Universiteit
Leiden
The Netherlands

CD8+ T-cells in Atherosclerosis: mechanistic studies revealing a protective role in the plaque microenvironment

Duijn, J. van

Citation
Duijn, J. van. (2020, April 28). *CD8+ T-cells in Atherosclerosis: mechanistic studies revealing a protective role in the plaque microenvironment*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/136335

Version:	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/1887/136335

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

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle http://hdl.handle.net/1887/136335 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Duijn, J. van
Title: CD8+ T-cells in Atherosclerosis: mechanistic studies revealing a protective role in the plaque microenvironment
Issue Date: 2020-04-28

9

Nederlandse Samenvatting

1. Inleiding

1.1. Atherosclerose wordt gekenmerkt door de ophoping van vetten en een chronische ontstekingsreactie in de vaatwand

"Hart- en vaatziektenïs een brede term die alle aandoeningen van het hart en het vaatsysteem omvat, zoals hartinfarcten en beroertes. Hart- en vaatziekten vormen een belangrijk probleem voor de samenleving, aangezien 31% van alle sterftegevallen wereldwijd aan deze aandoeningen te wijten valt [1]. De belangrijkste risicofactoren voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten zijn een hoog cholesterolgehalte in het bloed, een hoge bloeddruk, roken, diabetes, obesitas en een weinig actieve levensstijl [2]. Daarnaast verhogen erfelijke aandoeningen zoals familiaire hypercholesterolemie en onderliggende auto-immuunziekten zoals reuma het risico [3].

Het belangrijkste onderliggende ziekteproces dat hart- en vaatziekten veroorzaakt is atherosclerose, ook wel slagaderverkalking genoemd. Atherosclerose is een chronische ontstekingsziekte die vooral de middelgrote en grote arteriën aantast. Het ziekteproces begint al tijdens de kinderjaren en langzaam maar zeker bouwen zich over tientallen jaren vettige plaques op in de vaatwand [4]. Dit proces begint op plaatsen in de bloedvaten waar het endotheel, de binnenste laag cellen van de bloedvaten, disfunctioneel wordt door een verstoring van de bloedstroming. Hierdoor wordt het endotheel meer permeabel, en kunnen de "slechte"lage-dichtheid lipoproteïnen (LDL), die cholesterol in het bloed vervoeren, zich gaan ophopen in de vaatwand [5]. Deze ophoping initieert een ontstekingsreactie, waarbij er moleculen op het endotheel tot expressie komen die immuuncellen rekruteren naar de plek van de vetophoping [6]. Onder de gerekruteerde immuuncellen zijn macrofagen, een celtype dat is gespecialiseerd in het opruimen van dode celresten, en ook LDL-deeltjes kan opnemen. In het geval van atherosclerose raken de macrofagen overladen met LDL-deeltjes, wat resulteert in de vorming van schuimschellen. Deze cellen hebben zoveel vetten opgenomen dat ze er 'schuimachtig' uitzien als ze met de microscoop worden bekeken. Schuimcellen kunnen niet meer weggeraken uit de plaques en hierdoor ontstaat een lokale ophoping van vetten en immuuncellen [7]. De schuimcellen produceren ook inflammatoire cytokines, signaalstoffen die het immuunsysteem verder stimuleren [8]. Nadat een bepaalde toxische drempel aan vetopname is overschreden, wordt celdood geïnduceerd via apoptose (een gereguleerd, niet-inflammatoir proces) of via necrose (een verstorend, pro-inflammatoir proces). Dit kan leiden tot het vrijgeven van gevaarsignalen die het ontstekingsproces nog verder versterken [9].

Naast macrofagen worden ook dendritische cellen (DCs) gerekruteerd naar de plaques. Dit celtype is normaliter betrokken bij het opnemen van bacteriën of virussen in het geval van een infectie. Vervolgens worden deze ziekteverwekkers afgebroken en kleine stukjes van de eiwitten die daaruit vrijkomen worden gepresenteerd op zogenaamde 'major histocompatibility complex' (MHC) moleculen. Dit proces wordt antigeenpresentatie genoemd, en resulteert in de activatie van het adaptieve immuunsysteem. Het adaptieve immuunsysteem wordt gestimuleerd door de DCs om specifiek de ziekteverwekkers aan te vallen via de herkenning van deze antigenen. In het geval van

atherosclerose worden de DCs geactiveerd door de gevaarsignalen die aanwezig zijn in de plaque en kunnen deze cellen dode celresten of LDL-deeltjes opnemen. Vervolgens migreren de DCs door het lymfesysteem naar de lymfeknopen, waar ze antigenen uit het opgenomen materiaal kunnen presenteren aan de cellen van het adaptieve immuunsysteem, de T- en B-cellen [10].

Bovenop de activatie van het adaptieve immuunsysteem, worden ook de gladde spiercellen in de vaatwand geactiveerd door de ontstekingsreactie. Deze cellen vormen vervolgens een fibreuze laag bovenop de plaque, die zorgt voor stabiliteit [11]. Atherosclerotische plaques kunnen voor lange tijd asymptomatisch blijven, maar uiteindelijk kan de progressieve groei van deze plaques leiden tot complicaties. Doordat de plaques een gedeelte van het bloedvat afsluiten, kan de bloedstroming afnemen, wat kan leiden tot een tekort aan zuurstoftoevoer naar bepaalde weefsels (hypoxie). Verminderde zuurstoftoevoer naar het hart kan leiden tot pijn op de borst (angina pectoris) [12]. Daarnaast kan de fibreuze laag van gladde spiercellen op de plaque dunner worden door de voortgaande ontstekingsreacties, en uiteindelijk scheuren. Dit leidt tot de vorming van een bloedprop, ook wel trombus genoemd, die ofwel lokaal de bloedstroming kan verstoren, ofwel zich met de bloedstroom kan verplaatsen en op andere locaties kan leiden tot problemen. Als een trombus de kransslagaders die het hart van zuurstof voorzien blokkeert, is er sprake van een hartinfarct [13]. Een blokkering van de bloedvaten in de hersenen kan leiden tot een herseninfarct [14].

1.2. Behandeling van atherosclerose

Bij patiënten met acute klinische symptomen zijn chirurgische ingrepen nodig. De vaatwand kan verwijd worden door middel van ballon-angioplastie, waarbij een ballonnetje wordt opgeblazen binnen het verstopte bloedvat, om de bloedstroming te herstellen. Deze ingreep wordt vaak gecombineerd met het plaatsten van een metalen buisje (stent) in het bloedvat, die het teruggroeien van de plaque verhindert [15]. Een alternatief is een bypassoperatie, waarbij een omleiding voor de verstopte slagader wordt gevormd door de transplantatie van een gezonde ader ter hoogte van de verstopte kransslagader van het hart of slagader in het been [16]. Tot slot is endarterectomie ook een optie, waarbij het aangetaste bloedvat wordt geopend en de plaque chirurgisch wordt verwijderd [17].

Naast deze acute ingrepen, ligt de nadruk van de behandeling van atherosclerose vooral op het aanpakken van de risicofactoren, zoals het advies geven over een gezonder dieet en een actievere levensstijl. Daarnaast richten de beschikbare medicijnen zich op het verlagen van het cholesterolgehalte in het bloed. De meest voorgeschreven medicijnen zijn statines, die de aanmaak van cholesterol remmen en de opname van cholesterol uit het bloed verhogen, en op die manier het aantal LDL-deeltjes in het bloed verminderen [18]. Hoewel het behandelen met statines resulteert in een 30% verlaging van het risico op een cardiovasculaire gebeurtenis (zoals een hartaanval) [19], is er een grote behoefte aan nieuwe medicijnen om dit risico verder te verlagen. Zo wordt onder andere onderzoek gedaan naar medicijnen die aangrijpen op het immuunsysteem. Een grote klinische studie (de CANTOS trial) heeft het effect van een antilichaam bestudeerd

dat de functie van het pro-inflammatoire cytokine IL-1β blokkeert. De resultaten laten zien dat remmen van het immuunsysteem, in combinatie met het gebruik van cholesterolverlagende middelen, het risico op hart- en vaatziekten verder kan verlagen [20]. Helaas had de algemene remming van het immuunsysteem in deze studie ook tot bijwerking dat meer patiënten overleden aan opportunistische infecties. Het remmen van het immuunsysteem voor de behandeling van atherosclerose is dus zeker veelbelovend, maar het is van belang om zulke ernstige bijwerkingen te voorkomen door specifiekere therapieën te ontwikkelen die uitsluitend het ziekteproces aanpakken.

1.3. De rol van T-cellen in atherosclerose

T-cellen zijn een interessant celtype om te bestuderen als een mogelijk aangrijpingspunt voor een nieuwe behandeling van atherosclerose, aangezien deze cellen in een doelgerichte en antigeen-specifieke manier hun effecten uitoefenen. Zoals hierboven beschreven, worden T-cellen geactiveerd door DCs, die antigenen presenteren in de lymfe klieren. DCs presenteren deze antigenen op hun celoppervlak, ingekapseld in MHC-moleculen, die binden aan de T-celreceptoren (TCR) op het oppervlak van T-cellen. Dit induceert een activerend signaal. Daarnaast geven de DCs ook costimulatoire signalen door aan de T-cellen en scheiden ze cytokines uit, die de T-cellen specifiek instrueren hoe ze zij zich vervolgens moeten ontwikkelen. Vervolgens ondergaan de T-cellen klonale expansie, wat resulteert in een grote verzameling cellen die hetzelfde antigeen kunnen herkennen. Zowel helper T-cellen, die gekenmerkt worden door expressie van CD4, als cytotoxische T-cellen, die gekenmerkt worden door expressie van CD8, zijn aanwezig in humane atherosclerotische plaques [21]. Er is al veel onderzoek gedaan naar de rol van $CD4^+$ T-cellen in het ziekteproces. Zo is bekend dat de zogenaamde T-helper 1 (Th1)-cellen bijdragen aan het onstekingsproces door de productie van inflammatoire cytokines zoals interferon γ (IFN-γ) en tumor necrose factor α (TNF-α) en daardoor de ontwikkeling van atherosclerose versterken [22, 23]. Er is veel minder bekend over de rol van $CD8^+$ T-cellen in deze ziekte. $CD8^+$ T-cellen zijn ook wel bekend als "killer"T-cellen, omdat ze celdood kunnen induceren in andere, voornamelijk virus-geïnfecteerde cellen. Dit gebeurt door middel van het binden van Fas-ligand (FasL), dat tot expressie komt op de $CD8^+$ T-cellen, aan de Fas-receptor op de doelcellen, wat apoptose initieert. Ook kunnen ze de toxische moleculen perforine en granzyme uitscheiden, die andere cellen kunnen lyseren. Daarnaast produceren $CD8^+$ T-cellen ook pro-inflammatoire cytokines zoals IFN-γ en TNF-α [24].

1.4. Doel van het onderzoek

Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was ten eerste om de functie van $CD8^+$ T-cellen in atherosclerose op te helderen, met name binnen de omgeving van de plaque. Ten tweede wilden wij deze kennis gebruiken om te testen of een therapie die zich richt op $CD8^+$ T-cellen gebruikt kan worden om de inflammatoire respons in atherosclerose te remmen.

2. $CD8^+$ T-cellen zijn beschermend in de geavanceerde stadia van atherosclerose

In **Hoofdstuk 2** presenteren wij een overzicht van wat er tot nu toe bekend is over $CD8^+$ T-cellen in atherosclerose. $CD8^+$ T-cellen zijn aanwezig in zowel beginnende als meer gevorderde plaques in patiënten met atherosclerose [21, 25]. Er zijn echter nog veel onduidelijkheden over de functie van deze cellen in het ziekteproces. Recente experimentele studies in muizen hebben laten zien dat cytokine-producerende $CD8^+$ T-cellen de vorming van beginnende atherosclerotische plaques stimuleren door het rekruteren van monocyten, die zich ontwikkelen tot inflammatoire macrofagen in de lesies [26]. Ander onderzoek laat juist zien dat het induceren van $CD8^+$ T-cellen door middel van vaccinatie met een peptide afkomstig van het eiwitgedeelte van LDL een beschermende functie heeft op de ontwikkeling van atherosclerose. Dit beschermende effect wordt gemedieerd door de cytotoxische functies van $CD8^+$ T-cellen op antigeen-presenterende cellen [27, 28]. Daarnaast laten verschillende studies het gunstige effect zien van regulatoire $CD8^+$ T-cellen, die de immuunrespons onderdrukken en daardoor atherosclerose remmen [29, 30]. In patiënten met hart- en vaatziekten zijn hogere aantallen van (geactiveerde) $CD8^+$ T-cellen in het bloed geassocieerd met een toename in cardiovasculaire complicaties [31–33]. Echter, ook in mensen geldt dat regulatoire $CD8^+$ T-cellen een anti-atherogene functie uitoefenen [34]. Samengevat laten deze studies zien dat de rol van $CD8^+$ T-cellen afhankelijk is van zowel de subset van deze cellen als het stadium van atherosclerose.

Het meeste onderzoek dat tot nu toe verricht is naar de rol van $CD8^+$ T-cellen in atherosclerose, richt zich op de initiële stadia van de ontwikkeling van plaques. Vanuit een klinisch oogpunt is het echter relevanter om de meer geavanceerde stadia van atherosclerose te bestuderen, aangezien patiënten dan pas symptomen beginnen te ervaren, zoals kortademigheid en pijn op de borst, en zich melden bij een dokter. Therapeutische interventie wordt daarom vaak ook pas vanaf dit stadium mogelijk, en dientengevolge is het interessant om dit stadium te bestuderen vanuit een oogpunt van geneesmiddelontwikkeling. Daarom hebben wij in **Hoofdstuk 3** bekeken of er enige correlatie bestaat tussen $CD8^+$ T-cellen en de aanwezigheid van andere celtypen in humane plaques. Dit hebben we bestudeerd in materiaal dat verwijderd wordt na endarterectomie-operaties, via een samenwerking met het Westeinde ziekenhuis in Den Haag. We vonden dat als er percentueel meer $CD8^+$ T-cellen aanwezig zijn in de atherosclerotische plaques, er percentueel minder macrofagen in de plaques teruggevonden worden. Dit kan erop duiden dat de aanwezigheid van $CD8^+$ T-cellen het aantal macrofagen in de plaques kan reguleren, en dat deze cellen dus een beschermende functie uitoefenen. Om deze hypothese verder te testen, hebben we dit onderzocht in een muismodel. We hebben gebruik gemaakt van de LDL-receptor deficiënte ($LDLr^{-/-}$) muis, die genetisch gemodificeerd is om minder LDL op te nemen uit de bloedstroom. Dit leidt tot hoge cholesterolwaarden in het bloed en daarom ontwikkelt deze muis atherosclerose zodra deze een cholesterolrijk dieet gevoerd wordt [35]. Om specifiek het effect van $CD8^+$ T-cellen in de geavanceerde stadia te bestuderen, zijn de muizen eerst 10 weken op een cholesterolrijk dieet gezet, zodat de plaques zich konden ontwikkelen. Vervolgens kregen de muizen nogmaals 6 weken een cholesterolrijk dieet, waarbij ze ook geïnjecteerd

werden met ofwel een antilichaam dat alle $CD8^+$ T-cellen uit het lichaam van de muizen verwijderde, ofwel een controle-antilichaam dat geen effect uitoefende. Aan het einde van het experiment zijn de atherosclerotische plaquegrootte alsmede belangrijke parameters van plaquestabiliteit gemeten in het driekleppengebied in het hart van de muizen, een locatie waar vanwege turbulente bloedstroming vaak atherosclerose ontstaat.

Hoewel de afwezigheid van $CD8^+$ T-cellen de plaquegrootte niet beïnvloedde, had het verwijderen van deze cellen wèl effect op de samenstelling van de plaques. In de behandelde groep was er een toename in het aantal macrofagen in de plaques. Dit is in overeenstemming met de correlatie die we beschreven tussen $CD8^+$ T-cellen en macrofagen in het humane endarterectomiemateriaal. Daarnaast beschreven we dat de behandelde groep minder stabiele plaques had, aangezien er minder collageen aanwezig was in de fibreuze laag van gladde spiercellen boven op de plaque, waardoor deze gemakkelijker kan scheuren. Bovendien leidde het verwijderen van de $CD8^+$ T-cellen ook nog eens tot een toename van de pro-inflammatoire Th1-cellen. Interessant genoeg zagen we deze toename alleen in de plaques van de behandelde muizen, maar niet op andere locaties in het lichaam. Deze resultaten geven aan dat $CD8^+$ T-cellen bijdragen aan de stabiliteit van de plaque, door het remmen van verschillende pro-inflammatoire immuuncellen. Deze beschermende rol van $CD8^+$ T-cellen in een geavanceerd stadium van atherosclerose komt overeen met een eerder gepubliceerde studie, waarin $CD8^+$ T-cellen een beschermende rol uitoefenden via het doden van antigeen-presenterende cellen (waar macrofagen ook onder vallen) [36]. Aangezien wij hebben gevonden dat het beschermende effect van $CD8^+$ T-cellen specifiek in de plaques plaatsvond, hebben wij ook gekeken naar verschillen tussen $CD8^+$ T-cellen in de plaque en die in de milt, als representatief orgaan voor de systemische immuunrespons. We vonden dat $CD8^+$ T-cellen in de plaques een hogere expressie hadden van Fas-ligand, een molecuul dat celdood kan induceren in andere cellen. Vooral Th1-cellen en macrofagen die veel vetten hebben opgenomen zijn hier erg gevoelig voor [37–39]. Het neutraliseren van de functie van Fas-ligand leidde inderdaad tot de aanwezigheid van meer Th1-cellen en macrofagen in de plaques. Daarom kunnen we uit deze studie concluderen dat $CD8^+$ T-cellen een beschermende functie uitoefenen in de geavanceerde stadia van atherosclerose, via het reduceren van de aanwezigheid van Th1-cellen en macrofagen. Dit beschermende effect wordt (gedeeltelijk) gemedieerd via het induceren van celdood door de hoge expressie van Fas-ligand op de $CD8^+$ T-cellen specifiek in de plaques.

3. $CD8^+$ T-cellen moduleren de lokale immuunrespons in de plaque

Zoals we hebben laten zien in **Hoofdstuk 3**, kunnen lokaal in de plaques aanwezige $CD8^+$ T-cellen een andere functie uitoefenen dan elders in het lichaam. Aangezien de lokale omgeving in de atherosclerotische plaque veel inflammatoire signalen en lipiden bevat, vroegen wij ons af of dit de functie van $CD8^+$ T-cellen beïnvloedt. In **Hoofdstuk 4** beschrijven we de verschillen in eigenschappen van $CD8^+$ T-cellen uit de plaque en de milt van apolipoproteine E deficiënte ($apoE^{-/-}$) muizen. Deze muizen heb-

ben een verminderde opname van zeer-lage dichtheid lipoproteïne (VLDL)- en LDL-deeltjes en ontwikkelen daardoor spontaan atherosclerose, zelfs als ze een normaal dieet gevoerd krijgen. De $CD8^+$ T-cellen uit de plaques van deze muizen leken disfunctioneel, aangezien ze minder pro-inflammatoire cytokines produceerden vergeleken met hun tegenhangers in de milt. Deze verminderde productie van cytokines was geassocieerd met een hogere expressie van het enzym CD39 op het celmembraan van de $CD8^+$ T-cellen. Dit enzym is betrokken bij het omzetten van adenosine trifosfaat (ATP), een pro-inflammatoir "gevaar"signaal, naar het anti-inflammatoire molecuul adenosine [40, 41]. Het farmacologisch remmen van CD39 in deze muizen leidde zoals verwacht tot een hogere inflammatoire cytokineproductie door $CD8^+$ T-cellen in de plaque. Daarnaast laten we zien dat antigeen-specifieke stimulatie van de TCR nodig is om CD39-expressie te induceren. Om dit aan te tonen hebben we een beenmergtransplantatie uitgevoerd, waarbij de aanwezige immuuncellen van de muizen werden verwijderd door bestraling, waarna er nieuw beenmerg werd geïnjecteerd waaruit nieuwe immuuncellen voortkwamen. Als we beenmerg in $LDLr^{-/-}$ muizen transplanteerden waaruit $CD8^+$ T-cellen voortkwamen die via de TCR geen atherosclerotisch antigeen konden herkennen, zagen we een flinke reductie in de expressie van CD39 op $CD8^+$ T-cellen in de plaques, vergeleken met de transplantatie van normaal beenmerg. Dit is in overeenstemming met data uit kankeronderzoek, waar TCR-signalen ook specifiek CD39-expressie induceren op $CD8^+$ T-cellen in de tumoromgeving [42, 43]. Bovenal laten we in dit onderzoek zien dat in humane atherosclerose er ook een sterk verhoogde CD39-expressie was op $CD8^+$ T-cellen in de plaques verkregen via endarterectomie vergeleken met bloedmonsters van dezelfde patiënten. Dit toont aan dat de resultaten die wij hebben verkregen in de muizenstudies ook klinische relevantie hebben.

In **Hoofdstuk 5** hebben wij onderzocht of de lokale ontstekingsreactie in de atherosclerotische plaque ook de daar aanwezige subsets van $CD8^+$ T-cellen beïnvloedt. Op het moment van $CD8^+$ T-celactivatie door de DCs, kunnen de door DCs uitgescheiden cytokines de $CD8^+$ T-cellen beïnvloeden om te differentiëren naar verschillende subsets. Deze subsets worden gekarakteriseerd door de productie van verschillende inflammatoire cytokines. Zo produceert de Tc1-subset vooral de inflammatoire cytokines IFN-γ en TNF-α, de Tc2-subset voornamelijk IL-4 en IL-5, en de Tc17-subset vooral IL-17A. Daarnaast wordt elke subset geassocieerd met de expressie van een andere transcriptiefactor, een eiwit dat de genexpressie in de cel reguleert en op die manier de verschillende effectorfuncties van elke subset teweegbrengt [44]. In $apoE^{-/-}$ muizen hebben wij bepaald dat er procentueel minder Tc1-cellen in de plaque waren vergeleken met de milt, maar dat er juist een toename was in het percentage Tc17-cellen. Om te bestuderen hoe Tc17-cellen de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloeden, hebben we deze cellen ingespoten in CD8-deficiënte $LDLr^{-/-}$ muizen. Deze muizen hebben van zichzelf geen $CD8^+$ T-cellen, waardoor het effect van de geïnjecteerde cellen goed bestudeerd kan worden. Ter controle werden ongedifferentieerde Tc0-cellen ingespoten. Tot onze verassing zagen we dat de Tc0-cellen zich meer gingen gedragen als Tc1-cellen zodra ze werden geïnjecteerd, aangezien ze IFN-γ en T-bet, de karakteristieke transcriptiefactor van Tc1 cellen, verhoogd tot expressie brachten. Tc17-cellen produceerden ook meer IFN-γ na injectie, maar minder dan de Tc0-cellen, en meer IL-17A, zoals verwacht. Het is aannemelijk dat de inflammatoire omgeving in de atherosclerotische muizen deze

veranderingen induceert [36, 45]. De muizen in de Tc17-behandelde groep hadden kleinere atherosclerotische plaques vergeleken met de Tc0-behandelde groep. Daarnaast waren er minder macrofagen in de plaques van de Tc17-behandelde muizen en was er een vermindering van het percentage inflammatoire Th1-cellen. Aangezien er zowel een toename in IL-17A productie als een vermindering van IFN-γ productie was in de Tc17-groep ten opzichte van de Tc0-groep, kunnen de verschillen in atherosclerose aan beide veranderingen ten grondslag liggen. Desalniettemin laten deze bevindingen zien dat er verschillende subsets van $CD8^+$ T-cellen aanwezig zijn in de atherosclerotische plaques, en dat het mogelijk interessant kan zijn vanuit een therapeutisch oogpunt om de $CD8^+$ T-cellen te differentiëren naar een minder atherogene subset, zoals de Tc17-subset.

4. Inductie van $CD8^+$ T-cellen door middel van vaccinatie voor de behandeling van atherosclerose

Aangezien we in de voorgaande hoofdstukken hebben aangetoond dat $CD8^+$ T-cellen een anti-atherogene functie kunnen uitoefenen onder bepaalde omstandigheden, was het een logische volgende stap om een therapie te ontwikkelen die deze beschermende rol benut. Een interessante strategie om antigeen-specifieke $CD8^+$ T-cellen te induceren is via vaccinatie. In **Hoofdstuk 6** hebben wij een literatuuronderzoek uitgevoerd naar hoe de immuunrespons wordt beïnvloed door de eigenschappen van de deeltjes waarin het antigeen aan de antigeen-presenterende cellen wordt afgeleverd. Ziekteverwekkers zoals bacteriën en virussen verschillen van vorm en andere eigenschappen, en stimuleren op die manier het immuunsysteem elk in een specifieke manier. Op eenzelfde manier kan het ontwerp van een deeltjesvormig vaccin de immuunrespons beïnvloeden. In dit hoofdstuk bespreken we hoe de fysisch-chemische eigenschappen van grootte, vorm, en rigiditeit van een deeltjesvormig vaccin de distributie van dit deeltje door het lichaam, de opname door cellen, de antigeen-presentatie en de resulterende immuunrespons kunnen beïnvloeden. Met betrekking tot $CD8^+$ T-cellen bespreken we hier verschillende studies die demonsteren dat deeltjes in de grootte van nanometers gemakkelijk getransporteerd worden van de injectieplaats naar het lymfestelsel [46]. Daarnaast worden kleine nanodeeltjes efficiënt opgenomen door DCs [47]. Tot slot zijn kleine nanodeeltjes meer effectief dan grote deeltjes in het induceren van $CD8^+$ T-celimmuunreacties, vooral als deze deeltjes bolvormig zijn, aangezien dit de opname van de deeltjes vergemakkelijkt [48, 49].

Met de vergaarde kennis over hoe de eigenschappen van deeltjesvaccins immuunreacties kunnen beïnvloeden, hebben we in **Hoofdstuk 7** vervolgens een vaccinatiestrategie gekozen om beschermende $CD8^+$ T-cellen te induceren in atherosclerose. Het doel was om een cytotoxische $CD8^+$ T-celrespons op te wekken tegen antigeen-presenterende cellen die LDL-deeltjes hebben opgenomen, wat zou moeten resulteren in een vermindering van het aantal macrofagen in de plaque alsmede een verminderde stimulatie van het adaptieve immuunsysteem. Daarnaast zou vaccinatie ook de expressie van CD39 kunnen verhogen, wat de immuunrespons verder zou kunnen remmen. Door middel van de Immune Epitope Database Analysis Resource (IEDB), een online pro-

gramma voor het voorspellen van T-celepitopen [50], hebben we een voorspelling gemaakt welke peptide-sequentie in het ApoB100 eiwit, het belangrijkste eiwit op het LDL-deeltje, zeer waarschijnlijk goed in het MHC-I molecuul kan binden. Vervolgens hebben we dit peptide in een liposomaal deeltje ingekapseld. Liposomen zijn doorgaans bolvormige deeltjes die bestaan uit een of meerdere bi-lagen van fosfolipiden die een vettige membraan vormen welke een waterhoudende holte omsluiten. Antigenen verpakt in liposomen worden beter opgenomen door antigeen-presenterende cellen vergeleken met opgeloste antigenen. Daarnaast induceren de liposomen immuunactivatie in de antigeen-presenterende cellen. Eerder werk heeft laten zien dat positief geladen liposomen met een diameter kleiner dan 200 nanometer sterke antigeenspecifieke $CD8^+$ T-celresponsen kunnen induceren in een muismodel van kanker [51]. Daarom hebben wij gekozen om dit type liposomen te gebruiken in onze vaccinatiestudie. $LDLr^{-/-}$ muizen werden gevaccineerd met liposomen die het peptide bevatten, met alleen lege liposomen, of met alleen het vrije peptide. Na 10 weken op een cholesterolrijk dieet en twee boost-vaccinaties hebben we het effect op atherosclerose-ontwikkeling in deze muizen geëvalueerd. Helaas waren we niet in staat om antigeenspecifieke $CD8^+$ T-cellen te detecteren na de vaccinaties, waardoor er ook geen effect van de vaccinatie op atherosclerose waarneembaar was. Echter waren we wel in staat om antigeen-specifieke $CD8^+$ T-cellen te induceren als we een ander peptide in de liposomen inkapselden, wat aantoont dat de problemen met de immunogeniciteit in onze vaccinatiestudie niet door de liposomen veroorzaakt werden. Daarnaast waren we ook in staat om antigeen-specifieke $CD8^+$ T-cellen te induceren als we ons ApoB100-afgeleide peptide direct op DCs laadden en vervolgens met deze cellen vaccineerden, wat aantoont dat dit peptide wel degelijk immunogeen is. Het is aannemelijk dat er problemen waren met de stabiliteit van het peptide tijdens het kruispresentatieproces na vaccinatie, waarbij het peptide in contact komt met een zure omgeving en verschillende enzymen die het peptide kunnen afbreken. Het gebruik van een meer stabiel peptide zou deze problemen wellicht kunnen verhelpen. Ondanks dat de uitkomsten van deze studie geen afdoend bewijs hebben geleverd dat onze vaccinatiemethode beschermend werkt, hebben we in dit proefschrift overtuigende data gepresenteerd die een beschermde rol van $CD8^+$ T-cellen laat zien. Daarom zijn we van mening dat verder onderzoek naar vaccinatie gericht op $CD8^+$ T-cellen van grote waarde kan zijn in het onderzoeksveld van hart- en vaatziekten.

5. Perspectieven

In de laatste jaren is er veel vooruitgang geboekt in het onderzoek naar immuuntherapieën voor de behandeling van atherosclerose. In dit proefschrift hebben wij de rol van $CD8^+$ T-cellen in deze ziekte onderzocht, en meerdere mechanismen geïdentificeerd waardoor $CD8^+$ T-cellen een beschermende functie uitoefenen. We hopen dat deze bevindingen nuttige uitgangspunten zullen blijken te zijn voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische interventies voor de behandeling van atherosclerose.

In **Hoofdstuk 3** lieten we zien dat FasL-expressie op de $CD8^+$ T-cellen bijdraagt aan het verwijderen van de pro-inflammatoire Th1-cellen en macrofagen in de plaques.

Daarom kan het mogelijk interessant zijn om een hogere expressie van FasL te induceren op T-cellen, en deze T-cellen vervolgens toe te dienen als celtherapieproduct, een methode die al effectief is gebleken in de behandeling van prostaatkanker in een muismodel [52]. Een ander alternatief is om T-cellen uit patiënten te isoleren, en in deze cellen een zogenaamd "chimeric antigen receptor"(CAR) construct tot expressie te laten brengen, waarmee deze CAR-T-cellen specifiek een gericht celtype kunnen aanvallen en celdood kunnen induceren via onder andere FasL-signalering [53]. Door deze therapie op macrofagen te richten, kan de plaquevorming wellicht worden tegengegaan.

In **Hoofdstuk 4** beschrijven we dat activatie van $CD8^+$ T-cellen leidt tot een verhoogde expressie van CD39, wat de pro-inflammatoire cytokineproductie in de plaque vermindert. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 7** getest of we beschermende $CD8^+$ T-cellen konden induceren door middel van vaccinatie. Helaas was onze vaccinatiemethode niet in staat antigeen-specifieke $CD8^+$ T-cellen te induceren tegen het ApoB100-afgeleide peptide. Om in de vorige sectie genoemde redenen, zou verder onderzoek naar een verbeterde vaccinatiestrategie desalniettemin kunnen leiden tot de ontwikkeling van een effectieve therapie voor de behandeling van atherosclerose.

Tot slot hebben wij met het in **Hoofdstuk 5** beschreven onderzoek aangetoond dat IL-17A-producerende Tc17-cellen de vorming van atherosclerotische lesies verminderen vergeleken met IFN-γ-producerende Tc1-cellen. Dit laat zien dat de verschillende subsets van $CD8^+$ T-cellen ieder hun eigen effect uitoefenen op het ziekteproces. Daarom kan het interessant zijn om T-cellen te isoleren uit het bloed, buiten het lichaam naar het Tc17-subtype te differentiëren en het resulterende celtherapieproduct vervolgens terug te geven aan de patiënt, zodat deze aanpaste T-cellen een beschermende functie kunnen uitoefenen. Deze methode is al succesvol gebleken in het versterken van de anti-tumor activiteit van T-cellen in muismodellen en humane cellen [54, 55], wat suggereert dat deze aanpak ook in een klinische setting van toepassing kan zijn.

Samenvattend is er zeker potentie voor het ontwikkelen van een $CD8^+$ T-cel-gerichte therapie voor de behandeling van hart- en vaatziekten. Men moet echter zorgvuldig zijn in het sturen van de $CD8^+$ T-celfunctie naar een beschermende functie, en het induceren van pro-inflammatoire bijwerkingen zien te voorkomen. Daarnaast zijn veel van de onderzoeksgegevens die een beschermende rol voor $CD8^+$ T-cellen laten zien verkregen in muismodellen, alhoewel wij hebben aangetoond dat dit ten minste gedeeltelijk vertaald kan worden naar een klinische setting. Voordat er een effectieve $CD8^+$ T-cel-gerichte therapie kan worden ontwikkeld, is echter meer onderzoek nodig om de beschermende functie van $CD8^+$ T-cellen in humane atherosclerose te bevestigen. Daarnaast is er meer onderzoek nodig om de bruikbaarheid, veiligheid en effectiviteit van mogelijke therapieën te onderzoeken.

6. Conclusie

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werpt een nieuw licht op de functie van $CD8^+$ T-cellen in atherosclerose en laat zien dat deze cellen in de plaque beschermende effecten uitoefenen. Dit onderzoek biedt nieuwe aanknopingspunten

voor de ontwikkeling van immuunmodulerende therapieën voor de behandeling van atherosclerose, zoals antigeen-specifieke stimulatie van $CD8^+$ T-cellen door middel van vaccinatie. Er wordt momenteel grote vooruitgang geboekt in het ontwikkelen van antigeen-specifieke T-celtherapieën voor de behandeling van verschillende ziektes. Daarnaast is er toenemende aandacht binnen het veld van atherosclerose onderzoek naar de ontwikkeling van immuunmodulerende therapieën, die gecombineerd kunnen worden met het gunstige effect van het verlagen van de cholesterolwaarden in het bloed. Daarom is de vraag niet *of*, maar *wanneer* er effectieve immuun-gerichte therapieën voor de behandeling van hart- en vaatziekten binnen ons handbereik zullen zijn.

Bibliografie

[1] E. J. Benjamin, M. J. Blaha, S. E. Chiuve, M. Cushman, S. R. Das, R. Deo, S. D. d. Ferranti, J. Floyd, M. Fornage, C. Gillespie, C. R. Isasi, M. C. Jiménez, L. C. Jordan, S. E. Judd, D. Lackland, J. H. Lichtman, L. Lisabeth, S. Liu, C. T. Longenecker, R. H. Mackey, K. Matsushita, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, K. Nasir, R. W. Neumar, L. Palaniappan, D. K. Pandey, R. R. Thiagarajan, M. J. Reeves, M. Ritchey, C. J. Rodriguez, G. A. Roth, W. D. Rosamond, C. Sasson, A. Towfighi, C. W. Tsao, M. B. Turner, S. S. Virani, J. H. Voeks, J. Z. Willey, J. T. Wilkins, J. H. Wu, H. M. Alger, S. S. Wong, and P. Muntner, *Heart disease and stroke statistics - 2017 update: A report from the american heart association,* Circulation **135**, e146 (2017).

[2] M. Rafieian-Kopaei, M. Setorki, M. Doudi, A. Baradaran, and H. Nasri, *Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes,* International journal of preventive medicine **5**, 927 (2014).

[3] B. Wong, G. Kruse, L. Kutikova, K. K. Ray, P. Mata, and E. Bruckert, *Cardiovascular disease risk associated with familial hypercholesterolemia: A systematic review of the literature,* Clin Ther **38**, 1696 (2016).

[4] J. McGill, H. C., C. A. McMahan, E. E. Herderick, G. T. Malcom, R. E. Tracy, and J. P. Strong, *Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence,* Am J Clin Nutr **72**, 1307S (2000).

[5] J. Babiak and L. L. Rudel, *Lipoproteins and atherosclerosis,* Baillieres Clin Endocrinol Metab **1**, 515 (1987).

[6] A. J. Kattoor, N. V. K. Pothineni, D. Palagiri, and J. L. Mehta, *Oxidative stress in atherosclerosis,* Current Atherosclerosis Reports **19**, 42 (2017).

[7] D. A. Chistiakov, Y. V. Bobryshev, and A. N. Orekhov, *Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis,* Journal of cellular and molecular medicine **20**, 17 (2016).

[8] J. Persson, J. Nilsson, and M. W. Lindholm, *Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages,* Lipids in health and disease **5**, 17 (2006).

[9] I. Tabas, *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications,* The Journal of clinical investigation **110**, 905 (2002).

[10] A. Niessner and C. M. Weyand, *Dendritic cells in atherosclerotic disease,* Clinical Immunology **134**, 25 (2010).

[11] A. Rudijanto, *The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis,* Acta Med Indones **39**, 86 (2007).

[12] M. S. Rahman and K. Woollard, *Atherosclerosis,* Adv Exp Med Biol **1003**, 121 (2017).

[13] P. Libby and G. Pasterkamp, *Requiem for the 'vulnerable plaque',* European Heart Journal **36**, 2984 (2015).

[14] P. M. Rothwell, *Atherothrombosis and ischaemic stroke,* BMJ (Clinical research ed.) **334**, 379 (2007).

[15] R. Virmani, A. Farb, and A. P. Burke, *Coronary angioplasty from the perspective of atherosclerotic plaque: morphologic predictors of immediate success and restenosis,* Am Heart J **127**, 163 (1994).

[16] D. Glineur, M. Gaudino, and J. Grau, *The evolution of coronary bypass surgery will determine its relevance as the standard of care for the treatment for multivessel coronary artery disease,* Circulation **134**, 1206 (2016).

[17] J. F. Meschia, J. P. Klaas, J. Brown, R. D., and T. G. Brott, *Evaluation and management of atherosclerotic carotid stenosis,* Mayo Clin Proc **92**, 1144 (2017).

[18] C. Stancu and A. Sima, *Statins: mechanism of action and effects,* J Cell Mol Med **5**, 378 (2001).

[19] J. Kjekshus and T. R. Pedersen, *Reducing the risk of coronary events: evidence from the scandinavian simvastatin survival study (4S),* Am J Cardiol **76**, 64C (1995).

[20] P. M. Ridker, B. M. Everett, T. Thuren, J. G. MacFadyen, W. H. Chang, C. Ballantyne, F. Fonseca, J. Nicolau, W. Koenig, S. D. Anker, J. J. Kastelein, J. H. Cornel, P. Pais, D. Pella, J. Genest, R. Cifkova, A. Lorenzatti, T. Forster, Z. Kobalava, L. Vida-Simiti, M. Flather, H. Shimokawa, H. Ogawa, M. Dellborg, P. R. Rossi, R. P. Troquay, P. Libby, and R. J. Glynn, *Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease,* New England Journal of Medicine **377**, 1119 (2017).

[21] R. A. van Dijk, A. J. Duinisveld, A. F. Schaapherder, A. Mulder-Stapel, J. F. Hamming, J. Kuiper, O. J. de Boer, A. C. van der Wal, F. D. Kolodgie, R. Virmani, and J. H. Lindeman, *A change in inflammatory footprint precedes plaque instability: a systematic evaluation of cellular aspects of the adaptive immune response in human atherosclerosis,* J Am Heart Assoc **4**, e001403 (2015).

[22] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, *Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties,* Annu Rev Immunol **7**, 145 (1989).

[23] S. Gupta, A. M. Pablo, X. Jiang, N. Wang, A. R. Tall, and C. Schindler, *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice,* J Clin Invest **99**, 2752 (1997).

[24] M. H. Andersen, D. Schrama, P. Thor Straten, and J. C. Becker, *Cytotoxic T cells,* J Invest Dermatol **126**, 32 (2006).

[25] J. Gewaltig, M. Kummer, C. Koella, G. Cathomas, and B. C. Biedermann, *Requirements for CD8 T-cell migration into the human arterial wall,* Hum Pathol **39**, 1756 (2008).

[26] C. Cochain, M. Koch, S. M. Chaudhari, M. Busch, J. Pelisek, L. Boon, and A. Zernecke, *$CD8^+$ T cells regulate monopoiesis and circulating Ly6C-high monocyte levels in atherosclerosis in mice,* Circ Res **117**, 244 (2015).

[27] P. C. Dimayuga, X. Zhao, J. Yano, W. M. Lio, J. Zhou, P. M. Mihailovic, B. Cercek, P. K. Shah, and K. Y. Chyu, *Identification of ApoB-100 peptide-specific $CD8^+$ T cells in atherosclerosis,* J Am Heart Assoc **6**, e005318 (2017).

[28] K.-Y. Chyu, X. Zhao, P. C. Dimayuga, J. Zhou, X. Li, J. Yano, W. M. Lio, L. F. Chan, J. Kirzner, P. Trinidad, B. Cercek, and P. K. Shah, *$CD8^+$ T cells mediate the atheroprotective effect of immunization with an ApoB-100 peptide,* PLoS ONE **7**, e30780 (2012).

[29] J. Zhou, P. C. Dimayuga, X. Zhao, J. Yano, W. M. Lio, P. Trinidad, T. Honjo, B. Cercek, P. K. Shah, and K.-Y. Chyu, *$CD8^+CD25^+$ T cells reduce atherosclerosis in $apoE^{-/-}$ mice,* Biochemical and Biophysical Research Communications **443**, 864 (2014).

[30] M. Clement, K. Guedj, F. Andreata, M. Morvan, L. Bey, J. Khallou-Laschet, A.-T. Gaston, S. Delbosc, J.-M. Alsac, P. Bruneval, C. Deschildre, M. Le Borgne, Y. Castier, H.-J. Kim, H. Cantor, J.-B. Michel, G. Caligiuri, and A. Nicoletti, *Control of the T follicular helper–germinal center B-cell axis by cd8(+) regulatory T cells limits atherosclerosis and tertiary lymphoid organ development,* Circulation **131**, 560 (2015).

[31] D. Kolbus, I. Ljungcrantz, L. Andersson, B. Hedblad, G. N. Fredrikson, H. Bjorkbacka, and J. Nilsson, *Association between $CD8^+$ T-cell subsets and cardiovascular disease,* J Intern Med **274**, 41 (2013).

[32] J. Podolec, L. Niewiara, D. Skiba, M. Siedlinski, J. Baran, M. Komar, B. Guzik, A. Kablak-Ziembicka, G. Kopec, T. Guzik, K. Bartus, W. Plazak, and K. Zmudka, *Higher levels of circulating naïve $CD8^+$ CD45RA+ cells are associated with lower extent of coronary atherosclerosis and vascular dysfunction,* International Journal of Cardiology **259**, 26.

[33] Y. Hwang, H. T. Yu, D. H. Kim, J. Jang, H. Y. Kim, I. Kang, H. C. Kim, S. Park, and W. W. Lee, *Expansion of CD8(+) T cells lacking the IL-6 receptor alpha chain in patients with coronary artery diseases (CAD),* Atherosclerosis **249**, 44 (2016).

[34] M. K. Qiu, S. C. Wang, Y. X. Dai, S. Q. Wang, J. M. Ou, and Z. W. Quan, *PD-1 and Tim-3 pathways regulate $CD8^+$ T cells function in atherosclerosis,* PLoS One **10**, e0128523 (2015).

[35] S. Ishibashi, J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. Herz, and D. K. Burns, *Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice,* J Clin Invest **93**, 1885 (1994).

[36] K. Y. Chyu, W. M. Lio, P. C. Dimayuga, J. Zhou, X. Zhao, J. Yano, P. Trinidad, T. Honjo, B. Cercek, and P. K. Shah, *Cholesterol lowering modulates T cell function in vivo and in vitro,* PLoS One **9**, e92095 (2014).

[37] X. Zhang, T. Brunner, L. Carter, R. W. Dutton, P. Rogers, L. Bradley, T. Sato, J. C. Reed, D. Green, and S. L. Swain, *Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis,* The Journal of Experimental Medicine **185**, 1837 (1997).

[38] V. N. Ivanov, P. Lopez Bergami, G. Maulit, T. A. Sato, D. Sassoon, and Z. Ronai, *FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface,* Mol Cell Biol **23**, 3623 (2003).

[39] P. M. Yao and I. Tabas, *Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the fas pathway,* J Biol Chem **275**, 23807 (2000).

[40] Y. J. Xu, L. Zheng, Y. W. Hu, and Q. Wang, *Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis,* Clin Chim Acta **476**, 28 (2018).

[41] W. G. Junger, *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling,* Nat Rev Immunol **11**, 201 (2011).

[42] Y. Simoni, E. Becht, M. Fehlings, C. Y. Loh, S.-L. Koo, K. W. W. Teng, J. P. S. Yeong, R. Nahar, T. Zhang, H. Kared, K. Duan, N. Ang, M. Poidinger, Y. Y. Lee, A. Larbi, A. J. Khng, E. Tan, C. Fu, R. Mathew, M. Teo, W. T. Lim, C. K. Toh, B.-H. Ong, T. Koh, A. M. Hillmer, A. Takano, T. K. H. Lim, E. H. Tan, W. Zhai, D. S. W. Tan, I. B. Tan, and E. W. Newell, *Bystander $CD8^+$ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates,* Nature **557**, 575 (2018).

[43] T. Duhen, R. Duhen, R. Montler, J. Moses, T. Moudgil, N. F. de Miranda, C. P. Goodall, T. C. Blair, B. A. Fox, J. E. McDermott, S.-C. Chang, G. Grunkemeier, R. Leidner, R. B. Bell, and A. D. Weinberg, *Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors,* Nature Communications **9**, 2724 (2018).

[44] H. W. Mittrucker, A. Visekruna, and M. Huber, *Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells,* Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **62**, 449 (2014).

[45] M. Centa, K. E. Prokopec, M. G. Garimella, K. Habir, L. Hofste, J. M. Stark, A. Dahdah, C. A. Tibbitt, K. A. Polyzos, A. Gistera, D. K. Johansson, N. N. Maeda, G. K. Hansson, D. F. J. Ketelhuth, J. M. Coquet, C. J. Binder, M. C. I. Karlsson, and S. Malin, *Acute loss of apolipoprotein E triggers an autoimmune response that accelerates atherosclerosis,* Arterioscler Thromb Vasc Biol **38**, e145 (2018).

[46] C. Oussoren, J. Zuidema, D. J. Crommelin, and G. Storm, *Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. influence of liposomal size, lipid compostion and lipid dose,* Biochim Biophys Acta **1328**, 261 (1997).

[47] J. M. Brewer, K. G. Pollock, L. Tetley, and D. G. Russell, *Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles,* J Immunol **173**, 6143 (2004).

[48] S. Kumar, A. C. Anselmo, A. Banerjee, M. Zakrewsky, and S. Mitragotri, *Shape and size-dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles,* J Control Release **220**, 141 (2015).

[49] P. L. Mottram, D. Leong, B. Crimeen-Irwin, S. Gloster, S. D. Xiang, J. Meanger, R. Ghildyal, N. Vardaxis, and M. Plebanski, *Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus,* Mol Pharm **4**, 73 (2007).

[50] R. Vita, S. Mahajan, J. A. Overton, S. K. Dhanda, S. Martini, J. R. Cantrell, D. K. Wheeler, A. Sette, and B. Peters, *The immune epitope database (IEDB): 2018 update,* Nucleic Acids Res **47**, D339 (2019).

[51] E. M. Varypataki, N. Benne, J. Bouwstra, W. Jiskoot, and F. Ossendorp, *Efficient eradication of established tumors in mice with cationic liposome-based synthetic long-peptide vaccines,* Cancer Immunol Res **5**, 222 (2017).

[52] J. C. Symes, C. Siatskas, D. H. Fowler, and J. A. Medin, *Retrovirally transduced murine T lymphocytes expressing FasL mediate effective killing of prostate cancer cells,* Cancer Gene Therapy **16**, 439 (2009).

[53] M.-R. Benmebarek, C. H. Karches, B. L. Cadilha, S. Lesch, S. Endres, and S. Kobold, *Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (car) T cells,* International journal of molecular sciences **20**, 1283 (2019).

[54] L. Garcia-Hernandez Mde, H. Hamada, J. B. Reome, S. K. Misra, M. P. Tighe, and R. W. Dutton, *Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells controls the growth of B16 melanoma in mice,* J Immunol **184**, 4215 (2010).

[55] X. Hu, K. Majchrzak, X. Liu, M. M. Wyatt, C. J. Spooner, J. Moisan, W. Zou, L. L. Carter, and C. M. Paulos, *In vitro priming of adoptively transferred T cells with a rorgamma agonist confers durable memory and stemness in vivo,* Cancer Res **78**, 3888 (2018).