



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Single-cell immune profiling of atherosclerosis: from omics to therapeutics

Depuydt, M.A.C.

Citation

Depuydt, M. A. C. (2024, March 28). *Single-cell immune profiling of atherosclerosis: from omics to therapeutics*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3729855>

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/1887/3729855>

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





Appendix

Nederlandse samenvatting



Introductie

Hart- en vaatziekten, ofwel cardiovasculaire aandoeningen, omvatten alle ziekten die het hart en/of de bloedvaten aantasten. Jaarlijks sterven wereldwijd gemiddeld 17,9 miljoen mensen als gevolg van hart- en vaatziekten. Cardiovasculaire aandoeningen zijn daarmee tezamen de meest voorkomende doodsoorzaak ter wereld^{1,2} en hebben daarom een grote maatschappelijke impact. Uit cijfers van de Nederlandse Hartstichting blijkt dat in Nederland 1,7 miljoen mensen te maken hebben met een vorm van cardiovasculair lijden. Het feit dat er dagelijks 103 sterfgevallen zijn als gevolg van deze ziekten, illustreert de noodzaak voor een betere behandeling voor deze patiënten. 85% van de hart- en vaatziekten wordt gecategoriseerd als *atherosclerotische cardiovasculaire ziekten*.³ Hieronder vallen onder andere een hartinfarct, een herseninfarct en een aneurysma.⁴ Al deze aandoeningen hebben één gemeenschappelijke onderliggende oorzaak: slagaderverkalking of *atherosclerose*.

Atherosclerose

Atherosclerose wordt gekenmerkt door een verdikking van de binnenwand van de middelgrote tot grote slagaders.⁵ Deze verdikking wordt een *plaque* of een *laesie* genoemd. Het ontstaan van deze plaque is het gevolg van een excessieve ophoping van vetten in de vaatwand met een daaropvolgende chronische ontstekingsreactie. Er zijn meerdere risicofactoren die de ontwikkeling van slagaderverkalking versnellen, waaronder veroudering, een sedentaire levensstijl, een ongezond dieet, roken, hoge bloeddruk, verhoogd cholesterol, obesitas, diabetes type II en genetische aanleg.⁶

Slagaderverkalking begint met schade aan het bloedvat. Onder andere een verhoogde bloeddruk en een toename van het *lage-dichtheids lipoproteïne (LDL-) cholesterol* in het bloed zorgen ervoor dat de cellen die de vaten bekleden, de *endotheelcellen*, beschadigd raken. De endotheelcellen voorkomen normaliter dat ongewenste substanties vanuit het bloed in het omliggend weefsel terecht komen. Echter, met de initiatie van atherosclerose, wordt deze endotheellaag doorlaatbaar, waardoor er LDL-cholesterol in de vaatwand terecht kan komen. Deze endotheelcellen worden vervolgens geactiveerd en brengen verschillende signaalmoleculen tot expressie. Deze signaalmoleculen zorgen ervoor dat ontstekingscellen, of *immuuncellen*, naar de beschadigde vaatwand migreren. In de vaatwand wordt het LDL-cholesterol deeltje gemodificeerd en vormt *oxLDL*. Dit oxLDL wordt gezien als een lichaamsvreemde stof, die door de immuuncellen opgeruimd moet worden. Hiermee start de chronische ontstekingsreactie. *Monocyten* uit het bloed worden door de geactiveerde

endotheelcellen aangetrokken, waarna deze de vaatwand ingaan. Door verschillende lokale factoren zullen de monocytten in de vaatwand verder ontwikkelen tot *macrofagen*. De macrofaag is een cel die is gespecialiseerd in het opruimen van resten van dode cellen of lichaamsvreemde stoffen. Dit proces wordt ook wel *fagocytose* genoemd. In de vaatwand neemt de macrofaag de oxLDL-deeltjes op. De continue opname van deze cholesteroldeeltjes leidt tot het vormen van vetdruppeltjes in de macrofaag. Onder de microscoop krijgen deze vetrijke macrofagen een schuimig uiterlijk en daarom worden deze cellen ook wel *schuimcellen* of *foam cells* genoemd. De initiële verdikking van de vaatwand door de endotheelschade, de accumulatie van oxLDL en de infiltratie van de eerste ontstekingscellen wordt een *fatty streak* genoemd. Als de cholesterolconcentraties in het bloed voldoende verlaagd worden, kan deze fatty streak weer bijna volledig verdwijnen. Echter, de vorming van een fatty streak ontstaat vaak zonder enige klinische symptomen en wordt dus vaak niet op tijd opgemerkt. Daardoor zal de slagaderverkalking verder ontwikkelen in meer geavanceerde plaques die leiden tot klinische verschijnselen.

Als het cholesterolgehalte in het bloed voor langere tijd te hoog blijft, wordt de hoeveelheid oxLDL in de vaatwand zo hoog dat de schuimcellen het niet goed meer op kunnen ruimen. De schuimcellen zijn niet meer in staat de grote hoeveelheid oxLDL te verwerken en zullen overgaan op geprogrammeerde celdood, *apoptose*. Tegelijkertijd zullen er ook andere ontstekingscellen worden aangetrokken door de signaalstoffen die worden uitgescheiden door zowel de geactiveerde endotheelcellen als de levende en apoptotische schuimcellen. Deze ontstekingscellen, bestaande uit *neutrofielen*, *dendritische cellen*, *mestcellen*, *B-* en *T-cellen*, zullen ook ophopen in de vaatwand waardoor de verdikking van het vat nog meer toeneemt. Als gevolg van de ontstekingsreactie die plaatsvindt, raken ook de *gladde spiercellen* van het bloedvat geactiveerd. Normaliter zijn de gladde spiercellen betrokken bij het samentrekken van het bloedvat wat nodig is om een goede bloedstroom te creëren. Door de verergerde ontstekingsreactie in het vat zullen deze cellen migreren naar de plaque en zich ophopen onder de endotheellaag. Hiermee vormen ze een beschermende laag, de *fibrous cap*, over de laesie en produceren ze stabiliserende factoren zoals collageen om te voorkomen dat de plaque gaat scheuren. Recent onderzoek heeft ook uitgewezen dat gladde spiercellen zich zo kunnen differentiëren dat ze ook oxLDL-deeltjes kunnen opnemen en zo ook een schuimceluiterlijk krijgen.⁷⁻¹⁰ Hieruit blijkt dat deze cellen dus ook al betrokken kunnen zijn bij de formatie van de fatty streak. Zolang de plaque een intacte fibrous cap heeft, wordt hij stabiel geacht. Echter, deze stabiele plaque leidt wel tot een vernauwing van het bloedvat, ook wel *stenose* genoemd. Deze stenose zorgt voor een verminderde bloedtoevoer naar het omliggend weefsel. Dit kan de eerste klinische symptomen veroorzaken, waaronder kortademigheid en pijn op de borst (*angina pectoris*).

Acute complicaties ontstaan echter op het moment dat de plaque instabiel wordt. De toenemende inflammatoire omgeving zorgt ervoor dat niet alleen de schuimcellen, maar ook andere immuuncellen in de plaque, een gecontroleerde vorm van celdood zullen ondergaan. Deze dode cellen worden dan ook niet goed meer opgeruimd. Hierdoor vormt zich in de plaque een zogeheten *necrotische kern*, die bestaat uit een ophoping van afgestorven ontstekingscellen, vetten en andere afvalstoffen. Daarnaast scheiden de immuuncellen in de plaque verschillende pro-inflammatoire stoffen uit, die het weefsel wat de plaque stabiliseert, afbreken. Dit leidt tot het verdunnen van de fibrous cap. Dit zorgt er gezamenlijk voor dat de fibrous cap kan scheuren en dat de inhoud van de plaque, waaronder de necrotische kern, in contact komt met het bloed. Hierbij vormt zich een bloedstolsel of een *thrombus*. Deze thrombusvorming leidt dan tot een volledige afsluiting van de slagader (*occlusie*), waardoor er geen zuurstof meer vervoerd wordt naar de omliggende weefsels. Afhankelijk van de locatie leidt dit tot klinische complicaties zoals een hart- en herseninfarct.

De huidige primaire behandelmethode bij acute cardiovasculaire complicaties is revascularisatie. Dit omvat antitrombotische medicatie en/of verschillende chirurgische ingrepen om de doorbloeding van het vat te herstellen. Bij een hartinfarct vindt de occlusie plaats in de kransslagader van het hart, waardoor de hartspier niet van voldoende zuurstof kan worden voorzien. Over het algemeen is *dotteren* de eerste keus voor het chirurgisch herstellen van de aangedane vaten. Hierbij wordt een slangetje via een (slag)ader in de lies of in de arm naar de vernauwing gebracht. Op de plek van de occlusie wordt dan een klein ballonnetje opgeblazen die de ruimte waardoor het bloed kan stromen vergroot. Vaak wordt er dan ook nog een *stent* geplaatst, wat voorkomt dat het bloedvat weer afsluit na het dotteren. Soms is de occlusie zo ernstig dat het nodig is om een omleiding te maken rondom de vernauwde vaten, wat een *bypassoperatie* wordt genoemd. Bij een herseninfarct kan er ook voor gekozen worden om de volledige plaque uit de halsslagader te verwijderen. Deze operatie wordt een *carotide endarterectomie* genoemd. Ondanks dat deze chirurgische ingrepen op kortere termijn een oplossing bieden, zijn de operaties zeker niet risicovrij. Er kunnen peri-operatieve complicaties ontstaan die de kwaliteit van leven beïnvloeden. Verder bestaat er ook een kans dat er opnieuw een vernauwing in het geopereerde bloedvat ontstaat, ook wel *restenose* genoemd. Het tijdig herkennen en behandelen van slagaderverkalking is dus essentieel om chirurgische ingrepen in de toekomst te voorkomen.

Preventieve behandeling van slagaderverkalking start met het aanpassen van de levensstijl, zoals meer beweging, een gezond dieet en minder roken en alcoholconsumptie. De meest voorkomende farmacologische interventie is het

gebruik van *statines*. Gedurende lange tijd is slagaderverkalking gezien als een cholesterol-gedreven ziekte. Door middel van statines wordt het circulerend LDL-cholesterol verlaagd, wat geleid heeft tot een grote vooruitgang in de behandeling van hart- en vaatziekten. Desondanks zijn er terugkerende cardiovasculaire complicaties opgetreden bij meer dan 20% van de patiënten die na een acute klinische complicaties met een hoge dosis statines behandeld werd. Inmiddels is er ook een nieuwe strategie gevonden om de LDL concentratie in het bloed te verminderen. Het eiwit PCSK9 is verantwoordelijk voor het afbreken van de LDL receptor, waardoor de opname en klaring van LDL geremd wordt. Door het remmen van PCSK9 zijn er aanzienlijke verbeteringen in de cholesterolhuishouding verkregen in patiënten met hart- en vaatziekten.

In de afgelopen decennia heeft een groot aantal (experimentele) onderzoeken aangetoond dat het immuunsysteem een cruciale rol speelt bij de ontwikkeling en progressie van atherosclerose. Dit heeft ertoe geleid dat er recentelijk meerdere klinische studies zijn gestart waarbij therapeutisch wordt ingegrepen op de voortdurende chronische ontsteking bij patiënten met slagaderverkalking. De CANTOS studie was de eerste klinische studie waarbij werd behandeld met een antilichaam tegen de ontstekingsfactor *Interleukine 1 β* .¹¹ Dit is een toonaangevende studie gebleken, aangezien deze studie het eerste bewijs leverde dat aangrijpen op het immuunsysteem het risico op cardiovasculaire verschijnselen kon verlagen. Dit werd gevolgd door verschillende andere studies die ontstekingsremmende middelen toepasten, zoals anti-TNF, methotrexaat en colchicine, waarvan alleen de laatste effectief het risico op cardiovasculaire verschijnselen verminderde.¹²⁻¹⁵ Echter, er werden ook negatieve bijwerkingen van algemene immuunsuppressie waargenomen in deze studies. Aangezien immuuntherapie ook de algemene immuunrespons tegen bijvoorbeeld virussen en bacteriën kan beïnvloeden, ligt de volgende uitdaging in de identificatie van meer specifieke therapeutische aangrijpingspunten om enkel de ontstekingsreactie in de plaque te remmen.

Het immuunsysteem

Het immuunsysteem is verantwoordelijk voor de bescherming van het lichaam tegen infecties en weefselschade. Bij de ontwikkeling van immuuncellen, of witte bloedcellen, worden ze getraind in het onderscheiden van lichaamseigen en lichaamsvreemde cellen en moleculen. Het immuunsysteem wordt onderverdeeld in twee takken: het aangeboren en het adaptieve immuunsysteem, ook wel respectievelijk 'niet-specifiek' en 'specifiek' genoemd.

Het aangeboren immuunsysteem reageert als eerste en wordt of geactiveerd door fragmenten van lichaamsvreemde ziekteverwekkers, zoals bacteriën en virussen, of door signalen die worden verstrekt als gevolg van weefselschade (lichaamseigen). Afhankelijk van het ontvangen signaal reageren de aangeboren immuuncellen op de juiste manier. Immuuncellen die hierin een rol spelen zijn onder andere monocyten, macrofagen, dendritische cellen, neutrofielen en mestcellen. Een belangrijke functie van het aangeboren immuunsysteem is het activeren van het adaptieve immuunsysteem. Macrofagen en dendritische cellen controleren het lichaam op lichaamsvreemde stoffen. Zodra deze cellen die tegenkomen, worden deze stoffen verwerkt en zullen de macrofagen en dendritische cellen een klein fragment, een *antigeen*, hiervan op het celmembraan presenteren aan de specifieke afweer. Deze cellen worden dan ook *antigeen-presenterende cellen* genoemd.

De cellen die betrokken zijn bij de specifieke afweer zijn B- en T-cellen. T-cellen worden ontwikkeld in de thymus. Er zijn twee types T-cel die hier gevormd worden: de CD4⁺ en de CD8⁺ T-cel. CD4⁺ T-cellen zijn met name betrokken bij het reguleren van de ontstekingsreactie door ook omliggende cellen te activeren of remmen. CD8⁺ T-cellen staan vooral bekend om hun cytotoxische functie waarbij ze direct cellen die zijn geïnfecteerd met lichaamsvreemde ziekteverwekkers kunnen doden. In de thymus krijgt elke T-cel een unieke receptor (*T-cel receptor* - *TCR*) die aan één uniek antigeen kan binden. T-cellen worden geactiveerd als dat antigeen gepresenteerd wordt door een antigeen-presenterende cel. Voor deze activatie zijn drie signalen nodig: de eerste is de interactie tussen de TCR en het *MHC-molecuul* waarop het antigeen zit wat gepresenteerd wordt; het tweede en derde signaal zijn een *co-signalerend signaal* en een ontstekingsseiwit, een *cytokine*, wat geproduceerd wordt door de antigeen-presenterende cel. Met de laatste twee signalen wordt bepaald wat voor functie de T-cel krijgt na activatie. De functie van T-cellen is grofweg te onderscheiden in twee componenten: een pro-inflammatoire effector functie en een ontstekingsremmende regulatoire functie. Zodra de T-cel geactiveerd wordt zal deze zich gaan vermenigvuldigen en zo vormt zich een populatie van T-cellen met eenzelfde TCR. Dit proces wordt *klonale expansie* genoemd. Deze klonaal geëxpandeerde T-cellen zullen vervolgens migreren naar de plek waar het antigeen vandaan komt om het daar uit het lichaam te verwijderen. B-cellen hebben ook een unieke receptor (*B-cel receptor* - *BCR*). In tegenstelling tot T-cellen produceren B-cellen antistoffen na herkenning van het BCR-specifieke antigeen. Deze antistoffen circuleren in het bloed en zijn in staat om direct het antigeen te neutraliseren. Zowel B- als T-cellen vormen na de activatie een populatie *geheugencellen*. Dit zorgt ervoor dat deze B- en T-cellen bij een volgende infectie zich sneller kunnen vermenigvuldigen om hun anti-inflammatoire eigenschappen te kunnen uitvoeren. Het verkrijgen van dit

immunologisch geheugen is ook de basis van vaccinaties. Bij een vaccinatie wordt een onschadelijk stukje van de ziekteverwekker geïntroduceerd. Dit wordt gedaan om een eerste activatie van de specifieke afweercellen te initiëren en met name om geheugencellen te ontwikkelen die bij een infectie met de ziekteverwekker sneller kunnen reageren.

Single-cell RNA sequencing als tool voor target identificatie voor atherosclerose

Zoals hierboven beschreven heeft het ingrijpen op het immuunsysteem als behandeling voor slagaderverkalking veel potentie, maar is het essentieel om een atherosclerose-specifiek aangrijpingspunt hiervoor te identificeren. In het afgelopen decennium heeft er een hele snelle ontwikkeling plaatsgevonden van een techniek die daarbij van cruciale waarde kan zijn: *single-cell RNA sequencing (scRNA-seq)*.¹⁶ Met scRNA-seq kan men het volledige genexpressie profiel meten per individuele cel. Het voordeel hiervan is dat het data genereert met een hele hoge resolutie, waardoor een gedetailleerde beschrijving gemaakt kan worden van de cellen die in het weefsel zitten. Bij de meer conventionele analysemethoden is het nodig om op voorhand bepaalde cellulaire markers uit te kiezen om op basis daarvan cellen te onderscheiden. Het aantal markers wat meegenomen kan worden is echter beperkt. Het voordeel van scRNA-seq ten opzichte van deze technieken is dan ook dat door het meten van alle genen het mogelijk is om zeldzame celpopulaties te onderscheiden, die met de gekozen markers bij de andere technieken mogelijk niet aan het licht waren gekomen. Het single-cell veld is inmiddels al zodanig doorontwikkeld dat er naast genexpressie per cel, er ook additionele parameters per cel gemeten kunnen worden. Denk hierbij aan het meten van bijvoorbeeld de TCR of BCR (*single-cell TCR of BCR sequencing*), maar ook kan er inmiddels per cel bekeken worden hoe de genen op DNA niveau gereguleerd kunnen worden (*single-cell ATAC sequencing*). De verzamelnaam van deze geavanceerde technieken is *single-cell multi-omics*.

Dit proefschrift

In dit proefschrift hebben we single-cell multi-omics toegepast om een gedetailleerde cellulaire atlas van humane atherosclerose te genereren, met als doel de cellen die zich ophopen in de vergevorderde plaque beter te karakteriseren. Deze informatie kan vervolgens gebruikt worden om cellen en genen te definiëren die van therapeutisch belang kunnen zijn.

De opkomst van scRNA-seq heeft het cardiovasculair onderzoek in een stroomversnelling gebracht door de nieuwe inzichten in vasculaire ziekten, waaronder atherosclerose en aneurysma. Incidentie van aneurysma is de tweede aortaziekte die leidt tot cardiovasculaire sterfte. Door progressief verlies van gladde spiercellen en afbraak van bloedvat-verstevigend weefsel (*extracellulaire matrix*) wordt de vaatwand vatbaar voor scheuren, wat resulteert in ernstige klinische complicaties. In **hoofdstuk 2** hebben we een overzicht gemaakt van de studies die scRNA-seq hebben toegepast om de verschillende celtypes in beide ziekten te onderzoeken en om mogelijke overeenkomsten en verschillen tussen beide ziekten in kaart te brengen. Terwijl aneurysma over het algemeen wordt gekoppeld aan disfunctionele cellen die niet tot het immuunsysteem behoren, waaronder vasculaire gladde spiercellen, endotheelcellen en fibroblasten, is er in meerdere scRNA-seq-studies opvallend genoeg ook een immuuncomponent van deze ziekte beschreven. Zowel macrofagen als T-cellen zijn gevonden in aneurysmaweefsels, waarvan onder andere de pro-inflammatoire IL-1 β ⁺ macrofagen en de regulatoire T-cellen een overeenkomstig fenotype hebben met die in atherosclerose. Bij aneurysma is er meer onderzoek gedaan naar het karakteriseren van fibroblasten dan bij atherosclerose, wat wijst op het belang van deze cellen voor deze pathologie. Recentelijk is er een scRNA-seq studie geweest die ook het belang van fibroblasten bij atherosclerose heeft benadrukt.¹⁷ Als gevolg van het ziekteproces, is recent aan het licht gekomen dat bepaalde cellen een ander fenotype kunnen krijgen. Ze 'switchen' naar een fenotype wat vergelijkbaar kan zijn met dat van een volledig ander celtype, een proces wat *phenotype switching* wordt genoemd. Zowel bij atherosclerose als bij aneurysma kan zo een fenotypische modulatie van gladde spiercellen voorkomen, vaak gekenmerkt door expressie van genen die betrokken zijn bij extracellulaire matrixregulatie. Bij atherosclerose wordt de transitie van gladde spiercellen naar macrofagen vaak beschreven, terwijl bij aneurysma het verlies van deze cellen als gevolg van de verhoogde stressrespons een belangrijkere rol speelt. Endotheeldisfunctie als gevolg van ontsteking werd waargenomen in beide ziektebeelden, maar de transitie van endotheel cellen naar gladde spiercellen werd alleen waargenomen in atherosclerose. Met scRNA-seq kun je ook een voorspelling doen welke cellen mogelijk met elkaar communiceren. In beide ziektebeelden waren de meeste intercellulaire communicatieroutes tussen cellen die niet tot het immuunsysteem behoren en macrofagen, wat met name processen omvatte die de migratie van macrofagen naar het zieke weefsel induceren. Niettemin was de enige gemeenschappelijke communicatieroute in beide ziekten een route die een rol speelt in het complement system, wat een belangrijke anti-microbiële rol heeft maar ook betrokken is bij de activatie van immuuncellen. Hoewel men zou kunnen suggereren dat door op deze route te aan te grijpen er twee vliegen in één klap kunnen worden geslagen, moet dit voorzichtig worden geïnterpreteerd omdat deze celsubsets en pathways verschillende functionele eigenschappen zouden kunnen hebben in beide

ziekten. Samengevat geeft deze review een overzicht van de uitgebreide toegenomen kennis in vasculaire pathologie die wordt verkregen door scRNA-seq. De cellen die betrokken zijn bij beide ziekten blijken veel meer divers en plastisch te zijn dan eerder werd gedacht. ScRNA-seq zal daarom van groot belang zijn bij het verder definiëren van ziektemechanismen en kandidaat-aangrijpingspunten voor medicijnontwikkeling.

Cellulaire atlas van de humane atherosclerotische plaque door middel van single-cell technologieën

Atherosclerotische plaques bestaan uit een zeer heterogene celpopulatie. In 2018 is scRNA-seq voor het eerst toegepast om een atlas van de immuuncellen te creëren in een experimenteel muismodel voor atherosclerose.^{18,19} Dit toonde het enorme potentieel van deze techniek, omdat het leidde tot de identificatie van onder andere TREM2⁺ macrofagen, waarvan inmiddels is aangetoond dat ze een prominente rol spelen in atherosclerose.^{20,21} Niet veel later is ditzelfde experiment ook uitgevoerd voor humane atherosclerotische plaques.²² Toch was de beschrijving van de verschillende cellen in humane plaques nog onvolledig aangezien de cellen die niet tot het immuunsysteem behoren ontbraken. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** scRNA-seq en scATAC-seq uitgevoerd op plaques van patiënten die een endarterectomie van de halsslagader ondergaan hebben. We hebben hiervoor een cohort gebruikt van 18 patiënten en een overzicht gegeven van de verschillende aanwezige cel(sub)types in de laesie. In deze studie hebben we 14 belangrijke celtypes, met daarbij de activatiestatus, mogelijke phenotype switching en potentiële intercellulaire communicatieroutes beschreven. Tot slot hebben we onze data gebruikt om de genen die in genoombrede associatiestudies (GWAS) in verband zijn gebracht met slagaderverkalking te herleiden naar een specifiek celtype.

Verrassend genoeg bleek dat de immuuncelpopulatie in de humane plaque met name uit T-cellen bestond, die meer dan 50% van de geanalyseerde cellen uitmaakten. Ondanks dat bij het prepareren van het weefsel voor scRNA-seq er verschillen kunnen ontstaan in de verhoudingen van bepaalde celpopulaties, konden we door middel van histologie aantonen dat er inderdaad meer T-cellen dan macrofagen in de humane plaque aanwezig waren. Uit onze studie bleek dat de T-cellen met name te onderscheiden waren op basis van de mate van activatie in tegenstelling tot de andere cellulaire markers die veelvuldig gebruikt worden met de meer conventionele technieken. Een populatie CD4⁺ T-cellen werd gekarakteriseerd door het gebrek aan expressie van CD28, een cosignalerend molecuul, en was van interesse omdat deze eerder zijn gevonden in de circulatie van patiënten met atherosclerose in de kransslagader. Met onze studie konden we bevestigen dat deze cellen niet alleen in het bloed, maar ook in de plaque aanwezig zijn.

Verder observeerden we een type dendritische cellen en drie soorten macrofagen, waarvan er twee een pro-inflammatoir fenotype en één een anti-inflammatoir schuimcelachtig fenotype hadden. Een van de pro-inflammatoire macrofagen werd gekarakteriseerd door expressie van $IL1\beta$, waarop is aangegrepen in een recente succesvolle klinische studie (CANTOS trial). Aan de hand van de scRNA-seq en scATAC-seq data konden we bekijken welke genen tot expressie kwamen en ook hoe die genexpressie mogelijk gereguleerd werd op DNA-niveau. Hiermee hebben we de hypothese gesteld dat er in de plaque een activatiecyclus plaatsvindt waarbij de dendritische cellen mogelijk de hierboven genoemde T-celpopulatie kan (her) activeren, wat leidt tot de activatie van de pro-inflammatoire macrofagen. Hiermee kan deze cyclus dus bijdragen aan de lokale pro-inflammatoire omgeving in de humane plaque. De laatste macrofaag subset werd gekarakteriseerd als een schuimcel-achtige subset door expressie van *TREM2* en andere vetophoping-geassocieerde genen. Terwijl schuimcellen lang beschouwd werden als pro-inflammatoir, hebben zowel in vivo als single-cell studies aangetoond dat deze cellen juist anti-inflammatoir van aard zijn.

Door de hoge resolutie die met single-cell technologieën wordt verkregen, kunnen subtiele fenotypische verschillen, zoals cellulaire plasticiteit, worden gedetecteerd. In dit hoofdstuk leverden we ook bewijs voor transdifferentiatie van cellen in de humane plaque. Binnen het *TREM2*⁺ macrofaagcluster ontdekten we expressie van gladde spiercel geassocieerde genen wat suggereert dat er phenotype switching heeft plaatsgevonden. Eerder is aangetoond dat gladde spiercellen ook in staat zijn om lipiden op te nemen en te differentiëren naar een macrofaagachtige cel.^{10,23,24} Binnen de endotheelcellen hebben we een vergelijkbaar fenomeen waargenomen. We vonden een subset van *ACTA2*⁺ endotheelcellen, wat impliceert dat deze cellen een transitie naar een gladde spiercelfenotype hebben ondergaan, een fenomeen wat optreedt in inflammatoire omstandigheden.

Naast een uitgebreide karakterisatie van de celpopulaties in de plaque, is in deze studie ook beschreven hoe deze dataset als hulpmiddel kan worden toegepast bij het onderzoek naar nieuwe aangrijpingspunten voor medicijnen. Hiervoor hebben we intercellulaire communicatieroutes voorspeld in de plaque. We identificeerden voornamelijk interacties tussen macrofagen en zowel endotheel- als gladde spiercellen die betrokken zijn bij het mobiliseren van immuuncellen. Bovendien voorspelden we routes die betrokken zouden kunnen zijn bij het rekruteren en activeren van T-cellen. Tot slot hebben we deze dataset gebruikt om genen die in grote GWAS studies zijn geassocieerd met kransslagaderverkalking op celniveau in kaart te brengen. Deze GWAS studies hebben, mede door de grote hoeveelheid patiënten die geïncludeerd

worden, meerdere interessante genen geïdentificeerd die geassocieerd worden met een verhoogd risico op slagaderverkalking. Desondanks blijft het een uitdaging om te bepalen welke genen therapeutische potentie hebben en hoe men hier goed op kan aangrijpen. Door de genen op celniveau te kunnen bekijken, kunnen directe functionele experimenten worden uitgevoerd om patiënt-gedreven kandidaatgenen voor nieuwe medicatie te kunnen onderzoeken. In deze studie zagen we dat de GWAS-genen met name tot expressie kwamen in macrofagen, endotheelcellen en gladde spiercellen. Toekomstige preklinische studies met zowel celweek als experimentele diermodellen zullen nodig zijn om de functie van de in kaart gebrachte kandidaatgenen in deze cellen te onderzoeken om te bestuderen hoe ze bijdragen aan de progressie van de ziekte.

Samengevat hebben we een cel atlas van de humane atherosclerotische plaque ontwikkeld met behulp van single-cell technologieën. We hebben twee voorbeelden gegeven van hoe deze gegevens in de toekomst gebruikt kunnen worden voor medicijnonderzoek. In de overige hoofdstukken van dit proefschrift hebben we deze dataset gebruikt als basis voor het vaststellen van mogelijke interessante celtypes en aangrijpingspunten, en deze vervolgens gevalideerd in verschillende experimentele modellen.

Een auto-immuuncomponent in atherosclerose

De rol van T-cellen in atherosclerose is reeds uitgebreid bestudeerd. In experimentele studies zijn verschillende subtypes T-cellen beschreven die atherosclerose kunnen verergeren of een beschermende functie hebben. Zoals beschreven in **hoofdstuk 3** en een bestaande literatuur, bevatten humane atherosclerotische plaques een groot aantal T-cellen. Echter, wat deze T-cellen ertoe aanzet om naar de plaque te migreren en of ze antigeen-specifieke activatie ondergaan, was nog onduidelijk.

Hiertoe hebben we in **hoofdstuk 4** scTCR-seq toegepast op om te bepalen of de T-cellen in de plaque klonale expansie hadden ondergaan en om de activatiestatus van deze antigeen-specifieke T-cellen in kaart te brengen. Hiervoor hebben we van dezelfde endarterectomiepatiënten zowel de cellen in het bloed als in de plaque onderzocht. Aangezien antigeen-specifieke T-cellen naar de plek van het antigeen migreren, was de hypothese dat als de T-cellen zijn geactiveerd door een plaque-specifiek antigeen, er meer klonaal geëxpandeerde T-cellen in de laesie zouden zitten ten opzichte van het bloed. Eerdere studies hadden al aangetoond dat er in de plaque meer klonaal geëxpandeerde CD8⁺ T cellen te vinden zijn ten opzichte van CD4⁺ T-cellen.²⁵ Echter, met onze studie konden we aantonen dat alleen bij de CD4⁺ T-cellen er een verrijking te zien was in de plaque in vergelijking met het bloed. Één specifieke plaque-verrijkte klonaal geëxpandeerde CD4⁺ T-celsubset werd gekarakteriseerd door een set genen die hoger

tot expressie komen na antigeen-presentatie door een antigeen-presenterende cel. Doordat met scRNA-seq minimale verschillen in genexpressie gedetecteerd kan worden, is het mogelijk om met een algoritme te bepalen hoe de cellen zich ontwikkelen over tijd. Hiermee identificeerden we in het bloed een mogelijke voorlopercel van de hierboven benoemde antigeen-specifieke effector T-cellen. Deze T-cel wordt gekenmerkt door expressie van *CCR4* en *CCR10*, welke beiden betrokken zijn van de rekrutering van T-cellen naar inflammatoire locaties. Deze migratoire T-celsubset in het bloed had bovendien meerdere overeenkomstige TCRs met de geëxpandeerde T-cellen in de plaque, wat suggereert dat ze op hetzelfde antigeen hebben gereageerd.

Vervolgens hebben we onderzocht of we in de plaque lokale interacties konden voorspellen tussen deze effector T-cellen en antigeen-presenterende cellen. Er is tegenstrijdig bewijs over hoe antigeen-presentatie in de laesie bijdraagt aan ziekteprogressie. De huidige consensus is dat de locatie van de antigeen-presentatie essentieel is voor het resultaat van de T-celactivatie, waarbij de plaqueomgeving een beschermende T-celrespons zou moeten induceren.^{26,27} Toch hebben we laten zien dat pathogene interacties ook in de laesie kunnen optreden, aangezien we een co-signalerende interactie tussen TREM2⁺ macrofagen en de plaque-verrijkte effector CD4⁺ T-cellen konden voorspellen. Aangezien de plaque voornamelijk uit lichaamseigen stoffen bestaat, lijkt de grote hoeveelheid geëxpandeerde T-cellen mogelijk op een lichaamseigen antigeen te reageren, wat een auto-immuunziekte definieert. Dit suggereert dat atherosclerose mogelijk een auto-immuuncomponent heeft. Echter, omdat we niet precies weten op welk antigeen de T-cellen reageren en of dit inderdaad lichaamseigen is, hebben we een andere strategie toegepast om deze hypothese verder te onderzoeken. We vergeleken daarom het genexpressieprofiel van de CD4⁺ T-cellen met die in de synoviale vloeistof van patiënten met de auto-immuunziekte psoriatische artritis en vonden aanzienlijke overeenkomsten. Ook de verdeling van de geëxpandeerde CD4⁺ T-cellen tussen bloed en het ziekteweefsel was vergelijkbaar. Kortom, deze data ondersteunen de theorie dat de pathofysiologie van atherosclerose een auto-immuuncomponent heeft. Om dit volledig te bevestigen is er verder onderzoek nodig naar wat het antigeen is waar de T-cellen op reageren. Desalniettemin benadrukt dit wel dat het aangrijpen op de antigeen-specifieke T-celactivatie veel therapeutische potentie heeft.

Mestcelactivatie en -migratie in vergevorderde atherosclerose

Terwijl de grootste populatie immuuncellen in **hoofdstuk 3** T-cellen bleek te zijn, bestond de kleinste populatie uit mestcellen. Hoewel ze in lage aantallen aanwezig zijn in de plaque, is bewezen dat mestcellen aanzienlijk bijdragen aan de progressie van atherosclerose. In experimentele modellen voor atherosclerose bevorderen

mestcellen de instabiliteit van plaques, onder andere doordat deze cellen eiwitten, *proteases*, produceren die de extracellulaire matrix van de plaque afbreken.²⁸⁻³¹ De meest voorkomende proteases zijn *chymase* en *trypase*. Bovendien heeft een andere studie aangetoond dat het aantal intraplaque mestcellen positief geassocieerd kan worden met toekomstige cardiovasculaire gebeurtenissen, waarbij gecorrigeerd is voor de belangrijkste risicofactoren voor hart- en vaatziekten.³² In de volgende hoofdstukken was het doel om de humane intraplaque mestcellen verder te karakteriseren, te onderzoeken of ze leeftijds-gerelateerde veranderingen ondergaan en te onderzoeken of we de migratie van mestcellen naar de plaque konden remmen.

In **hoofdstuk 5** hebben we flow cytometrie toegepast om het aantal mestcellen en hun fenotype beter te karakteriseren in een cohort van plaques verkregen uit zowel carotis als femorale endarterectomiechirurgie. Eerst stelden we vast dat ongeveer 1% van alle immuuncellen uit mestcellen bestaat. Om mestcellen te identificeren hebben we twee klassieke mestcelmarkers gemeten, namelijk CD117 en FcεRI. Vervolgens onderzochten we de activatiestatus van mestcellen. Waar voorheen mestcelactivatie in humane atherosclerose voornamelijk werd onderzocht door een histologische kleuring van tryptase, hebben wij hier flow cytometrie toegepast om dit beter in kaart te brengen. Een mestcel zit vol met kleine bolletjes, *granules*, waarin de proteases zijn opgeslagen. Zodra een mestcel geactiveerd raakt, zal deze *degranuleren*, wat inhoudt dat het zijn granules met proteases zal uitscheiden. Om mestcelactivatie beter te meten, hebben we gekozen voor de marker CD63, die op het cel oppervlak komt tijdens de degranulatie. De belangrijkste route van mestcelactivatie is als *immunoglobulin (Ig) E* bindt aan FcεRI. Zodra IgE aan deze receptor gebonden is, is enkel nog een antigeen nodig om de mestcel te activeren en te laten degranuleren. Circulerend IgE is positief gecorreleerd aan acute cardiovasculaire complicaties^{33,34}, maar of IgE ook gebonden is aan de geactiveerde mestcellen moest nog worden bepaald. Daarom hebben we vervolgens IgE gemeten op de intraplaque mestcellen. De meerderheid van de geactiveerde mestcellen had inderdaad IgE aan hun oppervlak gebonden. Aangezien in experimentele modellen van atherosclerose is aangetoond dat stabilisatie van mestcellen de progressie van de plaque kan remmen²⁸, zou het beperken van circulerend IgE, gericht op een verminderde intraplaque mestcelactivatie, een potentiële therapeutische strategie kunnen zijn. Daarnaast hebben we ook een populatie IgE⁺CD63⁺ mestcellen waargenomen, die waarschijnlijk via andere routes geactiveerd zijn. Het moet nog worden vastgesteld welke eiwitten betrokken zijn bij deze activatie. Tot slot toonden we met flow cytometrie aan dat niet alle mestcellen positief zijn voor tryptase, wat aangeeft dat histologische kleuring mogelijk niet alle mestcellen aankleurt die aanwezig zijn in atherosclerose. Daarom zijn wij van mening dat deze flow cytometrie benadering een valide methode is om mestcellen in humane

atherosclerose te onderzoeken. Toekomstige studies in grotere cohorten kunnen meer inzicht geven in hoe bepaalde activatiepatronen van mestcellen gecorreleerd kunnen worden aan klinische complicaties, waardoor de weg wordt vrijgemaakt voor nieuwe therapeutische benaderingen om mestcellen in atherosclerose aan te pakken.

Veroudering is een onafhankelijke risicofactor voor atherosclerose. Dit wordt gedeeltelijk veroorzaakt door een chronische laaggradige ontsteking, ook wel *inflammaging* genoemd, die zich ontwikkelt over tijd. Het inflammaging proces heeft aanzienlijk invloed op de immuuncellen in de plaque. Een recente studie heeft meerdere verouderings-gerelateerde veranderingen aangetoond in de intraplaque immuuncellen en heeft deze bevindingen ook bevestigd in een cohort van slagaderverkalking patiënten.³⁵ Er zijn meerdere studies die hebben aangetoond dat mestcellen ook leeftijds-gerelateerde veranderingen ondergaan³⁶⁻³⁹, maar of dit ook in atherosclerose het geval is, was nog onbekend. Daarom hebben we in **hoofdstuk 6** het effect van veroudering op het fenotype en de activatiestatus van mestcellen in atherosclerose onderzocht. We hebben hiervoor de mestcelpopulatie geanalyseerd in een jong en een verouderd experimenteel muismodel voor atherosclerose. We observeerden dat in de verouderde groep de mestcellen meer geactiveerd waren. Bovendien zagen we in de oude muizen dat er meer IgE in het serum circuleerde. Dit suggereert dat de IgE-FcεRI route betrokken kan zijn bij de verhoogde activatie. In **hoofdstuk 5** zagen we een vergelijkbaar mestcelfenotype in humane plaques, die over het algemeen afkomstig zijn van oudere patiënten. We hebben ook jonge en oude mestcellen vergeleken door deze vanuit het beenmerg te laten ontwikkelen in de celweek. Hier ontdekten we dat de oude mestcellen intrinsieke activatie vertoonde doordat ze CD63 tot expressie brachten zonder een stimulus. Om te onderzoeken of dit ten grondslag ligt aan de verhoogde activatie in het verouderd muismodel voor atherosclerose, hebben we deze vanuit het beenmerg ontwikkelde mestcellen getransplanteerd in een mestceldeficiënt muismodel en hier ook atherosclerose laten ontwikkelen. We zagen hier niet meer een verschil in activatie tussen de groep die jonge en oude mestcellen getransplanteerd hebben gekregen. Dit kan gedeeltelijk verklaard worden door het feit dat het fenotype van mestcellen grotendeels afhankelijk is van de inflammatoire omgeving waarin de mestcel zich bevindt. Deze resultaten benadrukken dus een belangrijke rol voor het verouderde inflammaging milieu voor het fenotype van de mestcellen in de atherosclerotische plaque.

Hoewel mestcelactivatie en degranulatie het meest onderzocht worden, zijn mestcellen ook beschreven als atypische antigeen-presenterende cellen. Mestcellen zijn inderdaad gevonden in de nabijheid van CD4⁺ T-cellen in de huid van psoriasispatiënten en mestceldepletie resulteerde in verminderde CD4⁺ T-celinfiltratie en -activatie in een

muis model voor multiple sclerose. Verder heeft eerder werk uit ons laboratorium aangetoond dat verhoogd cholesterol in het bloed de expressie van MHC-II, waarop het antigeen gepresenteerd wordt, op mestcellen significant is verhoogd. Bovendien is aangetoond dat deze mestcellen in staat zijn tot functionele antigeen-presentatie aan CD4⁺ T-cellen in een muismodel en dat de depletie van mestcellen het aantal CD4⁺ T-cellen in de atherosclerotische aorta vermindert. Gezien het in **hoofdstuk 3 en 4** beschreven belang van CD4⁺ T cellen in humane atherosclerose, waren we vooral geïnteresseerd om te onderzoeken of veroudering ook invloed heeft op de antigeen-presenterende capaciteiten van mestcellen. De hoeveelheid MHC-II⁺ mestcellen in de atherosclerotische aorta van verouderde muizen was hoger dan die in de jonge groep. Om te onderzoeken of dit ook functioneel van waarde is, hebben we het antigeen presentatie-proces in de celweek nagebootst. We hebben wederom vanuit het beenmerg van jonge en oude muizen mestcellen laten groeien en die samen met CD4⁺ T-cellen in kweek gezet. Bij incubatie met de oude mestcellen vonden we meer proliferatie van CD4⁺ T-cellen, wat suggereert dat de mestcellen in staat zijn tot het presenteren van antigenen en dit direct kunnen presenteren aan CD4⁺ T-cellen. Echter, ook de verhoogde expressie van MHC-II bleek een gevolg te zijn van de verouderde omgeving waarin de mestcellen zich bevinden, aangezien het verschil bij herintroductie in een jong milieu wederom verdween. Naast proteases, kunnen mestcellen ook cytokines produceren na activatie. Eerdere studies hebben aangetoond dat deze cytokines de functie van de T-cellen kunnen beïnvloeden door bij te dragen aan de inflammatoire omgeving.⁴⁰ Onze hypothese was daarom dat, ondanks dat er lokale antigen presentatie door mestcellen in de plaque kan plaatsvinden, de pro-inflammatoire cytokines die ze uitscheiden hoogstwaarschijnlijk een belangrijke rol spelen in T-cel activatie. We zagen inderdaad dat op het moment dat we verouderde muizen behandelden met DSCG, een stof die mestcel activatie remt, er minder effector CD4⁺ T-cellen terug te vinden waren in het bloed en in de plaque. Samengevat hebben we met deze studie aangetoond dat veroudering en de bijbehorende inflammatoire omgeving significant bijdragen aan het fenotype en de functie van mestcellen in atherosclerose. Dit beïnvloedt zowel hun activatie en degranulatie als de daaropvolgende veranderingen in het CD4⁺ T-celfenotype in de plaque. Het is daarom essentieel om leeftijd als belangrijke factor te beschouwen bij verder onderzoek naar mestcellen voor nieuwe therapeutische interventies voor atherosclerose.

Vanwege de verhoogde accumulatie en activatie van mestcellen in gevorderde atherosclerose zou het remmen van de rekrutering van mestcellen een veelbelovende therapeutische strategie kunnen zijn om destabilisatie van de plaque te voorkomen. Eén manier om deze migratie aan te pakken is door aan te grijpen op *lipide mediators*.

Leukotrieen B₄ (LTB₄) is een ontstekingsbevorderende lipide mediator die de hoogste affiniteit heeft voor de leukotrieen B₄-receptor (BLT1). Er is aangetoond dat de BLT1-LTB₄-as een rol speelt bij de rekrutering van meerdere immuuncellen, waaronder macrofagen en mestcelvoorlopers. Deze rekruteringsroute is al uitgebreid onderzocht in de context van atherosclerose. Zowel genetische deletie als farmacologische inhibitie van BLT1 of het enzym verantwoordelijk voor de biosynthese van LTB₄ hebben geleid tot een vermindering van atherosclerose in een vroeg stadium, deels door een verlaagd aantal macrofagen in de plaque.⁴¹⁻⁴⁴ Echter, slagaderverkalking wordt vaak pas herkend als het al in een vergevorderd stadium zit. Of deze lipide mediators ook bijdragen aan de rekrutering van immuuncellen, en in het bijzonder mestcellen, in reeds bestaande plaques was nog onbekend. Daarom hebben we in **hoofdstuk 7** onderzocht of inhibitie van BLT1 de migratie van mestcellen naar gevorderde atherosclerose kan verminderen. We gebruikten eerst onze single-cell atlas van humane atherosclerose (**hoofdstuk 3**) om te analyseren of er in de plaque genen tot expressie worden gebracht die betrokken zijn bij de biosynthese van LTB₄. We vonden dat macrofagen al deze genen tot expressie brachten, maar de hoogste expressie werd gevonden in de mestcellen. In deze studie hebben we muizen met vergevorderde atherosclerose behandeld met de BLT1-remmer CPI05.696. We zagen significant minder macrofagen in de milt. Dit zou een direct effect kunnen zijn van BLT1-remming, maar monocyten produceren na binding van LTB₄ het eiwit *monocyte-chemoattractant protein 1 (MCP-1)* wat rekrutering van nieuwe monocyten induceert. We zagen geen veranderingen in plaquegrootte en stabiliteit na behandeling met CPI05.696. Waarschijnlijk is deze behandeling minder effectief in meer gevorderde atherosclerose, wat correspondeert met een eerdere studie die het grootste effect van BLT1-antagonisme in vroege laesies heeft beschreven.⁴² Tenslotte zagen we geen veranderingen in het aantal circulerende mestcelvoorlopers of het aantal mestcellen in de plaque. Dit suggereert dat in gevorderde atherosclerose de BLT1-LTB₄ as geen invloed heeft op de migratie van mestcellen naar de laesie. Hierbij moet wel vermeld worden dat de BLT2-receptor met lage affiniteit voor LTB₄ ook mestcelmigratie zou kunnen induceren. Aangezien CPI05.696 BLT1-specifiek is, kunnen we in deze studie mogelijke BLT2-geïnduceerde mestcelmigratie niet uitsluiten en zal dit verder moeten worden onderzocht. Hoewel BLT1-antagonisme blijkbaar niet de juiste aanpak is om in te grijpen tegen mestcelmigratie in gevorderde atherosclerose, hebben we wel lokale LTB₄-productie door mestcellen in de humane atherosclerotische plaque gedetecteerd, die wel zou kunnen bijdragen aan de rekrutering van andere immuuncellen naar de plaque. Desalniettemin zijn we ervan overtuigd dat het aanpakken van mestcelmigratie, zij het via een andere route, een veelbelovende strategie blijft om in te grijpen op de progressie van atherosclerose.

Single-cell atlas als middel voor de identificatie van nieuwe aangrijpingspunten voor geneesmiddelen

Er zijn al veel potentiële targets voor atherosclerose onderzocht, maar helaas is de vertaling naar de kliniek vaak niet succesvol. Zoals eerder vermeld, hebben we de cellulaire atlas in **hoofdstuk 3** gegenereerd om het begrip van de pathofysiologie van atherosclerose te verbeteren en om te helpen bij het definiëren van nieuwe aangrijpingspunten voor medicijnen. In **hoofdstuk 8** gebruikten we dit hulpmiddel en vonden we specifieke expressie van *Interleukin-4-induced gene-1 (IL4I1)* binnen de TREM2⁺ macrofagen. IL4I1 is een enzym dat voornamelijk wordt geproduceerd door antigeen-presenterende cellen en het induceert de omzetting van zijn substraat L-fenylalanine in fenylpyruvaat, ammoniak en waterstofperoxide. IL4I1 is met name actief op het moment dat de antigeen-presenterende cel en de T-cel interactie hebben via het MHC-molecuul en de TCR. Hier interfereert het vervolgens met de T-cel proliferatie en bevordert het de ontwikkeling naar regulatoire CD4⁺ T-cellen. IL4I1 werd oorspronkelijk ontdekt in verschillende soorten kanker en er is aangetoond dat remming van dit enzym de tumorgroei aanzienlijk vermindert door de cytotoxische CD8⁺ T-celrespons te verhogen.⁴⁵ Onlangs werd gerapporteerd dat een specifieke IL4I1-remmer, CB-668, de tumorgroei vermindert door de CD8⁺ T-celrespons te verstoren.⁴⁶ Hoewel kanker en atherosclerose gemeenschappelijke ontstekingsroutes hebben, is het doel bij kanker vaak om de ontstekingsreactie te activeren om de kankercellen te elimineren waarbij bij atherosclerose de ontstekingsreactie juist liever geremd wordt. Bij immunotherapie tegen kanker wordt er dan ook herhaaldelijk een melding gemaakt van een verhoogd risico op hart- en vaatziekten, mogelijk door de geactiveerde ontstekingsreactie.^{47,48} Daarom onderzochten we of IL4I1-inhibitie met CB-668 de progressie van atherosclerose in een muismodel zou beïnvloeden. In lijn met de eerder genoemde resultaten zagen we een vermindering van het aantal naïeve T-cellen en een toename van de effector en geheugencellen in de milt. Ook zagen we een toename van cytotoxische CD8⁺ T-cellen in de milt en de atherosclerotische aorta. In de naastgelegen lymfeklier zagen we ook een toename van pro-inflammatoire effector CD4⁺ T-cellen, wat op basis van eerdere studies waarschijnlijk een gevolg is van de CB-668 behandeling. Desondanks namen we geen veranderingen waar in de grootte en samenstelling van de plaques. In deze studie hebben wel IL4I1-remming in initiële atherosclerose onderzocht, terwijl meer uitgesproken effecten zouden kunnen optreden in meer gevorderde stadia van de ziekte. Ondanks dat onze studie aangetoond heeft dat IL4I1-inhibitie de ontwikkeling van atherosclerose initieel niet beïnvloedt, zullen toekomstige studies moeten uitwijzen of de door CB-668 geïnduceerde toegenomen ontsteking de progressie van de ziekte in een gevorderd stadium zal versnellen.

Toekomstperspectieven

In de afgelopen jaren is het onderzoeksveld zodanig ontwikkeld dat er een toegenomen aandacht is voor het aangrijpen op het immuunsysteem als behandeling voor atherosclerose. Meerdere klinische studies die de ontstekingsreactie getracht hebben te verminderen in patiënten met slagaderverkalking hebben een verlaging van het aantal acute cardiovasculaire complicaties beschreven. Echter, niet alle benaderingen bleken succesvol te zijn en de kwaliteit van leven te verbeteren. Doordat in atherosclerose er een delicate balans is tussen cellen die de ziekte verergeren of juist beschermen, is het essentieel om een op maat gemaakte therapeutische strategie te ontwerpen en om op specifieke processen aan te kunnen grijpen. De snelle ontwikkeling van single-cell technologieën zullen van vitaal belang zijn om dit te kunnen bewerkstelligen.

In het afgelopen decennium is gebleken dat de datasets die zijn gegenereerd door single-cell multi-omics een belangrijk hulpmiddel zijn voor het identificeren van therapeutische aangrijppunten voor atherosclerose. Door de delicate veranderingen in het cel fenotype aan het licht te brengen, hebben deze studies tot belangrijke nieuwe inzichten in de ziekte geleid. Naast een gedetailleerde beschrijving van het genexpressieprofiel van de cellen in de plaque, kan er aan de hand van geavanceerde computationele analyses ook gekeken worden hoe de cellen zich ontwikkelen. Hiermee kunnen bijvoorbeeld voorlopercellen geïdentificeerd worden of processen beschreven worden die mogelijk kunnen voorkomen dat een pathogeen celtype zich in de plaque verder ontwikkelt. In dit proefschrift beschrijven we bijvoorbeeld de voorlopercellen in het bloed die zich in de plaque tot de antigeen-specifieke effector CD4⁺ T-cellen ontwikkelen. Verder onderzoek naar het voorkomen van de rekrutering van deze voorlopercellen kan mogelijk een strategie zijn voor de behandeling van atherosclerose. Verder is het ook interessant om te kijken of bepaalde genen of celpopulaties te correleren zijn aan klinische parameters om mogelijk causale verbanden te identificeren. Een andere veelbelovende toepassing van deze single-cell datasets is onderzoeken of er al bestaande geneesmiddelen zijn die aangrijpen op genen die in atherosclerose een mogelijke pathogene rol spelen. Deze gerichte aanpak zorgt ervoor dat er sneller preklinische testen gedaan kunnen worden en versnelt de overgang naar de kliniek.

Een andere methode die in dit proefschrift ook veelvuldig aan bod is gekomen is het onderzoeken van mogelijke intercellulaire communicatie routes om op aan te grijpen. Hoewel dit een goed idee geeft van welke cellen mogelijk met elkaar zouden kunnen interacteren, heeft het een grote limitatie. Vanwege de methode die nodig is

om het weefsel goed te prepareren voor single-cell sequencing, is het onmogelijk te achterhalen of de cellen waarvan we voorspellen dat ze met elkaar communiceren ook daadwerkelijk in elkaars omgeving liggen. Om dit probleem te verhelpen is recentelijk *spatial transcriptomics* ontwikkeld, waarbij men het weefsel intact kan laten en alsnog een gedetailleerd genexpressie profiel van de cellen kunt genereren. In de context van dit proefschrift zal deze techniek een waardevolle bijdrage kunnen leveren om meer inzicht te krijgen in de interacties tussen de antigeen-presenterende cellen en de antigeen-specifieke T-cellen.

Nu we de accumulatie van plaque-verrijkte antigeen-specifieke T-cellen in de plaque is vastgesteld, is natuurlijk de meest prangende vraag op welke antigenen deze T-cellen mogelijk reageren. Er is al veel onderzoek gedaan naar dit mogelijke antigeen en er zijn meerdere kandidaat antigenen beschreven die nog verder onderzocht moeten worden.⁴⁹ Een voorbeeld hiervan is een stukje van het eiwit *Apolipoproteïne B100* (*ApoB100*), wat een onderdeel is van het LDL-cholesteroldeeltje. In experimentele muismodellen is aangetoond dat vaccinatie met LDL en oxLDL een beschermend effect heeft op de ontwikkeling van atherosclerose.⁵⁰⁻⁵² Echter, om het humane antigeen te bepalen zijn geavanceerdere methodes nodig. Tegenwoordig zijn er veel ontwikkelingen op computationeel gebied waarbij getracht wordt om vanuit de TCR sequentie een voorspelling te doen op welk antigeen de T-cellen reageren. Ondanks dat deze benadering veel potentie heeft, gaven ze bij onze data niet de gewenste nauwkeurigheid. Een andere benadering om het antigeen te onderzoeken is *immunopeptidomics*. Bij deze techniek is het mogelijk om de antigenen die op de MHC-moleculen van de antigeen-presenterende cellen in de plaque zitten, los te koppelen en te meten. Deze techniek is veelbelovend om nieuwe kandidaat antigenen te identificeren om zo mogelijk een stap in de richting van een vaccinatie voor atherosclerose te maken.

Tot slot leveren we aanwijzingen dat het aanpakken van mestcellen in atherosclerose een effectieve therapeutische strategie zou kunnen zijn. Door hun sterk geactiveerde toestand te remmen of door de rekrutering van mestcellen in de plaque aan te pakken, kan de atherosclerose mogelijk worden verminderd. Aangezien onze data aantoonde dat IgE een belangrijke bijdrage zou kunnen leveren aan de activatie van mestcellen in de plaque, zal het interessant zijn om patiënten te behandelen met IgE-blokkerende antilichamen, zoals Omalizumab⁵³, om te zien hoe dit de progressie van atherosclerose beïnvloedt. Hoewel we de belangrijkste rekruteringsroutes die betrokken zijn bij de migratie van mestcellen naar de atherosclerotische plaque nog niet hebben kunnen definiëren, zijn we ervan overtuigd dat het cruciaal is om dit in de toekomst verder te onderzoeken.

Naast het vinden en valideren van mogelijke geneesmiddelaangrijpingspunten, kunnen single-cell technologieën ook worden toegepast om de diagnostiek te verbeteren. Op dit moment is vroegtijdige opsporing van atherosclerotische hart- en vaatziekten een belangrijke pijler in het onderzoeksveld. Daarom is het essentieel om nieuwe *biomarkers* voor deze ziekte te definiëren. Een biomarker is een meetbare en specifieke indicator die een voorspelling geeft van de ernst van de ziekte. Als klinische parameters in verband kunnen worden gebracht met bepaalde pathologische celtypes, zou dit de voorspelling voor het risico op klinische complicaties kunnen verbeteren. Door te onderzoeken of de in de plaque gedetecteerde celtypes ook voorkomen in het bloed of als we voorlopers van pathogene celtypes kunnen vinden, kunnen deze mogelijk worden gebruikt als biomarker. Op basis van het werk in dit proefschrift zou het interessant kunnen zijn om verder te bepalen of de CCR4⁺CCR10⁺ voorloper CD4⁺ T-cellen geassocieerd kunnen worden met toekomstige cardiovasculaire complicaties. Daarnaast zou het meten van mestcelvoorlopers in de circulatie mogelijk ook een hulpmiddel kunnen zijn om plaque stabiliteit te voorspellen. Ten slotte ligt er een groot potentieel in het gebruik van single-cell technologieën voor stratificatie van patiënten en om het effect van geneesmiddelen te voorspellen door de aan- of afwezigheid van therapeutisch relevante markers. Bij kanker wordt dit al toegepast om patiënten te definiëren die een grotere kans hadden op een goede respons op chemo- of immuuntherapie, bijvoorbeeld bij HER2 positieve of negatieve borstkanker. Bij atherosclerose is er reeds single-cell multi-omics toegepast om verschillen te analyseren tussen immuuncellen van patiënten met en zonder klinische symptomen²², maar verder onderzoek is nodig om specifieke genen te identificeren die de respons op geneesmiddelen kunnen voorspellen. Verder is het essentieel om de data die gegenereerd is met single-cell sequencing te vergelijken tussen zowel plaques uit de carotis en de kransslagader. Een recente studie heeft deze vergelijking gemaakt voor macrofagen en gerapporteerd dat, afgezien van enige variatie tussen patiënten in de verhoudingen van de cellen, op beide locaties dezelfde macrofaagsubtypes gevonden werden.^{22,54,55} Het verder uitbreiden van deze analyse voor andere celtypes zal een waardevolle bijdrage kunnen leveren aan de zoektocht naar gemeenschappelijke biomarkers en therapeutische aangrijpingspunten voor alle patiënten met slagaderverkalking.

Het werk in dit proefschrift laat zien dat single-cell multi-omics een zeer waardevol hulpmiddel is om de pathofysiologie van atherosclerose te onderzoeken en om nieuwe aangrijpingspunten voor interventie te identificeren. Het zal intrigerend zijn om te zien hoe de oneindige mogelijkheden van single-cell technologieën zullen bijdragen aan een verbeterde behandeling voor atherosclerose.

Referenties

1. World Health Organization. Noncommunicable diseases. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (2022).
2. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J* **43**, 716-799 (2022).
3. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2021).
4. Grundy, S. M. *et al.* 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary. *J Am Coll Cardiol* **73**, (2019).
5. Bäck, M., Yurdagul, A., Tabas, I., Öörni, K. & Kovanen, P. T. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cardiology* **16**:7 **16**, 389-406 (2019).
6. Bays, H. E. *et al.* Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. *Am J Prev Cardiol* **5**, 100149 (2021).
7. Doran, A. C., Meller, N. & McNamara, C. A. Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 812-819 (2008).
8. Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E. & Fisher, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 13531-13536 (2003).
9. Li, H., Freeman, M. W. & Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest* **95**, 122-133 (1995).
10. Shankman, L. S. *et al.* KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med* **21**, 628-637 (2015).
11. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine* **377**, 1119-1132 (2017).
12. Chung, E. S., Packer, M., Lo, K. H., Fasanmade, A. A. & Willerson, J. T. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Trial of Infliximab, a Chimeric Monoclonal Antibody to Tumor Necrosis Factor- α , in Patients With Moderate-to-Severe Heart Failure. *Circulation* **107**, 3133-3140 (2003).
13. Nidorf, S. M. *et al.* Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine* **383**, 1838-1847 (2020).
14. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* **381**, 2497-2505 (2019).
15. Opstal, T. S. J. *et al.* Long-Term Efficacy of Colchicine in Patients With Chronic Coronary Disease: Insights From LoDoCo2. *Circulation* **145**, 626-628 (2022).
16. Kashima, Y. *et al.* Single-cell sequencing techniques from individual to multiomics analyses. *Experimental & Molecular Medicine* **2020** **52**:9 **52**, 1419-1427 (2020).
17. van Kuijk, K. *et al.* Human and murine fibroblast single-cell transcriptomics reveals fibroblast clusters are differentially affected by ageing and serum cholesterol. *Cardiovasc Res* **119**, 1509-1523 (2023).
18. Winkels, H. *et al.* Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry. *Circ Res* **122**, 1675-1688 (2018).
19. Cochain, C. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res* **122**, 1661-1674 (2018).

20. Kim, K. *et al.* Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circ Res* **123**, 1127-1142 (2018).
21. Willemsen, L. & de Winther, M. P. J. Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies. *J Pathol* **250**, 705-714 (2020).
22. Fernandez, D. M. *et al.* Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Natuere Medicine* **25**, 1576-1588 (2019).
23. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767-801 (2004).
24. Gomez, D. & Owens, G. K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **95**, 156-164 (2012).
25. Chowdhury, R. R. *et al.* Human Coronary Plaque T Cells Are Clonal and Cross-React to Virus and Self. *Circ Res* **130**, 1510-1530 (2022).
26. Wigren, M. *et al.* Lack of Ability to Present Antigens on Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Aggravates Atherosclerosis in ApoE ^{-/-} Mice. *Circulation* **139**, 2554-2566 (2019).
27. Slütter, B. & Kuiper, J. Immune Responses in Context: An Anti-Inflammatory Role for Major Histocompatibility Complex Class II Presentation in the Atherosclerotic Lesion? *Circulation* **139**, 2567-2569 (2019).
28. Bot, I. *et al.* Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **115**, 2516-2525 (2007).
29. Bot, I. *et al.* Mast cell chymase inhibition reduces atherosclerotic plaque progression and improves plaque stability in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res* **89**, 244-252 (2011).
30. Bot, I., Shi, G. P. & Kovanen, P. T. Mast cells as effectors in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 265 (2015).
31. Shi, G. P., Bot, I. & Kovanen, P. T. Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases. *Nat Rev Cardiol* **12**, 643-658 (2015).
32. Willems, S. *et al.* Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events. *Eur Heart J* **34**, 3699-3706 (2013).
33. Sinkiewicz, W. *et al.* Immunoglobulin E as a marker of the atherothrombotic process in patients with acute myocardial infarction. *Cardiol J* **14**, 266-73 (2007).
34. Langer, R. D., Criqui, M. H., Feigelson, H. S., McCann, T. J. & Hamburger, R. N. IgE predicts future nonfatal myocardial infarction in men. *J Clin Epidemiol* **49**, 203-209 (1996).
35. Smit, V. *et al.* Single-cell profiling reveals age-associated immunity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* (2023) doi:10.1093/CVR/CVADO99.
36. Blasco, M. P. *et al.* Age-dependent involvement of gut mast cells and histamine in post-stroke inflammation. *J Neuroinflammation* **17**, (2020).
37. Pilkington, S. M., Barron, M. J., Watson, R. E. B., Griffiths, C. E. M. & Bulfone-Paus, S. Aged human skin accumulates mast cells with altered functionality that localize to macrophages and vasoactive intestinal peptide-positive nerve fibres. *Br J Dermatol* **180**, 849-858 (2019).
38. Gunin, A. G., Kornilova, N. K., Vasilieva, O. V. & Petrov, V. V. Age-related changes in proliferation, the numbers of mast cells, eosinophils, and cd45-positive cells in human dermis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66**, 385-392 (2011).
39. Chatterjee, V. & Gashev, A. A. Aging-associated shifts in functional status of mast cells located by adult and aged mesenteric lymphatic vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, (2012).
40. Bulfone-Paus, S. & Bahri, R. Mast Cells as Regulators of T Cell Responses. *Front Immunol* **6**, (2015).

41. Heller, E. A. *et al.* Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation* **112**, 578-586 (2005).
42. Aiello, R. J. *et al.* Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 443-449 (2002).
43. Subbarao, K. *et al.* Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 369-375 (2004).
44. Mehrabian, M. *et al.* Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* **91**, 120-126 (2002).
45. Lasoudris, F. *et al.* IL4I1: an inhibitor of the CD8⁺ antitumor T-cell response in vivo. *Eur J Immunol* **41**, 1629-1638 (2011).
46. MacKinnon, A. *et al.* 705 Anti-tumor activity of CB-668, a potent, selective and orally bioavailable small-molecule inhibitor of the immuno-suppressive enzyme Interleukin 4 (IL-4)-Induced Gene 1 (IL4I1). *J Immunother Cancer* **8**, A423.2-A424 (2020).
47. Mocan-Hognogi, D. L. *et al.* Immune Checkpoint Inhibitors and the Heart. *Front Cardiovasc Med* **8**, 726426 (2021).
48. Poels, K. *et al.* Antibody-Mediated Inhibition of CTLA4 Aggravates Atherosclerotic Plaque Inflammation and Progression in Hyperlipidemic Mice. *Cells* **9**, (2020).
49. Nilsson, J. & Hansson, G. K. Vaccination Strategies and Immune Modulation of Atherosclerosis. *Circ Res* **126**, 1281-1296 (2020).
50. Zhou, X., Caligiuri, G., Hamsten, A., Lefvert, A. K. & Hansson, G. K. LDL Immunization Induces T-Cell-Dependent Antibody Formation and Protection Against Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 108-114 (2001).
51. Palinski, W., Miller, E. & Witztum, J. L. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 821-825 (1995).
52. Freigang, S., Hörkkö, S., Miller, E., Witztum, J. L. & Palinski, W. Immunization of LDL Receptor-Deficient Mice With Homologous Malondialdehyde-Modified and Native LDL Reduces Progression of Atherosclerosis by Mechanisms Other Than Induction of High Titers of Antibodies to Oxidative Neoepitopes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1972-1982 (1998).
53. Kawakami, T. & Blank, U. From IgE to Omalizumab. *J Immunol* **197**, 4187-4192 (2016).
54. Zernecke, A. *et al.* Integrated single-cell analysis-based classification of vascular mononuclear phagocytes in mouse and human atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **119**, 1676-1689 (2023).
55. Wirka, R. C. *et al.* Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis. *Nat Med* **25**, 1280-1289 (2019).