



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The effects of triglycerides and fatty acids on T cells: role in atherosclerosis

Reilly, N.A.

Citation

Reilly, N. A. (2024, October 30). *The effects of triglycerides and fatty acids on T cells: role in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4106896>

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/1887/4106896>

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

Nederlandse samenvatting

Atherosclerose speelt een belangrijke rol in het ontstaan van hart- en vaatziekten, wat wereldwijd de leidende doodsoorzaak is. Atherosclerose, of in de volksmond: aderverkalking, wordt in essentie veroorzaakt door de wisselwerking tussen lipiden, het immuunsysteem en de vaatwand. Atherosclerose is een langdurige ontsteking van de vaatwand van bloedvaten. Hierbij hopen vetten zich op in de vaatwand, wat immuun cellen aantrekt die vervolgens een ontstekingsreactie in gang zetten. Ondanks de pogingen van het immuunsysteem om deze vetten op te ruimen, blijft de ontsteking aanhouden. Deze voortdurende inflammatie leidt tot een toenemende ophoping van vetten en immuuncellen, wat resulteert in de vorming van atherosclerotische plaques. Wanneer deze plaques uiteindelijk scheuren, kan dit ernstige gevolgen hebben zoals hartaanvallen of beroertes.

Tot voor kort ging bijna alle aandacht uit naar cholesterol, een lipide, en macrofagen, een type immuun cel die in de vaatwand ongeremd cholesterol blijft opnemen net zo lang totdat er een vette atherosclerotische plaque ontstaat. Recent onderzoek heeft het belang van andere factoren, zoals triglyceriden en T cellen, als significante risicofactoren voor atherosclerose geïdentificeerd. Overtollige triglyceride in de bloedbaan kan atherosclerose veroorzaken en/of verergeren, voornamelijk via triglyceride-rijke lipoproteïnen. Daarnaast worden T cellen, een belangrijk onderdeel van het adaptieve immuunsysteem, ook in grote aantallen aangetroffen in zogenoemde atherosclerotische plaques. Echter, deze cellen en lipiden zijn al aanwezig en actief in het menselijk lichaam voordat ze de plaats van de atherosclerotische plaque bereiken. Het doel van dit proefschrift is daarom het beter begrijpen van hoe triglyceriden en vetzuren T cellen kunnen beïnvloeden in de context van atherosclerose.

In het menselijk lichaam speelt elke cel en lipide een belangrijke eigen rol. In dit systeem zijn triglyceriden cruciale bouwstenen die energie en structuur aan cellen leveren. Triglyceriden zijn opgebouwd uit drie vetzuurmoleculen die met elkaar verbonden zijn door glycerol. Triglyceriden dienen als energiereservoir aangezien ze door de cel kunnen worden afgebroken waardoor de verzuurcomponenten vrijkomen. Deze kunnen vervolgens gebruikt worden als voedingsstoffen voor diverse processen in de cel. Op deze manier spelen ook vetzuren een cruciale rol in het menselijk systeem. Vetzuren kunnen onderverdeeld worden in verzadigde, enkelvoudig onverzadigd, en meervoudig onverzadigd. Deze benaming heeft te maken met het aantal dubbele bindingen in de chemische structuur van het vetzuur, waarbij onverzadigde vetzuren geen dubbele bindingen hebben, enkelvoudig onverzadigde vetzuren er één hebben, en meervoudig onverzadigde vetzuren er twee of meer hebben. Over het algemeen worden verzadigde vetzuren als ongezond beschouwd, terwijl onverzadigde vetzuren als gezond worden gezien.

T cellen zijn gespecialiseerde immuuncellen die hun omgeving, waaronder triglyceriden en vetzuren, kunnen waarnemen en daar vervolgens op kunnen reageren. T cellen in de circulatie verkeren over het algemeen in een niet-geactiveerde stand. In deze stand prolifereren T cellen niet, produceren ze geen cytokines en vertonen ze lage metabolische activiteit in de vorm van

bèta-oxidatie. Pas wanneer ze worden gestimuleerd door antigeen-presenterende cellen, zoals macrofagen of dendritische cellen, worden ze geactiveerd en wekken ze immuun responsen op. Zodra een T cel geactiveerd is, zal deze prolifereren, cytokines produceren en zijn metabolisme omzetten naar aerobe glycolyse, vetzuur- en cholesterolbiosynthese. Het is tot nu toe nog niet bekend of T cellen beïnvloed kunnen worden door de interacties met triglyceriden en verschillende vetzuren en of dit vervolgens kan leiden tot ongewenste reacties in een omgeving met hoge lipidengehaltes, zoals een atherosclerotische plaque.

Om deze vraag te onderzoeken hebben we in dit proefschrift verschillende *in vitro*, -omics en *in vivo* technieken toegepast. Een *in vitro* experiment is een type wetenschappelijk onderzoek waarbij dingen worden bestudeerd buiten een levend organisme. Het woord “*in vitro*” betekent letterlijk “in het glas” en verwijst naar het feit dat de experimenten vaak plaatsvinden in containers, zoals reageerbuisjes of petrischalen. Een -omics experiment bestudeert grote hoeveelheden biologische gegevens, zoals alle genen (transcriptomics), eiwitten (proteomics), of metabolieten (metabolomics) in een organisme, om een uitgebreid overzicht van biologische processen te krijgen. Een *in vivo* experiment is een onderzoek dat wordt uitgevoerd binnen een levend organisme, zoals een dier of een mens. In plaats van in een laboratoriumglaswerk te werken, worden de tests direct in het lichaam gedaan. Dit helpt wetenschappers te begrijpen hoe een behandeling of stof zich gedraagt in een echte biologische omgeving. Als resultaat leidt dit proefschrift tot een meer omvattend begrip van de invloed die vetzuren en triglycerideniveaus hebben op de functie van T cellen.

Ten eerste hebben we systematisch de bekende effecten van vetzuren op de functie van T cellen in kaart gebracht en hebben we dit vervolgens vergeleken met de bekende effecten van diezelfde vetzuren op de ontwikkeling en progressie van atherosclerose. Dit hebben we gedaan door eerst de functie van T cellen in vier categorieën (metabolisme, activatie, proliferatie en differentiatie) te verdelen. Hierdoor konden we de individuele effecten van 14 verschillende vetzuren op de functie van T cellen in kaart brengen. Opvallend genoeg kwam naar voren dat de manier waarop vetzuren T cellen beïnvloeden overeenkomt met de invloed die deze vetzuren hebben op de ontwikkeling van atherosclerose. Belangrijk is wel dat dit resultaat gevonden werd in geactiveerde T cellen en dat dit resultaat dus niet noodzakelijkerwijs reflecteert hoe vetzuren T cellen beïnvloeden vóór dat deze geactiveerd zijn, zoals de T cellen normaal gesproken voorkomen in de bloedbaan.

Om te onderzoeken hoe vetzuren de functie van T cellen beïnvloeden vóór dat deze geactiveerd zijn, hebben we een *in vitro* model ontwikkeld. Hierbij hebben we ons gericht op CD4⁺ T cellen, die over het algemeen een pro-inflammatoire rol spelen in atherosclerose. Deze CD4⁺ T cellen hebben we blootgesteld aan één van de meest voorkomende vetzuren in de circulatie, oliezuur, dat ook geassocieerd is met een verhoogd risico op hart- en vaatziekten. Door gebruik te maken van dit *in vitro* blootstellingsmodel hebben we de expressieniveaus van duizenden genen tegelijkertijd onderzocht via RNA-sequencing. Na het blootstellen van niet-geactiveerde CD4⁺ T cellen aan oliezuur, vonden we met RNA-sequencing sterke veranderingen in het T cel metabolisme richting een pro-inflammatoire staat, doordat de cellen de expressie van genen die te maken hebben met vetzuurbiosynthese en cholesterolbiosynthese verhoogde. Dit resultaat werd verder bevestigd

door CD4⁺ T cellen te activeren na de blootstelling aan oliezuur en de ontwikkeling van T cell subsets te meten. De resultaten lieten zien dat wanneer T cellen vooraf zijn blootgesteld aan oliezuur, ze vaker IL-9⁺ producerende T cellen worden na activatie dan T cellen die niet vooraf zijn blootgesteld. IL-9 is het kenmerkende cytokine van de sterk pro-inflammatoire T_H9 subset die is geassocieerd met de verergering van atherosclerose. Interessant genoeg werd deze bevinding omgekeerd als de cellen tegelijkertijd aan de blootstelling met oliezuur ook blootgesteld werden aan statines, krachtige cholesterolbiosyntheseremmers. Deze bevindingen duiden aan dat vetzuren atherosclerose kunnen beïnvloeden door immuuncellen aan te tassen, bijvoorbeeld via cellulaire metabolisme.

Vervolgens hebben we de rol van andere vetzuurtypes op de functie van CD4⁺ T cellen onderzocht. Specifiek hebben we ons gericht op eicosapentaeenzuur (EPA), een meervoudig omega-3 onverzadigd vetzuur. Dit vetzuur was gebruikt in de REDUCE-IT-studie, die aantoonde aan dat patiënten met hypertriglyceredemie die EPA kregen, beter waren in het verlagen van triglyceriden, cardiovasculaire gebeurtenissen en cardiovasculaire sterfte dan een placebo. Ondanks deze resultaten, is het nog steeds onduidelijk hoe EPA precies zijn voordelen biedt, en er zijn slechts beperkte studies gedaan naar deze effecten. Genexpressie levels lieten een sterke anti-inflammatoire profiel zien in de CD4⁺ T cellen die *in vitro* zijn blootgesteld aan EPA. Om beter te begrijpen waarom bepaalde genexpressie levels verhoogd of verlaagd waren, hebben we ook ATAC-sequencing toegepast om te identificeren waar transcriptiefactoren, eiwitten die de gen activiteit reguleren, binden aan DNA. Deze analyse liet zien dat GATA3 en PU.1, die belangrijk zijn voor de ontwikkeling van T_H2- en T_H9-cellen, verminderd worden, terwijl REV-ERB, dat de ontwikkeling van T_H17-cellen tegenwerkt, verhoogd wordt. T_H2, T_H9, en T_H17 kunnen ieder een pro-inflammatoire rol spelen in verschillende ziektes, en dus is de verlaging van expressie van deze subsets gunstig. Verder hebben we ook T cellen blootgesteld aan palmitinezuur, een verzadigd vetzuur, of oliezuur, een enkelvoudig onverzadigd vetzuur om een breder begrip te krijgen van de rol van de verzadiging van vetzuren in de functie van CD4⁺ T cellen. Deze resultaten lieten zien dat de anti-inflammatoire effecten uniek waren voor EPA blootgestelde cellen, een bevinding dat kan bijdragen aan de onverwacht sterke gunstige effecten in studies zoals REDUCE-IT.

Tot slot hebben we geprobeerd om onze *in vitro* bevindingen te vertalen naar een *in vivo* model. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van een “natuurlijk experiment” ontwerp, waarbij we de CD4⁺ en CD8⁺ T cellen van individuen met verhoogde triglycerideniveaus (2.7–8.5mmol/L) door primaire, of genetische mutaties, vergeleken met die van personen zonder dergelijke mutaties. Deze opzet bootst een gecontroleerde experimentele opstelling na waarbij genetische variatie fungeert als een natuurlijke interventie. We hebben opnieuw RNA-sequencing toegepast om globale verschillen in genexpressie te bepalen in CD4⁺ en CD8⁺ T cellen tussen individuen met en zonder mutaties. In de T cellen afkomstig van personen met een verhoogd triglycerideniveau vonden we genexpressie levels die een pro-inflammatoir profiel markeren. Specifiek zagen wij een op-regulatie van het gen *IL6R* in de CD4⁺ T cellen, een gen dat een cytokine codeert die causaal verband houdt met hart- en vaatziekten. Opmerkelijk is dat patiënten met een triglyceridegehalte tussen de 2.7–8.5mmol/L een verhoogd risico op hart- en vaatziekten hebben.

Dit risico vervalt echter als het triglycerideniveau boven de 10mmol/L komt, doordat triglyceriden dan voornamelijk worden opgeslagen in deeltjes die chylomicronen heten, die te groot zijn om gemakkelijk door de vaatwand heen te kunnen passeren. Opmerkelijk genoeg kwam het pro-inflammatoir gen expressie profiel niet te voren in T cellen afgeleid van patiënten met deze extreem hoge triglyceriden. Verder werden de transcriptieverschillen omgekeerd bij patiënten met lage triglyceriden (0.1–0.3mmol/L), of hypotriglyceredemie, een aandoening dat ook verdacht wordt van een beschermend effect tegen hart- en vaat ziekte. Als laatste was het pro-inflammatoire gen expressie profiel in T cellen afgeleid van patiënten met secundaire hypertriglyceredemie (tussen de 2.7–8.5mmol/L), veroorzaakt door secundaire oorzaken zoals diabetes, wel terug gevonden, hoewel in mindere mate. Dit onderzoek wijst erop dat verhoogde triglyceriden kunnen bijdragen aan hart- en vaatziekten, potentieel door een inflammatie in T cellen te bevorderen.

Samenvattend breekt dit proefschrift met eerdere onderzoeken door te kijken naar de complexe interactie tussen vetzuren en T cellen, vooral in de vroege, niet-geactiveerde stadia. Het onderzoek suggereert dat CD4⁺ T cellen sterk worden beïnvloed door hun omgeving en dat cel metabolisme een belangrijke rol speelt in de uiteindelijke cel functie. Het blijkt dat verschillende vetzuren uiteenlopende effecten kunnen hebben op T cellen, variërend van pro- tot anti-inflammatoir, en dat het meten van globale genexpressieverschillen diepgaande inzichten kan geven in de toestand van de cel. Tot slot wordt gesuggereerd dat het aanpakken van triglyceriden en vetzuren mogelijk gunstige effecten kan hebben op atherosclerose door de ontstekingsremmende eigenschappen van T cellen te benutten. Dit werk opent nieuwe mogelijkheden voor verder onderzoek en bevordert een beter begrip van de ingewikkelde relatie tussen vetzuren en T cellen, met implicaties voor de kennis over gezondheid en ziekte.