



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **B cell modulation in atherosclerosis**

Douna, H.

### **Citation**

Douna, H. (2019, June 6). *B cell modulation in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/73833>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/73833>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

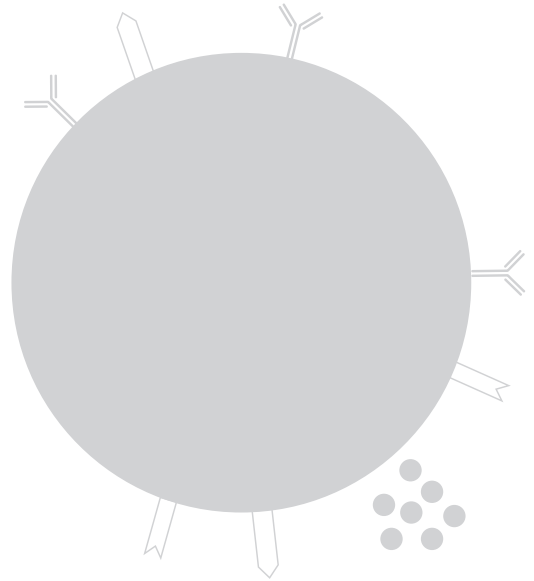


The handle <http://hdl.handle.net/1887/73833> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Douna, H.

**Title:** B cell modulation in atherosclerosis

**Issue Date:** 2019-06-06



## Nederlandse samenvatting



## Introductie

Cardiovasculaire aandoeningen of hart- en vaatziekten zijn de overkoepelende categorie waaronder welbekende complicaties zoals een hartaanval, beroerte of hartritmestoornissen behoren. De grote maatschappelijke impact die hart- en vaatziekten hebben volgt onder meer uit de schatting van de Wereldgezondheidsorganisatie dat jaarlijks meer dan 15 miljoen mensen overlijden aan het gevolg van dergelijke aandoeningen. Nederlandse cijfers laten zien dat het ook in ons eigen land nog steeds een groot probleem vormt. Volgens de Hartstichting zijn er in Nederland ruim 1.4 miljoen patiënten met enige vorm van hart- en vaatziekten en wat wellicht nog meer tot de verbeelding spreekt, is dat er geschat wordt dat er dagelijks zo'n 100 mensen sterven aan een cardiovasculaire aandoening in Nederland. Niettemin is dit aantal tussen 1980 en 2016 al sterk gedaald doordat we beter zijn geworden in het managen van de onderliggende oorzaak; slagaderverkalking.

## Atherosclerose

Slagaderverkalking of *atherosclerose* is een aandoening waarbij er verdikkingen plaatsvinden in de vaatwand, deze worden over het algemeen *laesies* of *plaques* genoemd. In eerste instantie wordt een dergelijke laesie veroorzaakt door schade aan de vaatwand, wat door meerdere risicofactoren verergert of versneld kan worden, bijvoorbeeld alcoholgebruik, roken, overgewicht en hoge bloeddruk. Schade aan de vaatwand in combinatie met een hoog cholesterolgehalte leidt ertoe dat het cholesterol zich gaat ophopen binnen de vaatwand. Vaak spreekt men hier wel over het slechte cholesterol genaamd lage-dichtheids lipoproteïne, oftewel *LDL*. Het *LDL* wat zich binnen de vaatwand bevindt zorgt ervoor dat de cellen die de vaatwand bekleden, endotheelcellen, geactiveerd raken. Deze cellen brengen vervolgens bepaalde signaaleiwitten tot expressie die immuun cellen vanuit de bloedbaan de vaatwand in kunnen trekken. In eerste instantie zijn dit voornamelijk monocytën, die onder invloed van verschillende factoren binnenin het weefsel verder ontwikkelen tot macrofaag. Ondertussen ondergaat het cholesterol binnen in de vaatwand verschillende veranderingen waardoor het cholesterol verandert in geoxideerd cholesterol of *oxLDL*. Deze verandering van het *LDL* tot *oxLDL* leidt ertoe dat het immuunsysteem dit cholesterol gaat beschouwen als lichaamsvreemde stof. Het is geen toeval dat het immuunsysteem als eerste reageert via macrofagen. De letterlijke vertaling vanuit het oude Grieks voor deze macrofagen is namelijk veelvraten. Deze naam gaat gepaard met hun functie, namelijk het opeten of fagocyteren van externe stoffen. Dit is exact wat de macrofagen in de vaatwand doen, zij fagocyteren het

schadelijk oxLDL en ruimen op deze manier het bloedvat op. Macrofagen die grote hoeveelheden vetten zoals cholesterol gefagocyteerd hebben, hebben onder de microscoop een "schuimig" uiterlijk en worden daarom ook wel *schuimcellen* genoemd. In deze fase van atherosclerose is de verdikking van de vaatwand nog minimaal en over het algemeen compleet zonder symptomen voor de patiënt. Dit soort laesies, in deze fase *fatty streaks* genoemd, komen vaak ook al voor in jongvolwassenen en horen in zeker zin tot een normaal ouderdomsverloop.

Echter, zolang de patiënt geen actie onderneemt om het hoge cholesterolgehalte te verminderen, blijft het zich ophopen in de vaatwand, wat ertoe leidt dat de macrofagen niet meer om kunnen gaan met de grote hoeveelheid oxLDL. Vanaf dit punt wordt het initieel beschermende karakter van de immuunreactie meer en meer een schadelijk proces. Het begint bij de macrofagen die uiteindelijk zo vol zitten met oxLDL, dat ze hierdoor afsterven via een proces genaamd *apoptose*. Cellen die sterven geven allerlei stoffen af die zich normaal gesproken exclusief binnen een cel bevinden. Zodra deze stoffen buiten een cel komen, herkennen immuun cellen dit als een schadelijk en lichaamsvreemd proces en sturen ze extra immuun cellen hierop af. De schuimcellen zelf en de endotheelcellen scheiden ondertussen ook signaalstoffen uit om extra hulp in te roepen van het immuunsysteem. Het immuunsysteem is dan al niet meer in staat om de ophoping van oxLDL tegen te gaan en juist door de komst van andere immuun cellen zoals, neutrofielen, dendritische cellen, B cellen en T cellen, neemt de verdikking van de vaatwand alsmaar toe. Door de heftige immuunreactie raken ook de omliggende gladde spiercellen van de vaatwand geactiveerd. Deze cellen migreren richting de laesie en vormen een beschermende laag over de ophoping van vetten en immuun cellen, zodat dit niet blootgesteld kan worden aan het bloed. Ze produceren daarnaast ook collageen strengen die er voor zorgen dat al het geaccumuleerde materiaal op zijn plek blijft. Deze gladde spiercellen zorgen in eerste instantie dus voor stabilisatie van de laesie. Stabiele laesies leiden vaak nog niet tot grote complicaties, maar de vernauwing van het bloedvat (*stenose*) kan op zichzelf al leiden tot problemen. Een dergelijke stenose kan dusdanig ernstig worden dat het weefsel achter de vernauwing onvoldoende doorbloed raakt of *ischemisch* wordt. In minder zware vormen kan dit leiden tot druk op de borst (*angina pectoris*) of bijvoorbeeld kortademigheid.

Zwaardere complicaties zijn vaak het gevolg van een instabiel geraakte laesie, wat veroorzaakt wordt door meerdere processen. Ten eerste ontstaat er zodra er meer en meer immuun cellen in de vaatwand sterven een zogenaamde *necrotische kern*. De aanwezigheid van deze ophoping van kapotte cellen en afvalstoffen draagt bij aan het instabiel worden van de laesie. Ten tweede wijzen veel wetenschappelijke

studies er op dat de gladde spiercellen hun stabiliserende functie langzamerhand verliezen doordat de beschermende laag en de collageen strengen weer worden afgebroken. Dit alles kan leiden tot het scheuren van de laesie waarbij de inhoud aan het bloed bloot gesteld wordt. Hierbij vormt zich dan een stolsel of *trombus* dat de bloedtoevoer naar het achterliggende weefsel compleet kan afsluiten. Afhankelijk van de locatie kan dit leiden tot bijvoorbeeld een hart- of herseninfarct.

Bij acute complicaties zijn er verschillende opties om de bloedtoevoer te herstellen. Eén daarvan is om te dotteren. Hierbij wordt er gebruik gemaakt van een soort ballon die opgepompt wordt binnen het bloedvat om zodanig weer voldoende bloed naar het achterliggende weefsel toe te laten. In veel gevallen wordt er dan ook gebruik gemaakt van een stent (een soort veertje) dat in het bloedvat wordt geplaatst dat voorkomt dat het vat zich weer sluit na het dotteren. Indien de slagader ernstig vernauwd of compleet afgesloten is, kan er ook gekozen worden voor een zogenaamde bypass operatie. Hierbij wordt een ader uit een ander deel van het lichaam verwijderd en wordt hiermee een omleiding van de bloedtoevoer naar het afgesloten weefsel gemaakt. Een andere operatieve behandeling houdt in dat de complete laesie verwijderd wordt door middel van een endarterectomie. Al deze invasieve methoden hebben als nadeel dat ze vaak door de chirurgische handelingen ook schade aan het bloedvat leveren. Deze schade heeft weer ten gevolge dat de kans op een nieuwe vernauwing, *restenose*, zeer groot is. Hierom en vanwege de niet geringe risico's die gepaard gaan met deze ingrepen, blijft het voorkomen van acute cardiovasculaire complicaties van zeer groot belang.

Hiertoe is een verandering in levensstijl is vaak een eerste optie, gezien veel patiënten in de huidige Westerse maatschappij blootgesteld zijn aan een groot aantal risicofactoren (alcoholgebruik, roken, sedimentaire levensstijl, overgewicht). Ten tweede wordt er vaak gebruikt gemaakt van cholesterol verlagende middelen, meestal in de vorm van statines. Statines remmen de aanmaak van cholesterol in de lever en zijn de reden dat er een sterke afname in cardiovasculair-gerelateerde sterfgevallen zijn sinds de jaren 80. Er is gebleken dat ze het risico op hart- en vaatziekten met circa 25% verminderen. Vrij recent zijn er nieuwe middelen op de markt gekomen die cholesterol niveaus kunnen verminderen via het remmen van PCSK9. Dit eiwit zorgt voor de afbraak van de receptor voor het slechte cholesterol, de LDL receptor. Door dit eiwit te blokkeren, zijn er meer LDL receptoren die LDL wegvangen uit de bloedsomloop en waardoor de cholesterol concentratie wordt verlaagd. Ondanks de grote successen die behaald zijn met cholesterol verlagende middelen, hebben ze als groot nadeel dat ze bestaande laesies niet of nauwelijks beïnvloeden. Over het algemeen krijgen patiënten pas symptomen (en dus behan-

deling) op het moment dat de laesies al vrij groot zijn geworden en er al een heftige immuunrespons plaatsvindt binnen het bloedvat. Naast de cholesterolverlagende middelen is het immuunsysteem daarom een tweede belangrijke pijler waarop men therapeutisch in kan grijpen bij aderverkalking. Deze ontstekingstheorie heeft in de afgelopen decennia veel aandacht gekregen in de onderzoekswereld. Een belangrijke mijlpaal werd vrij onlangs bereikt toen een grote klinische studie aantoonde dat het remmen van de ontstekingsfactor interleukine-1 $\beta$  resulteerde in 15% minder sterfgevallen als gevolg van een cardiovasculaire complicatie. Dit onderzoek bewees dat de ontstekingstheorie van aderverkalking ook daadwerkelijk succesvol vertaald kon worden naar een klinische therapie. Echter, vergeleken met het onderzoek naar cholesterolverlagende middelen, staat het onderzoek naar het immuunsysteem voor de behandeling van hart- en vaatziekten nog in de kinderschoenen en valt er nog veel winst te boeken. Dit onderstreept duidelijk het belang van verder onderzoek naar de invloed van specifieke immuun cellen en ontstekingsfactoren op de ontwikkeling van atherosclerose.

## Het immuunsysteem

Het immuunsysteem is de belangrijkste verdediging van het lichaam tegen externe en interne ziekteverwekkers of schadelijke processen. Een van de belangrijkste taken hierbij is om onderscheid te kunnen maken tussen lichaamseigen en niet-lichaamseigen cellen en moleculen. De wijze waarop immuun cellen dit onderscheid kunnen maken verdeelt het immuunsysteem grofweg in twee takken: aangeboren of aspecifieke immuniteit en verworven of specifieke immuniteit.

Vrijwel alle organismen bezitten een vorm van het aangeboren immuunsysteem. Deze aspecifieke immuniteit herkent met behulp van speciale receptoren patronen en structuren die vaak voorkomen op bacteriën en/of virussen, maar kan hierbij geen onderscheid maken tussen specifieke pathogenen. Het grote voordeel van een dergelijk afweersysteem is dat het snel kan reageren op potentieel gevaar. De monocyten en macrofagen die al eerder benoemd waren zijn onderdeel van het aangeboren immuunsysteem, evenals de dendritische cel. Zowel macrofagen als dendritische cellen controleren de extracellulaire ruimtes en kunnen moleculen die niet in het lichaam thuis horen fagocyteren en zijn op die manier onderdeel van de eerstelijnsafweer. Daarnaast hebben zij nog een tweede zeer belangrijke functie, namelijk verbinding maken met cellen van de verworven immuniteit. Nadat een macrofaag of dendritische cel een bepaald niet-lichaamseigen molecuul heeft gefagocyteerd, zorgt deze cel ervoor dat (gedeeltes van) dit molecuul aan de buitenkant



van zijn celmembraan op een herkenbare manier gepresenteerd worden aan cellen van de specifieke afweer. Daarom worden macrofagen en dendritische cellen ook wel antigeen-presenterende cellen genoemd.

Immuun cellen van de specifieke afweerreactie hebben over het algemeen hulp nodig van antigeen-presenterende cellen en deze reactie komt daarom ook langzamer op gang dan de aangeboren afweer. De belangrijkste cellen van deze tak van het immuunsysteem zijn B- en T-lymfocyten. Deze B en T cellen zijn zeer gespecialiseerde ontstekingscellen zodat elk van deze cellen maar één specifiek molecuul kan herkennen. In de ontwikkeling van deze cellen wordt elke B of T cel die een lichaamseigen molecuul herkent verwijderd, waardoor er alleen B en T cellen overblijven die lichaamsvreemde antigenen herkennen. Zodra een antigeen-presenterende cel moleculen presenteert op de buitenkant van zijn celmembraan en een B of T cel dat specifieke antigeen herkent, raakt de cel geactiveerd. Deze activatie leidt er voornamelijk toe dat de cel zich veelvuldig gaat delen, zodat er een grote populatie aan immuun cellen ontstaat dat dit antigeen herkent. Geactiveerde T cellen zorgen voornamelijk voor de afweer tegen pathogenen die zich binnenin cellen bevindt door ontstekingsfactoren uit te scheiden of door geïnfecteerde cellen direct kapot te maken.

B cellen daarentegen scheiden antistoffen uit die in het bloed circuleren en het specifieke antigeen kunnen neutraliseren. Nadat alle gevaarlijke antigenen opgeruimd zijn door het immuunsysteem differentieert een kleine groep van specifieke B en T cellen zich tot geheugencellen. Deze populatie van geheugencellen kan zeer lang overleven in het lichaam en zorgt ervoor dat bij een volgende infectie met dit antigeen de specifieke afweerreactie veel sneller en sterker zal zijn. Dit geheugen van het specifieke afweersysteem vormt de basis van vaccinaties, waarbij een klein, niet gevaarlijk, gedeelte van een pathogeen wordt geïnjecteerd. De patiënt raakt hier niet ziek van, maar creëert wel een populatie geheugencellen zodat bij een daadwerkelijke infectie, de patiënt beschermd is door een effectieve immuunreactie.

## Dit proefschrift

Centraal in deze thesis staat de ontstekingstheorie van atherosclerose, waarbij ervan uit gegaan wordt dat het remmen van de immuunreactie een gunstig effect zal hebben op het ziekte verloop. Het belangrijkste celtype dat dit proefschrift daarbij behandelt is de B cel. Het klassieke kenmerk van B cellen is zogezegd de productie van antistoffen of antilichamen. In de laatste decennia is de niet-klassieke rol van B

cellen desalniettemin steeds duidelijker geworden. Zo zijn B cellen bijvoorbeeld ook zeer goed antigeen-presenterende cellen en kunnen ze een grote verscheidenheid aan ontstekingsmediatoren uitscheiden. Daarnaast zijn er ook nieuwe type B cellen gevonden, waarvan het onbekend was welke rol deze speelden in de pathofysiologie van aderverkalking. In dit proefschrift is geprobeerd op verschillende manieren B cellen te beïnvloeden waarbij we ons geconcentreerd hebben op de nieuwe type B cellen en niet-klassikale functies om te onderzoeken wat hiervan het effect zou zijn op aderverkalking,

In **hoofdstuk 2** hebben we het laatste onderzoek naar de rol van B cellen bij aderverkalking samengevat en zijn we specifiek ingegaan op potentiële functies van nieuwe type B cellen. B cellen kunnen over het algemeen in twee verschillende types onderscheiden worden: B1 en B2 cellen. B2 cellen komen veruit het meeste voor en ontwikkelen zich in het beenmerg en circuleren vervolgens in het bloed en lymfoïde organen, zoals de milt. Hier ontwikkelen de meeste B2 cellen zich verder tot folliculaire B cellen, terwijl een kleinere populatie differentieert in marginale zone B cellen. Deze verschillende type B2 cellen reageren op andere stimuli en hebben ook een verschillend effect op aderverkalking. Alle B cellen bezitten een specifieke receptor die grotendeels bestaat uit een antistof dat zich in het celmembraan bevindt. Wanneer deze receptor zijn specifieke antigeen herkent en bindt, is dat het eerste activatiesignaal voor een B cel. De B cellen fagocyteren vervolgens het gebonden antigeen en presenteren gedeeltes ervan aan de buitenkant van het celmembraan. Voor de activatie van folliculaire B cellen is het noodzakelijk dat een naburige T cel ook het gepresenteerde antigeen herkent. Deze T cel zal vervolgens ook geactiveerd raken en een verscheidenheid aan mediators en stoffen uitscheiden die het tweede activatiesignaal vormen voor de B cel. De B cellen zullen vervolgens gaan delen en via complexe selectieprocedure, waarbij T cellen wederom een belangrijke rol spelen, ontstaat er een populatie van B cellen met een receptor die zeer specifiek en met een hoge affiniteit aan het antigeen kan binden. Deze populatie ondergaat vervolgens een verandering waarbij het grootste gedeelte differentieert in plasma cellen, wat feitelijk cellen zijn die zeer grote hoeveelheden antistoffen uitscheiden om het antigeen te neutraliseren. De overige B cellen zullen differentieëren in geheugen B cellen. In aderverkalking nog niet volledig bekend wel antigeen verantwoordelijk is voor de immuunreactie. Er wordt vaak aangenomen dat het belangrijkste eiwit in LDL, het ApoB100 eiwit, het meest bijdraagt aan de immuunreactie. Onderzoek heeft uitgewezen dat er inderdaad antistoffen tegen ApoB100 gemaakt kunnen worden, maar er is nog geen duidelijke consensus of dat deze antistoffen bijdragen aan verslechtering van de ziekte. Dit komt mede doordat er een grote verscheidenheid aan verschillende type antilichamen zijn. Folliculaire B

cellen scheiden met name antilichamen uit van het IgG type. Alhoewel hier ook nog geen sluitend bewijs voor is, wijst de meeste data er op dat deze type antistoffen atherosclerose verergeren. In ieder geval is het vanuit onderzoek wel duidelijk dat folliculaire B cellen bijdragen aan de ontwikkeling van aderverkalking, aangezien verwijdering van deze B cellen leidt minder aderverkalking optreedt. Niettemin is het exacte mechanisme hierachter nog niet geheel duidelijk.

Terwijl folliculaire B cellen afhankelijk zijn van de hulp van T cellen, kunnen marginale zone B cellen ook reageren op antigeen zonder T cellen. Onlangs is gebleken dat deze marginale zone B cellen juist beschermend werken bij aderverkalking. Ditzelfde geldt voor de B1 cellen. Deze B1 cellen ontwikkelen zich niet vanuit het beenmerg zoals B2 cellen, maar vanuit de lever van de foetus. Een belangrijke eigenschap van B1 cellen is dat ze ook zonder antigeen grote hoeveelheden antistoffen uitscheiden van het type IgM. Deze antilichamen kunnen een groot scala aan antigenen binden, waaronder oxLDL. Onderzoek wijst uit dat neutralisatie van oxLDL door deze natuurlijke antilichamen een groot onderdeel is van de beschermende functie achter B1 cellen.

Naast deze indeling in B1 en B2 cellen zijn we in hoofdstuk 2 ingegaan op nieuwe subsets van B cellen, die vaak niet geheel binnen deze B1/B2 classificatie vallen. Het belangrijkste subtype wat wij hier behandeld hebben is de zogenaamde regulatoire B cel. Het immuunsysteem heeft bepaalde mechanismen ingebouwd waarbij het zichzelf kan reguleren in het geval het gevaar geweken is of indien er geen actieve immuunrespons gewenst is. Het meest bekend en veruit het meest intensief onderzochte type cel in dit aspect is de regulatoire T cel. Dit type T cel kan door bijvoorbeeld de secretie van de remmende mediators zoals interleukine-10 de activatie van overige immuun cellen remmen. In de afgelopen jaren heeft onderzoek aangetoond dat er binnen de B cellen ook een dergelijk type B cel bestaat dat het immuunsysteem kan remmen. Er zijn verscheidene manieren waarop deze B cellen functioneren, maar de bijdrage van deze verschillende functies en type B cellen aan de ontwikkeling van aderverkalking was nog geheel onbekend.

In **hoofdstuk 3** zijn wij daarom gaan onderzoeken wat het effect is van B cellen die interleukine-10 kunnen uitscheiden op de ontwikkeling van atherosclerose. Gezien het overtuigende bewijs dat regulatoire T cellen die interleukine-10 aanmaken beschermend zijn, was onze hypothese dat deze regulatoire B cellen dat ook zouden zijn. Ons eerste experiment bestond uit het observeren van het aantal interleukine-10 producerende B cellen in gezonde en atherosclerotische muizen. We vonden dat de zieke muizen significant minder van deze B cellen hadden dan

gezonde muizen. Omdat dit uitwees dat bij het ontwikkelen van aderverkalking de populatie regulatoire B cellen afnam, besloten wij om te proberen om deze populatie in stand te houden tijdens een tweede experiment. Hiertoe ontwikkelden we een kweekprotocol waarmee we *in vitro* aan grote hoeveelheden van interleukine-10 producerende B cellen konden komen. Deze injecteerden we tijdens de loop van het experiment een aantal keer in één groep muizen. Aan het einde van het experiment vergeleken we het immuunsysteem van deze muizen, met het immuunsysteem van muizen die ofwel geen B cellen hadden gekregen of B cellen die geen interleukine-10 kunnen produceren. De eerste resultaten waren veelbelovend; het immuunsysteem in de muizen die interleukine-10 producerende B cellen kregen was duidelijk geremd. We zagen een afname in het aantal ontstekingscellen, een afname in de T cel activatie en juist een toename in het aantal regulatoire T cellen. Toen we echter de mate van aderverkalking bepaalden zagen we dat dit uiteindelijk niet het volledig gewenste effect had bewerkstelligd. De muizen die waren geïnjecteerd met B cellen die geen interleukine-10 kunnen uitscheiden, hadden een sterke verergering van aderverkalking. Deze observatie was nog volgens de hypothese, aangezien deze niet-interleukine 10 producerende B cellen feitelijk folliculaire B cellen zijn. Niettemin zagen we dat de muizen die de interleukine-10 producerende B cellen hadden ontvangen geen extra bescherming hadden ondervonden; zij toonden dezelfde mate van aderverkalking als muizen die geen B cellen hadden gekregen. Verdere analyse vertoonde tot onze initiële verbazing dat zowel de muizen die de niet-interleukine 10 producerende B cellen als wel de muizen die de interleukine 10 producerende B cellen hadden gekregen, een significante verhoging van cholesterol hadden. Zoals besproken is cholesterol een zeer belangrijke determinant voor de mate van aderverkalking, dus deze bevinding zou kunnen verklaren waarom we ondanks de remming van het afweersysteem geen effect op aderverkalking zagen met de interleukine-10 producerende B cellen. Verdere experimenten suggereerden dat dit effect op cholesterol mogelijk door ons kweekprotocol zou kunnen komen. Uit het gehele hoofdstuk kunnen we concluderen dat interleukine-10 producerende B cellen minder aanwezig zijn in atherosclerotische muizen en dat injectie van deze cellen leidt tot remming van het afweersysteem. Niettemin had dit geen effect op aderverkalking, wellicht doordat deze effecten gemaskeerd werden door een verhoging in cholesterol.

In **hoofdstuk 4** hebben we op een andere manier geprobeerd om interleukine-10 producerende B cellen te beïnvloeden. Eerder onderzoek had aangetoond dat een specifiek eiwit genaamd TIM-1 erg belangrijk was voor de ontwikkeling van B cellen tot regulatoire B cellen. Muizen die dit eiwit missen hebben vrijwel geen interleukine-10 producerende B cellen. Via een speciale virusinjectie hebben wij de

ontwikkeling van aderverkalking in deze muizen die TIM-1 missen (TIM1<sup>-</sup>) kunnen vergelijken met normale wild-type (WT) muizen. We observeerden inderdaad dat deze TIM1<sup>-</sup> muizen een verminderd aantal regulatoire B cellen hadden ten opzichte van WT muizen. Dit ging ook gepaard met een toename van B en T cellen in de milt. Ook de immuunreactie van de T cellen was opgeschoven naar een meer schadelijke response. Gezamenlijk leidde dit uiteindelijk tot een sterke toename van aderverkalking in TIM1<sup>-</sup> muizen ten opzichte van WT muizen. Het TIM-1 eiwit bevindt zich niet alleen op B cellen en de verwijdering van TIM-1 in deze muizen kan ook effecten hebben gehad op andere cel populaties. Evengoed suggereert deze data dat TIM-1 een belangrijk eiwit is bij de ontwikkeling van aderverkalking en dat dit effect gemedieerd wordt via regulatoire B cellen.

Een andere regulatoire B cel populatie hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht. Hier hebben we ons geconcentreerd op B cellen die het eiwit PD-L1 hoog tot expressie brengen. Dit eiwit kan binden aan PD-1 op T cellen, wat er vervolgens voort zorgt dat deze T cel geremd wordt in zijn functie. De meeste T cellen die PD-1 tot expressie brengen zijn zogenaamde folliculaire T helper cellen, die hulp bieden aan folliculaire B cellen bij het ontwikkelen tot plasma cellen. Aangezien het bekend is dat deze folliculaire B cellen aderverkalking verergeren, stelden wij dat B cellen met hoge PD-L1 expressie wellicht zouden kunnen leiden tot een vermindering van aderverkalking. Deze PD-L1<sup>hi</sup> B cellen komen vrij weinig voor daarom zijn wij op zoek gegaan naar een methode om PD-L1 op meer B cellen tot expressie te brengen. Wij vonden dat wanneer B cellen vierentwintig uur werden gestimuleerd met de stof interferon-gamma, dat vrijwel alle B cellen PD-L1 gingen aanmaken en dat het overgrote gedeelte zeer veel PD-L1 tot expressie bracht. Deze cellen hebben we vervolgens zowel *in vitro* als *in vivo* getest om te onderzoeken of ze inderdaad folliculaire helper T cellen konden remmen en in beide situaties ondervonden we dat deze cellen zeer effectief waren hierin. Vervolgens hebben deze cellen geïnjecteerd in muizen om het effect hiervan op aderverkalking te evalueren. Wij zagen toen dat de totale verdikking in de aderen van muizen die de interferon-gamma gestimuleerde B cellen hadden gekregen significant minder was dan muizen die deze B cellen niet hadden gekregen. Vergeleken met muizen die niet-gestimuleerde B cellen hadden gekregen was het verschil net niet statistisch significant, maar ook duidelijk aanwezig. Kortom, stimulatie van B cellen met de stof interferon-gamma resulteerde in hoge expressie van PD-L1 waarmee folliculaire helper T cellen konden worden geremd en aderverkalking werd verminderd.

In **hoofdstuk 6** hebben we een andere manier gebruikt om de B cel reactie te moduleren. Activatie van B en T cellen vereist naast het antigeen vaak nog een twee

signaal via co-receptoren. Dit signaal komt vaak van antigeen-presenterende cellen en kan zowel stimulerend als remmend werken. Een redelijk recent beschreven co-receptor is BTLA (B- and T-lymphocyte attenuator) dat een remmende functie heeft. Deze remmende co-receptoren zijn interessant voor de mogelijke behandeling van aderverkalking, omdat wanneer het lukt deze remmende functie te versterken, het immuunsysteem wordt gedempt en aderverkalking wellicht afneemt. In de eerste experimenten gingen wij onderzoeken op welk type cellen BTLA tot expressie kwam. We zagen zowel in de mens als de muis dat BTLA voornamelijk op B cellen voorkwam en specifiek op de folliculaire B cellen. Daarom kozen wij ervoor om muizen te behandelen met een antilichaam dat bindt aan BTLA en de remmende werking van BTLA in gang zet. Behandeling van muizen met dit specifieke antilichaam zorgde ervoor dat de folliculaire B cellen zeer sterk afnamen, terwijl beschermende B cel populaties zoals de B1 cellen en interleukine-10 producerende B cellen in aantallen niet afnamen. Dit resulteerde feitelijk in dat de B cel populatie overwegend uit beschermende B cellen bestond in de behandelde muizen. Verdere analyse toonde aan dat de gehele immunorespons en met name de T cel reactie verschoof richting een meer beschermend karakter. Evaluatie van aderverkalking wees uit dat het gebruikte BTLA antilichaam aderverkalking had geremd ten opzichte van geen behandeling of behandeling met een controle antilichaam. In een andere proef bekeken we ook het effect van dit BTLA antilichaam op al bestaande laesies. We ondervonden dat de laesies niet kleiner werden, maar wel stabiel wat evengoed een zeer belangrijke parameter is. In dit hoofdstuk konden we concluderen dat stimulatie van BTLA met een antilichaam er voor zorgt dat folliculaire B cellen worden geremd en dat dit een gunstig effect heeft op de ontwikkeling van aderverkalking.

In **hoofdstuk 7** hebben wij een overkoepelende discussie geschreven over het totale werk wat in dit proefschrift aan bod komt. In het kort, concluderen wij hierin dat het onderzoek naar B cellen en aderverkalking enigszins is achtergebleven in de afgelopen jaren, terwijl er alle redenen toe zijn om dit onderzoek juist wel uit te voeren. De beschreven experimenten in dit proefschrift tonen namelijk aan dat B cellen een belangrijke rol spelen in de immunoreactie die optreedt tijdens aderverkalking en dat wanneer deze rol wordt gemoduleerd er duidelijke effecten optreden. Het bewijs dat hiervoor is aangevoerd in dit proefschrift is overwegend uitgevoerd in muizen en van een observerend karakter. Om deze resultaten te kunnen vertalen naar daadwerkelijke klinische toepassingen zal er in eerste instantie verder onderzoek gedaan moeten worden in kleine patiënt groepen of op humaan weefsel. Dat type onderzoek vergt vaak ook dat er nog meer mechanistische studies in muizen worden gedaan die dieper ingaan op de achterliggende werking van eventuele therapieën. Op dit moment zijn er al middelen voorhanden die B cellen kunnen depletieren of

verwijderen in mensen. Deze worden al toegepast voor de behandeling van met name reuma, maar nog niet voor cardiovasculaire ziekten. Wel zijn er al preliminaire aanwijzingen gevonden dat reuma patiënten die behandeld zijn met een dergelijk middel, minder risico lopen op hart- en vaatziekten. Het is aannemelijk dat deze middelen die alle B cellen remmen of verwijderen als eerste toegepast zullen worden in de klinische setting voor hart- en vaatziekten. Echter laat het bewijs uit de literatuur en in dit proefschrift zien dat het van essentieel belang is om specifieke subsets te remmen dan wel te stimuleren. Daarnaast hebben alle experimenten in deze thesis de B cel reactie beïnvloedt, maar niet of nauwelijks de antilichaam productie van B cellen. Dit benadrukt de grote invloed van niet-klassikale functies van B cellen in het algemeen en in de context van atherosclerose.

Het doet me deugd om te zien dat er tijdens het werken aan deze thesis langzamerhand weer meer en meer publicaties verschijnen die eenzelfde invalshoek hebben als het werk in dit proefschrift. Dit geeft aan dat de rol van B cellen in aderverkalking in de onderzoek community meer aandacht krijgt en de experimenten in dit proefschrift zijn een goede basis om hier in de toekomst meer onderzoek naar te doen.

