrift richten we ons op een gen dat betrokken is bij het lipidenmetabolisme. Patiënten die lijden aan zogeheten familiale gecombineerde hyperlipidemie (FCHL) hebben een hoog risico op het ontwikkelen van vroegtijdige coronaire vaatziekten.^{60, 61} FCHL wordt gekarakteriseerd door verhoogde LDL- en triglycerideniveaus die vaak gepaard gaan met een verlaging in HDL-niveaus.⁶⁰ Usf1 is een gen dat geassocieerd wordt met FCHL,⁶⁰ en dat een belangrijke rol lijkt te spelen in het lipidenmetabolisme en de ontwikkeling van atherosclerose.⁶² In **hoofdstuk 5**, hebben we daarom de macrofaag-specifieke rol van Usf1 in atherosclerose onderzocht. In deze studie hebben we laten zien dat beenmerg-specifieke Usf1-deficiëntie een ander fenotype liet zien in LDLr KO muizen dan Usf1 wordt uitgeschakeld in alle weefsels van het lichaam. Wanneer Usf1 in het gehele lichaam afwezig was, leidde dit tot een gunstig cardiometabool lipidenprofiel, wat gekenmerkt werd door een verlaging in de niveaus van 'slecht' VLDL-cholesterol en triglyceriden, terwijl het 'goede' HDL-cholesterolniveau juist verlaagd was. Echter, beenmerg-specifieke Usf1-deficiëntie leidde tot een verhoging in VLDL-cholesterolniveaus en een verhoogde gevoeligheid voor de ontwikkeling van atherosclerose. Dit effect kan waarschijnlijk toegeschreven worden aan een verlaagde VLDL-klaring door het witte vetweefsel. Op basis van onze eigen studies en eerdere studies uit de literatuur kan in het algemeen gesteld worden dat modulatie van Usf1 de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloed.⁶² Een interessante bevinding in onze studies is dat, in tegenstelling tot de pro-atherogene rol van algehele USf1 expressie⁶², beenmergspecifieke Usf1-expressie juist een beschermende rol heeft in het kader van atheroscleroseontwikkeling. Onze studie onderstreept dus een weefselafhankelijke rol van Usf1 in atherosclerose, waarmee rekening gehouden dient te worden bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen gericht op het remmen van Usf1-activiteit of de downregulatie van diens expressie om atherosclerose tegen te gaan.

6.2.6 Concluderende opmerkingen en toekomstperspectieven

In dit proefschrift is, middels het gebruik van knockout-muizen en de beenmergtransplantatietechniek, onderzocht welk effect de modulatie van genen betrokken bij macrofaagpolarisatie (**hoofdstuk 2-4**) en het lipidenmetabolisme (**hoofdstuk 5**) heeft op de pathogenese van atherosclerose. Naast de in dit proefschrift bestudeerde genen, zijn er vele andere moleculen die een rol spelen in macrofaagpolarisatie en het lipidenmetabolisme, en derhalve een mogelijk interessant doelwit zijn voor de behandeling van atherosclerose.

Macrofagen en de plasticiteit van het fenotype van de macrofagen zijn essentieel voor het onderhoud van homeostatische functies van weefsels. De doen ze door hun genexpressie patronen te veranderen in reactie op de lokale omgeving van het weefsel. Omdat de verschillende typen macrofagen elk op een verschillende manier bijdragen aan de ontwikkeling van atherosclerose, is het mogelijk om cel- of gengebaseerde therapieën te ontwikkelen waarmee macrofaagfenotypen gemoduleerd kunnen worden als behandeling tegen atherosclerose. Tot nu toe is de meeste bekende macrofaag-gerichte therapie de macrofaagtransplantatie die wordt gebruikt om een erfelijk longaandoening, pulmonaire alveolaire proteinose, te behandelen.^{63,64} Het idee om therapieën te ontwikkelen die specifiek gericht zijn op het moduleren van macrofaagfenotype, stamt uit het kankeronderzoeksveld, waar het ingezet werd voor de behandeling van tumoren.^{65,66} Echter, tot nu toe zijn alle klinische trials op dit gebied gefaald,⁶⁷⁻⁷⁴ voornamelijk omdat de voorbehandelde macrofagen na herhaalde blootstelling aan de micro-omgeving van de tumor hun anti-tumor M1-fenotype snel verliezen.⁷⁵⁻⁷⁷ Het is daarom van groot belang om uit te zoeken hoe het macrofaagfenotype 'vastgezet' kan worden *in vivo* zodat zij de micro-omgeving van de tumor kunnen moduleren, in plaats van dat deze de macrofagen moduleert.

Een alternatief hiervoor zijn therapieën die zich richten op het moduleren van macrofagen op het moleculaire niveau, zoals beschreven in dit proefschrift. Door de expressie van genen die betrokken zijn bij macrofaagpolarisatie te moduleren, kan het fenotype van de macrofaag ten gunste worden veranderd en 'vastgezet' worden. Zo worden macrofagen door uitschakeling van MKP2 veranderd van macrofagen met een M1-fenotype in cellen met een meer M2-fenotype. In aanvulling hierop laten LDLr KO muizen die MKP2-deficiënt beenmerg hebben ontvangen een meer anti-inflammatoir cytokinenprofiel in hun bloed zien. Deze bevinding suggereert dat genetische modulatie van het macrofaagfenotype en het 'vastzetten' van dit fenotype haalbaar is in muizen. Daarnaast hebben wij in dit proefschrift ook laten zien dat therapeutische strategieën gericht op het moduleren van eiwitkinase-activiteit ook een effectieve manier is om M2-macrofaagpolarisatie te bewerkstelligen en anti-inflammatoire effecten te induceren.

Een andere interessante strategie om genexpressie in monocyt en/of macrofagen te moduleren is door te interfereren in de epigenetische regulatie van deze genen. Epigenetische modificaties kunnen worden bewerkstelligd door DNA-methylatie, histonmodificatie, en door regulatie van niet-coderende RNA's. Deze modificaties zorgen ervoor dat de toegankelijkheid van het DNA en de chromatinestructuur verandert, waardoor genexpressiepatronen gewijzigd worden.⁷⁸⁻⁸³ In de literatuur zijn er steeds meer studies die laten zien dat epigenetische regulatie een belangrijke rol speelt in zowel macrofaagpolarisatie als atheroscleroseontwikkeling.⁸⁴⁻⁸⁸ Zo faciliteert Jmjd3, een histon 3 Lys27 (H3K27) demethylase, de expressie van IRF4, een belangrijke M2-stimulerende transcriptiefactor die M2-macrofaagpolarisatie reguleert zonder een effect te hebben op M1-macrofagen.^{89,90} Daarnaast hebben eerdere studies laten zien dat uitschakeling van histon deacetylase 3 (Hdac3) macrofagen richting een M2-fenotype drijft, een gunstig effect heeft op de verwerking van lipiden, en de stabiliteit van atherosclerotische plaques vergroot.⁹¹ Tot slot verlaagt behandeling met een DNA-methylatieremmer, 5-aza-2'-deoxycytidine, macrofaag ontstekingsprocessen en verlaagt het de ontwikkeling van atherosclerose in LDLr KO muizen.^{92,93} Interessant genoeg lijken epigenetische veranderingen ook transplanteerbaar te zijn. Van Kampen en collega's vonden dat beenmerg van muizen die gedurende lange tijd gevoed zijn met een Westers dieet een hypomethylatie van CpG-regionen lieten zien in de genen die coderen voor Pu.1 en IRF8.⁹⁴ Transplantatie van deze beenmergcellen naar LDLr KO muizen die gevoed werden met een controledieet dat laag in vet en cholesterol is, leidde tot een verhoging van de monocyt-

/macrofaagproliferatie en differentiatie en een verhoging van de atheroscleroseontwikkeling. Het ontrafelen van epigenetische veranderingen in macrofagen tijdens atheroscleroseontwikkeling, en van de epigenetische signaleringsroutes die de inflammatoire respons van macrofagen beïnvloeden, zal de toekomstige ontwikkeling van nieuwe therapieën in de strijd tegen atherosclerose sterk kunnen ondersteunen.⁷⁸

Vanuit het oogpunt van de ontstekingsreactie, lijkt het drijven van macrofaagpolarisatie richting het anti-inflammatoire M2-fenotype een gunstige strategie voor het afremmen van de atheroscleroseontwikkeling. Echter, M2-macrophagen versnellen de schuimcelvorming, waardoor de therapeutische waarde van M2-macrophagen sterkt afneemt wanneer er sprake is van hoge cholesterolniveaus in de circulatie. De versterkte schuimcelvorming heeft een pro-atherogene werking en kan zelfs het anti-inflammatoire, beschermende effect van M2-macrophagen tenietdoen (**hoofdstuk 3 en 4**). Het is daarom van groot belang dat nieuwe therapeutische strategieën gericht op het stimuleren van een M2-macrofaag fenotype gecombineerd worden met cholesterolverlagende medicijnen.

Sterke verlaging van het cholesterolniveau in het bloed is een waardevolle strategie voor het induceren van regressie van atherosclerotische plaques in muismodellen. In dit kader is in eerdere studies een constante verhoging van de M2-over-M1-ratio van macrofagen in de plaques onder regressie condities aangetoond.⁹⁵⁻⁹⁷ Het is belangrijk te vermelden dat een recente studie heeft laten zien dat de influx van gezonde macrofagen in de atherosclerotische plaque belangrijk is om uiteindelijk regressie van de plaque te kunnen induceren, waarschijnlijk omdat macrofagen nodig zijn voor het opruimen van de dode cellen en het necrotische weefsel in de kleiner wordende plaques.⁹⁸ Deze studie liet zien dat wanneer plaque-bevattende apoE KO aorta's naar muizen getransplanteerd werden die deficiënt waren voor de chemokinereceptor CCR2, er geen rekrutering van nieuwe macrofagen plaatsvindt in de reeds bestaande plaques en dat er geen regressie van atherosclerose bewerkstelligd kon worden. CCR2 is een chemokinereceptor die essentieel is voor de rekrutering van monocytten naar atherosclerotische plaques.⁹⁹ Gezien het feit dat de meerderheid van de patiënten die zich melden met HVZ klachten reeds vergevorderde atherosclerotische laesies heeft, is het belangrijk om te onderzoeken of de inductie van M2-macrofaagpolarisatie bovenop cholesterolverlaging regressie van atheroscleroseontwikkeling kan versterken of dat regressie hierdoor juist tegengegaan wordt.

Beenmergtransplantatie is een effectieve manier om genexpressie in macrofagen te moduleren, zoals ook in dit proefschrift beschreven is. Om deze reden is beenmergtransplantatie een zeer geschikt middel om te ontrafelen of en zo ja, via welke mechanismen, een gen van interesse de ontwikkeling van atherosclerose kan beïnvloeden. Op deze manier biedt de beenmergtransplantatietechniek ook essentiële informatie over potentiële 'drugable' macrofaagkandidaatgenen. In de kliniek is de techniek echter niet bruikbaar, omdat voor beenmergtransplantatie een myeloablatie, de vernietiging van endogeen beenmerg, benodigd is. Om in mensen alsnog de expressie van macrofaaggenen te kunnen moduleren, kunnen meerdere strategieën toegepast worden. Zo kan small interfering RNA (siRNA), short hairpin RNA (shRNA) en microRNA (miRNA) gebruikt worden om de genexpressie teniet te doen,¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ terwijl lentivirale en plasmavectoren juist gebruikt kunnen worden om een gen van interesse tot overexpressie te brengen.^{105, 106} Naast het gebruik van genetische methoden om op directe wijze de expressie van genen te moduleren, kan men ook farmacologische remmers en (ant)agonisten van het gen specifiek afleveren aan macrofagen middels het gebruik van macrofaagreceptor-gebaseerde of ligand-geankerde micro- of nanodeeltjes.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Zo heeft een eerdere studie laten zien dat

behandeling van ApoE KO muizen met nanodeeltjes geladen met pioglitazon, een potente activator van PPAR- γ , monocyt-/macrofaagpolarisatie succesvol naar een anti-inflammatoir fenotype kan drijven.¹¹⁰ Daarnaast is het gebruik van nanodeeltjes geladen met contrastvloeistof, in combinatie met de visualisatietechnieken CT en MRI, een succesvolle methode gebleken om atherosclerotische laesies *in vivo* te visualiseren en te karakteriseren, wat een belangrijke basis biedt voor verdere klinische behandelstrategieën.¹⁰⁹ Samengevat bieden deze verschillende technieken de mogelijkheid om te interfereren in specifieke genexpressiepatronen en signaleringsroutes en macrofaagfuncties te moduleren, en bieden als zodanig een basis voor toekomstige klinische behandelstrategieën.

Tot slot, macrofaagheterogeniteit is niet alleen essentieel voor atherosclerose, maar ook voor veel andere ziekten die een sterke ontstekings component kennen, zoals kanker, de ziekte van Parkinson, obesitas, diabetes en arthritis.¹¹¹⁻¹¹⁷ De ontwikkeling van macrofaag-gerichte therapieën biedt dus niet alleen nieuwe behandelmogelijkheden op het gebied van hart- en vaatziekten, maar zal ten gunste komen aan een grote variëteit van ontstekings-gebaseerde aandoeningen.

Concluderend kan gesteld worden dat modulatie van macrofaagpolarisatie, in combinatie met cholesterolverlaging, een veelbelovende strategie is voor de behandeling van atherosclerose. Vervolgonderzoek dient aan te wijzen of macrofaagpolarisatie-gerichte therapieën inderdaad een effectieve benadering voor de behandeling van atherosclerose zijn, en of zij de beoogde verlaging in cardiovasculair risico kunnen bewerkstelligen.

References

1. Organization WH. Cardiovascular diseases (cvds). 2013. *Fact Sheet*. 2016
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143
3. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P, American Heart Association Statistics C, Stroke Statistics S. Heart disease and stroke statistics-2017 update: A report from the american heart association. *Circulation*. 2017;135:e146-e603
4. Kones R. Is prevention a fantasy, or the future of medicine? A panoramic view of recent data, status, and direction in cardiovascular prevention. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2011;5:61-81
5. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The scandinavian simvastatin survival study (4s). *Lancet*. 1994;344:1383-1389
6. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of scotland coronary prevention study group. *N Engl J Med*. 1995;333:1301-1307
7. Ridker PM, Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of c-reactive protein across the full range of framingham risk scores. *Circulation*. 2004;109:1955-1959
8. Lusis MJ, Mar R, Pajukanta I. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genom Hum G*. 2004;5:189-218
9. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7:40-53
10. Stoger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E, de Winther MP. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225:461-468
11. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*. 2010;5:e8852
12. de Gaetano M, Crean D, Barry M, Belton O. M1- and m2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis. *Front Immunol*. 2016;7:275
13. Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 1994;308:89-95
14. Bittery LDK, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield N, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Laboratory Investigation*. 1996;75:77-85
15. Lowenstein CJ. Beneficial effects of neuronal nitric oxide synthase in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1417-1418
16. Medbury HJ, James V, Ngo J, Hitos K, Wang Y, Harris DC, Fletcher JP. Differing association of macrophage subsets with atherosclerotic plaque stability. *Int Angiol*. 2013;32:74-84
17. Peled M, Fisher EA. Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression. *Front Immunol*. 2014;5:579
18. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85:e17-24
19. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res*. 2001;89:930-934
20. Peterkofsky B, Udenfriend S. Conversion of proline to collagen hydroxyproline in a cell-free system from chick embryo. *J Biol Chem*. 1963;238:3966-3977

21. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/m-2 macrophages and the th1/th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164:6166-6173
22. Kuhlencordt PJ, Gyrko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 2001;104:448-454
23. Hayashi T, Sumi D, Juliet PAR, Matsui-Hirai H, Asai-Tanaka Y, Kano H, Fukatsu A, Tsunekawa T, Miyazaki A, Iguchi A, Ignarro LJ. Gene transfer of endothelial no synthase, but not enos plus inducible nos, regressed atherosclerosis in rabbits. *Cardiovascular Research.* 2004;61:339-351
24. Mujynya-Ludunge K, Viswambharan H, Driscoll R, Ming XF, von Segesser LK, Kappenberger L, Yang ZH, Vassalli G. Endothelial nitric oxide synthase gene transfer restores endothelium-dependent relaxations and attenuates lesion formation in carotid arteries in apolipoprotein e-deficient mice. *Basic Research in Cardiology.* 2005;100:102-111
25. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoe-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2002;110:331-340
26. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Chun S, Fletcher D, Card DJ, Lisnock J, Weikel R, Bergstrom JD, Shevell DE, Hermanowski-Vosatka A, Sparrow CP, Chao YS, Rader DJ, Wright SD, Pure E. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Journal of Immunology.* 2000;165:3430-3435
27. Kuhlencordt PJ, Chen JQ, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein e-knockout mice. *Circulation.* 2001;103:3099-3104
28. van Tits LJ, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten LA, Stalenhoef AF. Oxidized ldl enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated m2 macrophages: A crucial role for kruppel-like factor 2. *Atherosclerosis.* 2011;214:345-349
29. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by b cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest.* 2002;109:745-753
30. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbato R, Etzrodt M, Weber GF, Ueno T, van Rooijen N, Mulligan-Kehoe MJ, Libby P, Nahrendorf M, Pittet MJ, Weissleder R, Swirski FK. Extramedullary hematopoiesis generates ly-6c(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2012;125:364-U415
31. Martinez FO, Gordon S. The m1 and m2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13
32. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958-969
33. Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, Ruiz-Rosado Jde D, Popovich PG, Partida-Sanchez S, Guerau-de-Arellano M. Novel markers to delineate murine m1 and m2 macrophages. *PLoS One.* 2015;10:e0145342
34. Ouimet M, Ediriweera HN, Gundra UM, Sheedy FJ, Ramkhalawon B, Hutchison SB, Rinehold K, van Solingen C, Fullerton MD, Cecchini K, Rayner KJ, Steinberg GR, Zamore PD, Fisher EA, Loke P, Moore KJ. MicroRNA-33-dependent regulation of macrophage metabolism directs immune cell polarization in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2015;125:4334-4348
35. Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O. Pi3k/akt, mapk and ampk signalling: Protein kinases in glucose homeostasis. *Expert Rev Mol Med.* 2012;14:e1
36. Rao KM. Map kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001;69:3-10
37. Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C. Akt signaling pathway in macrophage activation and m1/m2 polarization. *J Immunol.* 2017;198:1006-1014
38. Luyendyk JP, Schabbauer GA, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, Mackman N. Genetic analysis of the role of the pi3k-akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages. *J Immunol.* 2008;180:4218-4226

39. George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA, Murgatroyd PR, Williams RM, Acerini CL, Dunger DB, Barford D, Umpleby AM, Wareham NJ, Davies HA, Schafer AJ, Stoffel M, O'Rahilly S, Barroso I. A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in akt2. *Science*. 2004;304:1325-1328
40. Frankish H. Akt2-deficient mice show symptoms of type 2 diabetes. *Lancet*. 2001;357:1771-1771
41. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking akt2/pkb beta. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112:197-208
42. Babaev VR, Hebron KE, Wiese CB, Toth CL, Ding L, Zhang YM, May JM, Fazio S, Vickers KC, Linton MF. Macrophage deficiency of akt2 reduces atherosclerosis in ldlr null mice. *Journal of Lipid Research*. 2014;55:2296-2308
43. Rotllan N, Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Wanschel AC, Aryal B, Aranda JF, Goedeke L, Salerno AG, Ramirez CM, Sessa WC, Suarez Y, Fernandez-Hernando C. Hematopoietic akt2 deficiency attenuates the progression of atherosclerosis. *Faseb Journal*. 2015;29:597-610
44. Rensing KL, de Jager SC, Stroes ES, Vos M, Twickler MT, Dallinga-Thie GM, de Vries CJ, Kuiper J, Bot I, von der Thüsen JH. Akt2/ldlr double knockout mice display impaired glucose tolerance and develop more complex atherosclerotic plaques than ldlr knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2014;101:277-287
45. Vergadi E, Vaporidi K, Theodorakis EE, Doxaki C, Lagoudaki E, Ieronymaki E, Alexaki VI, Helms M, Kondili E, Soennichsen B, Stathopoulos EN, Margioris AN, Georgopoulos D, Tsatsanis C. Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and mir-146a induction in mice. *J Immunol*. 2014;192:394-406
46. Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martinez de la Torre Y, Vaporidi K, Lagoudaki ED, Ieronymaki E, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN, Stathopoulos EN, Tschlis PN, Tsatsanis C. Akt1 and akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:9517-9522
47. Romanoski CE, Link VM, Heinz S, Glass CK. Exploiting genomics and natural genetic variation to decode macrophage enhancers. *Trends Immunol*. 2015;36:507-518
48. Kammenga JE. The background puzzle: How identical mutations in the same gene lead to different disease symptoms. *The FEBS Journal*. 2017
49. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity map kinase phosphatases (mkps): Shaping the outcome of map kinase signalling. *FEBS J*. 2013;280:489-504
50. Lang R, Hammer M, Mages J. Dusp meet immunology: Dual specificity mapk phosphatases in control of the inflammatory response. *Journal of Immunology*. 2006;177:7497-7504
51. Sim J, Yi K, Kim H, Ahn H, Chung Y, Rehman A, Jang SM, Lee KH, Jang K, Paik SS. Immunohistochemical expression of dual-specificity protein phosphatase 4 in patients with colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:283764
52. Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-Refah A, Matarese F, Cheng SC, Ratter J, Berentsen K, van der Ent MA, Sharifi N, Janssen-Megens EM, Ter Huurne M, Mandoli A, van Schaik T, Ng A, Burden F, Downes K, Frontini M, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ouwehand WH, van der Meer JW, Joosten LA, Wijmenga C, Martens JH, Xavier RJ, Logie C, Netea MG, Stunnenberg HG. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. 2014;345:1251086
53. Rask-Andersen M, Zhang J, Fabbro D, Schioth HB. Advances in kinase targeting: Current clinical use and clinical trials. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2014;35:60-76
54. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *Journal of Immunology*. 2008;181:8633-8641
55. Li C, Ding XY, Xiang DM, Xu J, Huang XL, Hou FF, Zhou QG. Enhanced m1 and impaired m2 macrophage polarization and reduced mitochondrial biogenesis via inhibition of amp kinase in chronic kidney disease. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36:358-372

56. Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem*. 2002;277:32124-32132
57. Jimenez-Garcia L, Herranz S, Luque A, Hortelano S. Critical role of p38 mapk in il-4-induced alternative activation of peritoneal macrophages. *Eur J Immunol*. 2015;45:273-286
58. Ding LX, Gu HJ, Gao XM, Xiong SD, Zheng B. Aurora kinase a regulates m1 macrophage polarization and plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Inflammation*. 2015;38:800-811
59. Cudejko C, Wouters K, Fuentes L, Hannou SA, Paquet C, Bantubungi K, Bouchaert E, Vanhoutte J, Fleury S, Remy P, Tailleux A, Chinetti-Gbaguidi G, Dombrowicz D, Staels B, Paumelle R. P16(ink4a) deficiency promotes il-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood*. 2011;118:2556-2566
60. Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (usf1). *Nat Genet*. 2004;36:371-376
61. Coon H, Xin Y, Hopkins PN, Cawthon RM, Hasstedt SJ, Hunt SC. Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, ldl cholesterol, and triglycerides. *Hum Genet*. 2005;117:444-451
62. Laurila PP, Soronen J, Kooijman S, Forsstrom S, Boon MR, Surakka I, Kaiharju E, Coomans CP, Van Den Berg SA, Autio A, Sarin AP, Kettunen J, Tikkanen E, Manninen T, Metso J, Silvennoinen R, Merikanto K, Ruuth M, Perttila J, Makela A, Isomi A, Tuomainen AM, Tikka A, Ramadan UA, Seppala I, Lehtimaki T, Eriksson J, Havulinna A, Jula A, Karhunen PJ, Salomaa V, Perola M, Ehnholm C, Lee-Rueckert M, Van Eck M, Roivainen A, Taskinen MR, Peltonen L, Mervaala E, Jalanko A, Hohtola E, Olkkonen VM, Ripatti S, Kovanen PT, Rensen PC, Suomalainen A, Jauhiainen M. Usf1 deficiency activates brown adipose tissue and improves cardiometabolic health. *Sci Transl Med*. 2016;8:323ra313
63. Happel C, Lachmann N, Skuljec J, Wetzke M, Ackermann M, Brenning S, Mucci A, Jirmo AC, Groos S, Mirenska A, Hennig C, Rodt T, Bankstahl JP, Schwert N, Moritz T, Hansen G. Pulmonary transplantation of macrophage progenitors as effective and long-lasting therapy for hereditary pulmonary alveolar proteinosis. *Science Translational Medicine*. 2014;6
64. Suzuki T, Arumugam P, Sakagami T, Lachmann N, Chalk C, Salles A, Abe S, Trapnell C, Carey B, Moritz T, Malik P, Lutzko C, Wood RE, Trapnell BC. Pulmonary macrophage transplantation therapy. *Nature*. 2014;514:450-+
65. Lee S, Kivimae S, Dolor A, Szoka FC. Macrophage-based cell therapies: The long and winding road. *J Control Release*. 2016;240:527-540
66. Fidler IJ. Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages. *Cancer Res*. 1974;34:1074-1078
67. Andreesen R, Scheibenbogen C, Brugger W, Krause S, Meerpohl HG, Leser HG, Engler H, Lohr GW. Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: A new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 1990;50:7450-7456
68. Hennemann B, Scheibenbogen C, Schumichen C, Andreesen R. Intrahepatic adoptive immunotherapy with autologous tumorcytotoxic macrophages in patients with cancer. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1995;18:19-27
69. Faradji A, Bohbot A, Frost H, Schmitt-Goguel M, Siffert JC, Dufour P, Eber M, Lallot C, Wiesel ML, Bergerat JP, et al. Phase i study of liposomal mtp-pe-activated autologous monocytes administered intraperitoneally to patients with peritoneal carcinomatosis. *J Clin Oncol*. 1991;9:1251-1260
70. Burger M, Thiounn N, Denzinger S, Kondas J, Benoit G, Chapado MS, Jimenez-Cruz FJ, Kisbenedek L, Szabo Z, Zsolt D, Grimm MO, Romics I, Thuroff JW, Kiss T, Tombal B, Wirth M, Munsell M, Mills B, Koh T, Sherman J. The application of adjuvant autologous intravesical macrophage cell therapy vs. Bcg in non-muscle invasive bladder cancer: A multicenter, randomized trial. *J Transl Med*. 2010;8:54
71. Eymard JC, Lopez M, Cattani A, Bouche O, Adjizian JC, Bernard J. Phase i/ii trial of autologous activated macrophages in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1996;32A:1905-1911

72. Hennemann B, Beckmann G, Eichelmann A, Rehm A, Andreesen R. Phase i trial of adoptive immunotherapy of cancer patients using monocyte-derived macrophages activated with interferon gamma and lipopolysaccharide. *Cancer Immunol Immun.* 1998;45:250-256
73. Lesimple T, Moisan A, Guille F, Leberre C, Audran R, Drenou B, Toujas L. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with activated autologous macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunother.* 2000;23:675-679
74. Baron-Bodo W, Doceur P, Lefebvre ML, Labroquere K, Defaye C, Cambouris C, Prigent D, Salcedo M, Boyer A, Nardin A. Anti-tumor properties of human-activated macrophages produced in large scale for clinical application. *Immunobiology.* 2005;210:267-277
75. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 2012;33:119-126
76. Squadrito ML, De Palma M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *Mol Aspects Med.* 2011;32:123-145
77. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology.* 2008;8:958-969
78. Hoeksema MA, de Winther MP. Epigenetic regulation of monocyte and macrophage function. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25:758-774
79. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, Zhang X, Wang L, Issner R, Coyne M, Ku M, Durham T, Kellis M, Bernstein BE. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature.* 2011;473:43-49
80. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet.* 2010;11:285-296
81. Mattick JS. Rna driving the epigenetic bus. *EMBO J.* 2012;31:515-516
82. Mattick JS, Taft RJ, Faulkner GJ. A global view of genomic information--moving beyond the gene and the master regulator. *Trends Genet.* 2010;26:21-28
83. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet.* 2011;12:7-18
84. Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: The link between nature and nurture. *Mol Aspects Med.* 2013;34:753-764
85. Muka T, Koromani F, Portilla E, O'Connor A, Bramer WM, Troup J, Chowdhury R, Dehghan A, Franco OH. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: A systematic review. *Int J Cardiol.* 2016;212:174-183
86. Grimaldi V, Vietri MT, Schiano C, Picascia A, De Pascale MR, Fiorito C, Casamassimi A, Napoli C. Epigenetic reprogramming in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2015;17:476
87. Hai Z, Zuo W. Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2016;456:69-74
88. Takeuch O, Akira S. Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur J Immunol.* 2011;41:2490-2493
89. Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. The jmjd3-irf4 axis regulates m2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol.* 2010;11:936-944
90. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol.* 2013;34:216-223
91. Hoeksema MA, Gijbels MJJ, Van den Bossche J, van der Velden S, Sijm A, Neele AE, Seijkens T, Stoger JL, Meiler S, Boshuizen MCS, Dallinga-Thie GM, Levels JHM, Boon L, Mullican SE, Spann NJ, Cleutjens JP, Glass CK, Lazar MA, de Vries CJM, Biessen EAL, Daemen MJAP, Lutgens E, de Winther MPJ. Targeting macrophage histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions. *Embo Mol Med.* 2014;6:1124-1132
92. Van den Bossche J, Neele AE, Hoeksema MA, de Heij F, Boshuizen MCS, van der Velden S, de Boer VC, Reedquist KA, de Winther MPJ. Inhibiting epigenetic enzymes to improve atherogenic macrophage functions. *Biochem Bioph Res Co.* 2014;455:396-402

93. Harada T, Ohguchi H, Grondin Y, Kikuchi S, Sagawa M, Tai YT, Mazitschek R, Hideshima T, Anderson KC. Hdac3 regulates dnmt1 expression in multiple myeloma: Therapeutic implications. *Leukemia*. 2017
94. van Kampen E, Jaminon A, van Berkel TJ, Van Eck M. Diet-induced (epigenetic) changes in bone marrow augment atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. 2014;96:833-841
95. Feig JE, Parathath S, Rong JX, Mick SL, Vengrenyuk Y, Grauer L, Young SG, Fisher EA. Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2011;123:989-U141
96. Feig JE, Rong JX, Shamir R, Sanson M, Vengrenyuk Y, Liu JH, Rayner K, Moore K, Garabedian M, Fisher EA. Hdl promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *P Natl Acad Sci USA*. 2011;108:7166-7171
97. Trogan E, Feig JE, Dogan S, Rothblat GH, Angeli V, Tacke F, Randolph GJ, Fisher EA. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor ccr7 during atherosclerosis regression in apoe-deficient mice. *P Natl Acad Sci USA*. 2006;103:3781-3786
98. K. Rahman YVealip. *JCI in press*. 2017
99. Guo J, Van Eck M, Twisk J, Maeda N, Benson GM, Groot PHE, Van Berkel TJC. Transplantation of monocyte cc-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into apoe3-leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscl Throm Vas*. 2003;23:447-453
100. Graff JW, Dickson AM, Clay G, McCaffrey AP, Wilson ME. Identifying functional micrnas in macrophages with polarized phenotypes. *J Biol Chem*. 2012;287:21816-21825
101. Kim SS, Ye CT, Kumar P, Chiu I, Subramanya S, Wu HQ, Shankar P, Manjunath N. Targeted delivery of sirna to macrophages for anti-inflammatory treatment. *Molecular Therapy*. 2010;18:993-1001
102. Aouadi M, Tesz GJ, Nicoloso SM, Wang M, Chouinard M, Soto E, Ostroff GR, Czech MP. Orally delivered sirna targeting macrophage map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature*. 2009;458:1180-1184
103. Pushparaj PN, Aarthi JJ, Manikandan J, Kumar SD. Sirna, mirna, and shrna: In vivo applications. *J Dent Res*. 2008;87:992-1003
104. Troegeler A, Lastrucci C, Duval C, Tanne A, Cougoule C, Maridonneau-Parini I, Neyrolles O, Lugo-Villarino G. An efficient sirna-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Immunol Cell Biol*. 2014;92:699-708
105. Zhao W, Lei T, Li H, Sun D, Mo X, Wang Z, Zhang K, Ou H. Macrophage-specific overexpression of interleukin-5 attenuates atherosclerosis in ldl receptor-deficient mice. *Gene Ther*. 2015;22:645-652
106. Tran TH, Rastogi R, Shelke J, Amiji MM. Modulation of macrophage functional polarity towards anti-inflammatory phenotype with plasmid DNA delivery in cd44 targeting hyaluronic acid nanoparticles. *Sci Rep*. 2015;5:16632
107. Tiwari S, Chaturvedi AP, Tripathi YB, Mishra B. Macrophage-specific targeting of isoniazid through mannosylated gelatin microspheres. *Aaps Pharmscitech*. 2011;12:900-908
108. Brandhonneur N, Chevanne F, Vie V, Frisch B, Primault R, Le Potier MF, Le Corre P. Specific and non-specific phagocytosis of ligand-grafted plga microspheres by macrophages. *Eur J Pharm Sci*. 2009;36:474-485
109. Matoba T, Egashira K. Nanoparticle-mediated drug delivery system for cardiovascular disease. *Int Heart J*. 2014;55:281-286
110. Matoba T, Koga JI, Nakano K, Egashira K, Tsutsui H. Nanoparticle-mediated drug delivery system for atherosclerotic cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2017
111. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: Weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol*. 2014;5
112. Panni RZ, Linehan DC, DeNardo DG. Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. *Immunotherapy-Uk*. 2013;5:1075-1087
113. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12:472-485

114. Moreira AP, Hogaboam CM. Macrophages in allergic asthma: Fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *J Interf Cytok Res.* 2011;31:485-491
115. Vogel DYS, Vereyken EIJ, Glim JE, Heijnen PDAM, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horssen J, Dijkstra CD. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflamm.* 2013;10
116. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation.* 2007;117:175-184
117. Brynskikh AM, Zhao YL, Mosley RL, Li S, Boska MD, Klyachko NL, Kabanov AV, Gendelman HE, Batrakova EV. Macrophage delivery of therapeutic nanozymes in a murine model of parkinson's disease. *Nanomedicine-Uk.* 2010;5:379-396