



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The aging B cell landscape in atherosclerosis

Mol, J. de

Citation

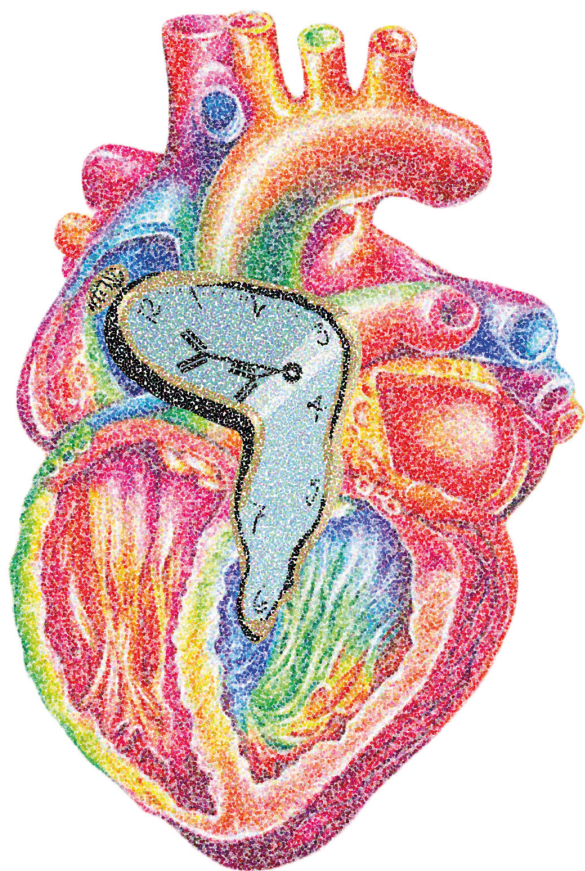
Mol, J. de. (2025, December 11). *The aging B cell landscape in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4285092>

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/1887/4285092>

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



Appendix

Nederlandse samenvatting

Scientific publications

Curriculum vitae

PhD portfolio

ACHTERGROND

Hart- en vaatziekten, ook wel bekend als cardiovasculaire aandoeningen, vormen een brede categorie aandoeningen die het hart en de bloedvaten aantasten. Elk jaar overlijden gemiddeld 20 miljoen mensen aan de gevolgen van hart- en vaatziekten, wat ze tot de belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd maakt.¹ Veroudering is één van de grootste risicofactoren voor deze aandoening², wat betekent dat de toenemende vergrijzing van de wereldbevolking leidt tot een groeiend aantal mensen met cardiovasculaire aandoeningen en daarmee tot een grotere maatschappelijke en economische uitdaging. In Nederland alleen al leven 1,7 miljoen mensen met een vorm van hart- en vaatziekten, en dagelijks overlijden gemiddeld 103 mensen aan de gevolgen van deze ziekten. Van alle hart- en vaatziekten wordt 85% geassocieerd als atherosclerotische cardiovasculaire aandoeningen, zoals een hartinfarct, herseninfarct en aneurysma. Deze ziektes delen dezelfde fundamentele oorzaak: slagaderverkalking, ook wel atherosclerose genoemd, waarbij de slagaders vernauwd raken door ophopingen van vet, immuuncellen en ontstekingsstimulerende stoffen³.

ONTWIKKELING VAN ATHEROSCLEROSE

Atherosclerose is een chronisch proces dat ontstaat wanneer vetten zoals cholesterol zich ophopen in de wanden van slagaderen. Het probleem begint vaak wanneer er te veel low-density lipoproteïne-cholesterol (LDL-c), ook wel het slechte cholesterol genoemd, in het bloed aanwezig is.⁴ LDL kan door kleine beschadigingen of zwakke plekken in de binnenste laag van de slagaderwand, het endotheel, dringen. Deze beschadigingen ontstaan vaak door risicofactoren zoals hoge bloeddruk, roken, diabetes, of veroudering, die de integriteit van het endotheel verminderen. Eenmaal in de binnenste laag wordt het LDL vastgehouden door interacties met extracellulaire matrixcomponenten en ondergaat het chemische veranderingen, zoals oxidatie. Deze modificaties veranderen de structuur en reactiviteit van LDL⁵, waardoor het schade kan toebrengen aan omliggende cellen en het immuunsysteem activeert. Het lichaam ziet geoxideerd LDL als een bedreiging, vergelijkbaar met een bacterie of virus. Dit proces markeert de vroege fase van atherosclerose, waarin de basis wordt gelegd voor ontstekingen en plaquevorming.

Allereerst worden circulerende immuuncellen, genaamd monocytën, gerekruteerd naar de plek van LDL oxidatie.^{6,7} Deze monocytën dringen de slagaderwand binnen en veranderen daar in macrofagen, die het schadelijke LDL proberen op te ruimen middels fagocytose. Deze vetopname is zo groot, dat de macrofagen veranderen in schuimcellen die in de vaatwand ophopen. Deze schuimcellen vormen een kenmerkend onderdeel van de vroege plaques in de slagaderwand. Naarmate meer schuimcellen zich ophopen, raakt de slagaderwand steeds dikker, wat uiteindelijk leidt tot een verminderde elasticiteit en een beperkte bloedstroom. Daarnaast veroorzaken schuimcellen een immunologische kettingreactie door stoffen uit te scheiden die meer immuuncellen aantrekken naar de atherosclerotische plaque, waaronder monocytën en dendritische cellen. Dendritische cellen kunnen ook geoxideerd LDL (oxLDL) opnemen, maar vormen in tegenstelling tot macrofagen geen schuimcellen. Dendritische cellen verwerken oxLDL tot antigenen, die ze vervolgens aan T-cellen presenteren in nabijgelegen lymfeklieren. Deze antigeenpresentatie activeert T-cellen, die vervolgens naar de atherosclerotische plaque worden gerekruteerd, waar zij cytokines uitscheiden die de ontsteking in de plaque versterken.

Deze cytokines trekken ook andere immuuncellen, zoals B-cellen, aan.

B-cellen spelen een complexe en veelzijdige rol in atherosclerose en staan vooral bekend om hun vermogen om antilichamen te produceren.⁸ B-cellen kunnen worden onderverdeeld in B1 en B2 cellen, die verschillende effecten hebben op de ontwikkeling van atherosclerose. B1 cellen hebben een beschermende rol doordat ze natuurlijke antilichamen, zoals IgM, produceren, die schadelijke stoffen waaronder oxLDL neutraliseren en de opruiming van deze stoffen bevorderen. B2 cellen daarentegen spelen vaak een ontstekingsstimulerende rol. Ze kunnen IgG-antilichamen produceren, die in sommige gevallen de ontsteking verder versterken. Daarnaast scheiden B-cellen ook cytokines uit die T-cellen en macrofagen activeren of reguleren.

Om de groeiende plaque enigszins te stabiliseren, maken gladde spiercellen die naar de plaque migreren een zogenaamde fibreuze kap, bestaande uit collageen. Deze kap kan voorkomen dat de plaque scheurt en zo ernstige complicaties veroorzaakt. Anderzijds ontstaat diep in de plaque vaak een kern van apoptotisch en necrotisch weefsel, bestaande uit dode schuimcellen en afvalstoffen, welke in combinatie met een dunner wordende fibreuze kap en aanhoudende immuunactiviteit, bijdragen aan een instabiele en scheurende plaque.⁹ Aan een gescheurde plaque kan een bloedstolsel blijven plakken, die vervolgens de bloedstroom volledig kan blokkeren en een levensbedreigend cardiovasculair event kan veroorzaken. Dit proces illustreert hoe de interactie tussen cholesterolfophing, immuuncellen en ontstekingsprocessen de kern vormt van de ontwikkeling en gevolgen van atherosclerose.

VEROUDERD IMMUUNSYSTEEM

Zoals hierboven vermeld, dragen diverse immuuncellen bij aan de ontwikkeling van atherosclerose. Veroudering heeft een grote impact op het immuunsysteem, met name door processen zoals *immunosenescence* en *inflammaging*.¹⁰ *Immunosenescence* vermindert de effectiviteit van immuuncellen waardoor het lichaam minder goed ontstekingen kan reguleren. Tegelijkertijd veroorzaakt *inflammaging* een chronisch verhoogd niveau van ontsteking, wat de vorming en instabiliteit van atherosclerotische plaques versterkt. Deze leeftijdsgebonden veranderingen vergroten het risico op cardiovasculaire complicaties aanzienlijk.

Het meenemen van deze processen in onderzoek naar atherosclerose is cruciaal. Interventies gericht op het tegengaan van *immunosenescence* en *inflammaging* kunnen mogelijk niet alleen de progressie van de ziekte vertragen, maar ook het risico op hartinfarcten en beroertes verlagen. Gezien de toenemende vergrijzing is dit een essentieel onderzoeksgebied om de impact van hart- en vaatziekten te beperken.

DIT PROEFSCHRIFT

In dit proefschrift onderzochten we hoe het immuunsysteem, en met name B-cellen, verandert tijdens de veroudering en welke rol deze veranderingen spelen in de ontwikkeling van atherosclerose, met als uiteindelijke doel om nieuwe aanknopingspunten te vinden voor betere prognoses en behandelingen van hart- en vaatziekten. In **hoofdstuk 2** gaven we een overzicht over de beschreven invloed van veroudering op de ontwikkeling en werking van B-cellen en associeerden we deze veranderingen met chronische ontstekingsziekten waaronder atherosclerose. In **hoofdstuk 3** onderzochten we de ontwikkeling

van atherosclerose en veranderingen in het immuunsysteem in muizen die we lieten verouderen, en vergeleken we dit met de aanwezige immuuncellen in jonge muizen waarin atherosclerose versneld geïnduceerd is. In **hoofdstuk 4** vergeleken we de morfologische en immuungerelateerde verschillen in de atherosclerotische plaque tussen oude mannelijke en vrouwelijke muizen om sekseverschillen in kaart te brengen. In **hoofdstuk 5** gebruikten we muizen die zonder atherosclerosevorming verouderden, en induceerden we atheroscleroseontwikkeling op latere leeftijd om beter te begrijpen hoe het verouderde immuunsysteem bijdraagt aan de initiatie van atherosclerose ten opzichte van de initiatie in jonge muizen. Daarna richtten we ons in **hoofdstuk 6** op het fenotype van leeftijdsgelateerde B-cellen (ABCs) en beschreven we de pro-atherogene invloed van deze cellen in muizen en mensen. In **hoofdstuk 7** onderzochten we of het mogelijk is om B-cellen via een specifieke IFN γ -prikkel zodanig te beïnvloeden dat ze bescherming bieden tegen atherosclerose. Tot slot testten we in **hoofdstuk 8** het effect van het anti-verouderingsmiddel rapamycine op het atherosclerotische milieu in oude muizen, waar we een remmend effect vonden op de T- en B-cel reactie.

In **hoofdstuk 2** leverden we een uitgebreid overzicht van studies die de invloed van veroudering op B-celbiologie beschrijven, zowel bij gezondheid als ziekte, met een focus op mogelijke therapieën die zich richten op verouderde B-cellen bij atherosclerose. Uit recent onderzoek blijkt dat veroudering de ontwikkeling van B-cellen in het beenmerg verstoort, wat leidt tot een afname van naïeve B-cellen en een beperkter vermogen om nieuwe ziekteverwekkers te herkennen.^{11–13} Tevens zien we na veroudering een toename van zogenoemde leeftijdsgelateerde B-cellen (ABCs).¹⁴ Deze cellen, herkenbaar aan de expressie van CD11b en/of CD11c, produceren ontstekingsbevorderende cytokines en antilichamen die gericht zijn tegen lichaamseigen stoffen. Deze veranderingen in het B-cel spectrum gaan gepaard met een verhoogd risico op infecties, auto-immuunziekten en chronische ontstekingsziekten zoals atherosclerose. Onze literatuuranalyse benadrukt het belang van verder onderzoek naar de specifieke rol van verschillende soorten B-cellen bij veroudering en hun bijdrage aan atherosclerose. Een beter begrip van de leeftijdsgebonden veranderingen in B-cellen is essentieel voor het ontwikkelen van gerichte therapieën die de gevolgen van *immunosenescence* kunnen verzachten en de ziektelast van ouderdomsgelateerde aandoeningen zoals atherosclerose kunnen verminderen.

Met dat doel voor ogen onderzochten we in de eerste studie het immuunlandschap in plaques afkomstig van verouderde (20-22 maanden) *Ldlr*^{-/-} muizen, een model dat vergelijkbaar is met mensen van rond de 60-65 jaar. We gebruikten hiervoor moderne technieken, zoals *single-cell RNA sequencing*, flowcytometrie en immunohistochemie. In **hoofdstuk 3** vergeleken we het immuunprofiel van deze oudere, vrouwelijke, muizen met dat van jonge vrouwelijke muizen op een normaal én vetrijk ‘Westers’ dieet. Om een beter inzicht te krijgen in seksegerelateerde variaties, onderzochten we vervolgens in **hoofdstuk 4** het immuunsysteem in mannelijke en vrouwelijke oudere muizen.

In de oudere muizen zagen we in het bloed een toename van myeloïde immuuncellen, zoals neutrofielen en monocytten, terwijl het aandeel T en B-cellen afnam, een verschuiving die ook wordt gezien tijdens veroudering in mensen.¹⁵ Oude T-cellen vertoonden bovendien kenmerken van langdurige activatie en stimulatie. Daarnaast constateerden we verhoogde IgM-waarden in het bloed van oude muizen, een eerder beschreven fenomeen bij veroudering in andere muismodellen.¹⁶ Hoewel de grootte van

atherosclerotische plaques vergelijkbaar was tussen jonge muizen op een vetrijk dieet en oude muizen op een normaal dieet, observeerden we bij de oude muizen duidelijke leeftijdsgebonden veranderingen zoals meer collageen, cholesterolkristallen en verkalking, kenmerken die samenhangen met instabiele plaques in patiënten met cardiovasculaire ziekten.¹⁷ Mannelijke muizen ontwikkelden grotere necrotische kernen in hun plaques en hadden minder collageen dan vrouwelijke muizen, wat aansluit bij bevindingen in mannen met hart- en vaatziekten.¹⁸ De verouderde plaques lieten daarnaast een andere samenstelling van immuuncellen ten opzichte van jonge plaques zien, met lokaal minder macrofagen. Op *single-cell* niveau observeerden we dat het aantal beschermende, zogeheten resident-achtige, macrofagen sterk afnam bij oude *Ldlr*^{-/-} muizen. Deze macrofagen spelen normaliter een belangrijke rol in het behoud van evenwicht in de vaatwand. Tegelijkertijd zagen we een toename van ontstekingsbevorderende *Il1b*⁺ macrofagen, die de ontstekingsgenen *Il1b*, *Nlrp3* en *Trem1* tot expressie brengen, welke in humane plaques worden geassocieerd met instabiliteit.^{19,20} Daarnaast constateerden we een afname van *Trem2*⁺ schuimcellen, die helpen bij het opruimen van vetten in de plaque.²¹ Dit verhoogde ontstekingsprofiel was sterker aanwezig bij vrouwelijke dan mannelijke muizen, wat suggereert dat vrouwelijke plaques sterker worden gekenmerkt door een actieve chronische ontstekingsreactie.

Ook T-cellen vertoonden duidelijke leeftijdsgebonden veranderingen. In de plaques van oude muizen constateerden we een toename van CD8⁺ T-cellen met een zogenaamd 'uitgeput' profiel, waarbij genen zoals *Eomes*, *Pdcd1* en *Lag3* verhoogd waren. Deze CD8⁺ T-cellen waren ook hoog in hun expressie van granzyme B en granzyme K, stoffen die schade aan cellen kunnen veroorzaken en ontsteking verder kunnen activeren.²² Bovendien waren deze CD8⁺ T-cellen ook rijk aan *Ccr5* en zijn ligand *Ccl5*, welke migratie van andere immuuncellen naar de plaque stimuleren. Eerdere studies laten zien dat remming van deze *Ccr5-Ccl5* as leidt tot minder plaquevorming en verminderde infiltratie van macrofagen.²³ Hoewel deze CD8⁺ GzmK⁺ T-cell populatie in beide geslachten werd gevonden, was de proportie aanzienlijk groter in mannelijke muizen. Vrouwtjes hadden daarentegen een grotere toename van CD4⁺ CD8⁺ dubbelpositieve T-cellen in hun plaques. Deze T-cellen zijn mogelijk ontsnapt aan negatieve selectie in de thymus, een proces dat afneemt bij veroudering.²⁴ Het is bekend dat oestrogeen dit proces negatief beïnvloedt²⁵, wat mogelijk de hogere getallen in vrouwtjes verklaart. Wat betreft regulatoire T-cellen zagen we in oude muizen een toename ten opzichte van jonge muizen, met een vergelijkbaar profiel (*Foxp3*, *Ctla4* en *Ebi3*) tussen mannen en vrouwen. Ondanks dat deze toename duidt op een poging tot regulatie van ontsteking, is het nog onduidelijk of veroudering de functionaliteit van deze cellen aantast.

Het B-cel landschap veranderde ingrijpend na veroudering. In de plaques van oude muizen zagen we een duidelijke toename van B1-achtige/ regulatoire B-cellen en ABCs, terwijl de klassieke B2 cellen juist afnamen. B1 en regulatoire B-cellen produceren beschermende IgM-antilichamen en ontstekingsremmende cytokines zoals IL-10.^{26,27} Hun toename hint dus op een poging van het immuunsysteem om de ontsteking in toom te houden. Echter kan veroudering mogelijk de functie van deze cellen verstoren, waardoor ze minder effectief worden. Tegelijkertijd noteerden we een sterke leeftijdsgebonden toename van CD11b⁺ CD11c⁺ ABCs. In onze analyses vertoonden deze ABCs verhoogde expressie van genen voor plasmaceldifferentiatie en antilichaamproductie (*Zbtb20*, *Zeb2*, *Ighg3*), wat hun rol in antilichaamproductie tegen lichaamseigen antigenen bevestigt.²⁸ Daarnaast

toonden we aan dat ABCs antigenen kunnen presenteren, en hiermee CD4⁺ T-cellen effectiever activeren dan folliculaire B-cellen. Vrouwelijke muizen vertoonden een sterkere toename in ABCs dan mannen, en we vonden meer plasmacellen in de aortawand van vrouwen dan mannen. Aangezien oestrogeen een rol speelt in de overleving en activatie van B-cellen^{29,30}, kan dit een mogelijke verklaring zijn voor dit sekseverschil. Daarnaast bevinden belangrijke B-cel-gerelateerde genen, zoals *Tlr7* en *Cd40l*, zich op het X-chromosoom³¹, wat kan bijdragen aan de gevoeligheid van vrouwen voor auto-immuunachtige ontstekingsziekten.

Hoewel deze modellen waardevolle inzichten hebben geleverd in de leeftijdsgebonden veranderingen in het immuunsysteem tijdens atherosclerose, blijft het in het verouderde *Ldlr*^{-/-} muismodel lastig om vast te stellen hoe veroudering op zichzelf de ziekteontwikkeling beïnvloedt. In tegenstelling tot dit *Ldlr*^{-/-} model, waarin veroudering en atherosclerose zich in parallel ontwikkelen, maakt het AAV-PCSK9 model het mogelijk om atherosclerose kunstmatig te initiëren in zowel jonge als oude C57Bl/6 muizen die van nature nog geen plaques hebben ontwikkeld. Dit bood ons in **hoofdstuk 5** de mogelijkheid om de directe impact van immunosenescence op het begin en verloop van atherosclerose te bestuderen. Bij blootstelling aan acute hypercholesterolemie bleken oude muizen vatbaarder te zijn voor plaquevorming dan hun jongere soortgenoten. Plaques van oude muizen vertoonden bovendien een geavanceerder stadium, gekenmerkt door meer collageenafzetting en sterkere infiltratie van immuuncellen. Dit is mogelijk te verklaren door een verslechterde barrièrefunctie van cellen in de vaatwand en een verhoogde aantreking van immuuncellen door aantrekkingsignalen die toenemen met veroudering.³²⁻³⁴ Net als in het *Ldlr*^{-/-} model zagen we in dit model een duidelijke afname van het aantal CD4⁺ T-cellen in de circulatie en de milt van oude muizen. De overgebleven T-cellen lieten typische kenmerken van *immunosenescence* zien, waaronder verhoogde expressie van p21, TIGIT en verlies van CD27.³⁵ Ook waren ontstekingsbevorderende signalen, zoals IFN γ en granzyme B verhoogd, wat past bij het fenomeen *inflammaging*. Op B-celniveau viel wederom de toename van ABCs en plasmacellen op, welke gepaard gingen met verhoogde spiegels van verschillende antilichamen (IgM, IgG2b en IgG2c) in het bloed. Ondanks dat we ook een toename van regulatorie T en B-cellen waarnamen, werden hun gunstige effecten hoogstwaarschijnlijk overschaduwed door de dominante aanwezigheid van ontstekingsbevorderende immuuncellen. Deze bevindingen laten opnieuw zien dat het immuunsysteem enorm verandert met de leeftijd, en dat deze veranderingen directe gevolgen hebben voor het ontstaan, het verloop, én de ernst van de ziekte. Hiermee onderstrepen we hoe belangrijk het is om veroudering expliciet mee te nemen in onderzoek naar hart- en vaatziekten.

In **hoofdstuk 6** onderzochten we de relatie tussen het aantal ABCs, zoals eerder geïdentificeerd in **hoofdstukken 3 tot en met 5**, en het optreden van acute hartproblemen (coronaire events) bij mensen. ABCs vormen een heterogene populatie die zowel bij muizen als mensen voorkomt, en wordt gekenmerkt door verschillende expressieprofielen, waaronder IgD⁺ CD27^{laag} (DN2), CD23⁺ CD21^{laag}, CD11b⁺, CD11c⁺ en/of T-bet⁺.¹⁴ Eerder is aangetoond dat CD11c⁺ ABCs en DN2 B-cellen in hogere aantallen aanwezig zijn in oudere personen, en dat deze ABCs geassocieerd zijn met cardiovasculaire ziekten.³⁶ In overeenkomst hiermee vonden wij een duidelijke toename van ABCs bij oudere individuen in vergelijking met mensen van middelbare leeftijd. In het bijzonder toonden we voor het eerst aan dat het aantal ABCs in het bloed voorspellend is voor het risico op een eerste coronair event, onafhankelijk van

traditionele risicofactoren zoals verhoogd cholesterol, roken of verhoogde bloeddruk. Deze bevinding onderstreept de potentie van ABCs als nieuwe biomarker voor cardiovasculaire aandoeningen. Om de eigenschappen en het werkingsmechanisme van ABCs beter te begrijpen, analyseerden we in detail het B-cel landschap in de milt van jonge en oude *Ldlr*^{-/-} muizen, hetzelfde verouderingsmodel als gebruikt in **hoofdstuk 3**. Door middel van *single-cell RNA sequencing*, gecombineerd met *B-cel receptor sequencing*, konden we vaststellen dat ABCs in oude muizen sterke klonale expansie vertonen, met hoge expressie van IgG-antilichamen. Opvallend was dat een groot percentage klonotypes gedeeld werden tussen ABCs en plasmacellen, wat erop duidt dat ABCs zich kunnen differentiëren tot antilichaam-producerende plasmacellen. Deze hypothese werd verder ondersteund door onze adoptieve transferexperimenten waarbij we ABCs geïsoleerd uit oude muizen hebben overgebracht naar jonge *Ldlr*^{-/-} *Rag1*^{-/-} ontvangers, muizen zonder eigen B en T-cellen. We toonden aan dat ABCs zich ontwikkelden tot CD138⁺ plasmacellen, een patroon dat eerder in literatuur is beschreven in kweek.^{14,37} Bij de ontvangers vonden we immunoglobulinen in het bloed, wat bevestigt dat ABCs daadwerkelijk bijdragen aan humorale immuunactiviteit. In aanvullende kweekexperimenten induceerden we plasmaceldifferentiatie en antilichaamproductie door ABCs te stimuleren met zowel T-cel-afhankelijke (IL-21 en α CD40) als T-cel-onafhankelijke signalen, zoals Toll-like receptor liganden. Beide vormen van stimulatie resulteerden in de aanmaak van verschillende soorten antilichamen, waarbij IgG3 in hogere mate werd geproduceerd na T-cel onafhankelijke stimulatie. Het overbrengen van ABCs uit oude muizen naar jonge ontvangers leidde tot versnelde atheroscleroseontwikkeling, met grotere plaques en een grotere necrotische kern. Deze resultaten tonen aan dat ABCs niet slechts een gevolg zijn van veroudering of ziekte, maar dat ze atherosclerose verergeren. Onze bevindingen sluiten aan bij recent onderzoek waarin verminderde atherosclerosevorming werd waargenomen bij *Apoe*^{-/-} muizen met een B-cel-specifieke deletie van de transcriptiefactor T-bet.³⁸ Samenvattend laat onze data de centrale rol van ABCs in het verergeren van atherosclerose zien, suggererend dat het gericht remmen van deze populatie een veelbelovende strategie kan zijn om het risico op cardiovasculaire ziekten bij veroudering te verlagen.

Recent onderzoek van Liu *et al.* toonde aan dat muizen met een genetische aanleg voor lupus, waarbij IFN γ specifiek in B-cellen was uitgeschakeld, aanzienlijk minder ABCs ontwikkelden dan controle muizen met normale IFN γ expressie.³⁹ Deze bevinding suggereert dat IFN γ een sleutelrol speelt in de vorming van ABCs. In ons eigen onderzoek, zoals uiteengezet in **hoofdstuk 7**, hebben we B-cellen, afkomstig van jonge *Apoe*^{-/-} muizen, gestimuleerd met verschillende concentraties van dit cytokine. Deze stimulatie leidde tot een dosisafhankelijke toename in de expressie van het ontstekingsremmende molecuul PD-L1 op B-cellen. Studies hebben reeds aangetoond dat PD-L1 expressie op B-cellen een dempende invloed kan uitoefenen op het immuunsysteem⁴⁰, met name door het onderdrukken van Th17 cellen en folliculaire helper T-cellen (T_{FH}), twee celtypes die een bewezen rol spelen in de ontwikkeling van atherosclerose. Vergelijkbaar hiermee zagen we dat muizen met gevorderde atherosclerotische plaques een verschoven balans vertoonden tussen PD-L1^{hoog} B-cellen en T_{FH} cellen: het aandeel T_{FH} cellen nam toe, terwijl het aantal PD-L1^{hoog} cellen sterk afnam in vergelijking met muizen in een vroeg stadium van plaquevorming. Deze disbalans lijkt dus samen te hangen met ziekteprogressie. We probeerden deze verhouding allereerst te herstellen door PD-L1^{hoog} B-cellen in te spuiten, maar dit bleek op zichzelf onvoldoende om de T_{FH} toename effectief te remmen. Pas na stimulatie buiten het lichaam

met IFN γ zagen we dat B-cellen niet alleen veel PD-L1 tot expressie brachten, maar dat deze ook in staat waren T_{FH} activiteit te onderdrukken. Transfer van deze gestimuleerde B-cellen naar *Apoe*^{-/-} muizen resulteerde in een duidelijke afname van T_{FH} reacties en een verminderde vorming van plasmablasten, die doorgaans bijdragen aan antilichaam-gedreven ontsteking. Tegelijkertijd zagen we een toename in regulatorische T-cellen, wat wijst op een verschuiving naar een meer tolerogeen, ontstekingsremmend immuunprofiel. Uiteindelijk leidde deze interventie tot een meetbare afname in atherosclerotische plaquevorming. Deze resultaten illustreren dat B-cellen, mits op de juiste manier geprogrammeerd, kunnen worden ingezet als actieve remmers van pathogene immuunactiviteit.

Zoals beschreven in **hoofdstuk 7** toont onze strategie aan dat het moduleren van B-cellen buiten het lichaam effectief kan zijn om pathogene T-cel reacties af te remmen. Toch brengt veroudering bijkomende uitdagingen met zich mee voor de regulatie van het immuunsysteem, mede door metabole herprogrammering van cellen. Zo vertonen ABCs een verhoogde afhankelijkheid van oxidatieve fosforylatie en lipidenmetabolisme^{41,42}, wat hun overleving in ontstekingsrijke omgevingen kan bevorderen en weefselschade kan verergeren. Deze metabole verschuivingen zijn niet beperkt tot B-cellen, maar komen ook voor bij immunosenescente T-cellen en disfunctionele myeloïde populaties⁴³, wat suggereert dat het manipuleren van metabole routes bredere therapeutische effecten kan hebben. In **hoofdstuk 8** onderzochten we dit concept door mTORC1 te remmen met rapamycine in verouderde *Ldlr*^{-/-} muizen met atherosclerose. Rapamycine fungeert als een centrale regulator van cellulaire stofwisseling, proliferatie, overleving en immuunceldifferentiatie.⁴⁴ Behandeling met rapamycine leidde tot een duidelijke afname van plaque macrofagen en systemische immuunactiviteit. Ondanks een toename van het circulerende cholesterol, een bekende bijwerking van rapamycine, resulteerde dit niet in verergerde plaquevorming.⁴⁵ Dit wijst op het vermogen van rapamycine om lipidenstoornissen los te koppelen van ontstekingsgerelateerde plaqueontwikkeling. Op immuunvlak stimuleerde rapamycine een verschuiving naar regulatorische en centrale geheugencellen. CD8⁺ centrale geheugen T-cellen namen toe ten koste van naïeve en effectorcellen, wat in lijn is met het bekende effect van rapamycine op verhoogde de formatie van precursors voor geheugencellen.⁴⁶ Ook werden regulatorische T-cellen behouden en vormden zij een groter aandeel binnen de overgebleven CD4⁺ populatie in zowel de aortaboog als lymfoïde weefsels. Onze *single-cell transcriptomics* bevestigde deze bevinding, met een selectieve afname van effector CD4⁺ subsets en een stabiele Treg-frequentie. Aangezien Tregs vasculaire inflammatie onderdrukken, draagt hun behoud mogelijk direct bij aan de verminderde macrofaagpopulatie in plaques. Binnen het B-cel-compartiment verminderde rapamycine het aantal germinaal center (GC) B-cellen en plasmacellen in de mediastinale lymfeknopen. Dit effect werd nog sterker weerspiegeld in de aortaboog, waar *single-cell RNA sequencing* een vrijwel volledige depletie van GC B-cellen en plasmacellen liet zien. Dit wijst op een krachtige onderdrukking van antigeen-gedreven B-cel activatie. Gelijktijdig zagen we een afname van T-folliculaire helper cellen in de milt en van hun cytokine IL-21, beiden essentieel voor GC-onderhoud en plasmacel differentiatie.⁴⁷ Daarnaast zagen we een consistente afname van ABCs in verschillende lymfoïde organen, wat het ontstekingsremmende effect van rapamycine op leeftijdsgebonden immuunveranderingen onderstreept. Tot slot liet genexpressieanalyse in miltcellen een afname zien van klassieke *senescence* markers zoals *Cdkn2a* (p16) en *Btg2*. Hoewel de interpretatie van *senescence* markers contextafhankelijk blijft⁴⁸, sluit deze observatie aan bij eerdere studies waarin mTOR-remming de *senescence-associated secretory*

phenotype (SASP) onderdrukt in zowel immuun- als niet-immuuncellen. Gezamenlijk tonen deze bevindingen aan dat rapamycine in staat is om zowel immuunactivatie als immunosenescence breed te onderdrukken, waarmee het zich profileert als veelbelovende therapie voor verouderingsgerelateerde cardiovasculaire aandoeningen.

TOEKOMSPERSPECTIEVEN

Het groeiende inzicht in de bijdrage van leeftijdsgelateerde veranderingen in B-cel-immuniteit aan atherosclerose en cardiovasculaire ziekten, opent nieuwe onderzoeksrichtingen met belangrijke klinische implicaties. Hoewel onze bevindingen een fundament leggen voor het begrijpen van de rol van deze verouderde B-cellen, is vervolgonderzoek essentieel om precieze mechanismes te ontrafelen. In het bijzonder is er behoefte aan studies die de oorsprong, heterogeniteit, ruimtelijke lokalisatie, antigeenherkenning en functionele reactiviteit van ABCs nader in kaart brengen in hart- en vaatziekten.

Om de cellulaire oorsprong van ABCs beter te begrijpen, zouden methoden ingezet kunnen worden waarmee cellen over tijd gevolgd kunnen worden, ook wel *lineage tracing* genoemd. Hiermee kan men achterhalen uit welke B-cel type (zoals folliculaire of B1 B-cellen) ABCs zich ontwikkelen tijdens veroudering of in de context van atherosclerose. Data in kweek suggereert dat folliculaire B-cellen onder invloed van ontstekingsbevorderende signalen kunnen uitgroeien tot ABCs⁴⁹, een bevinding die overeenkomt met de afname van folliculaire B-cellen bij veroudering. De productie van IgG door plasmacellen die voortkomen uit ABCs ondersteunt deze afstammingslijn verder. Anderzijds suggereert onze single-cell transcriptomics data dat ABCs ook kenmerken delen met B1 cellen, waaronder de expressie van markers CD43 en CD11b, wat wijst op mogelijke plasticiteit in de ontwikkeling.⁵⁰ Door gebruik te maken van fluorescent-gelabelde folliculaire en B1 B-cellen, kunnen deze hypothesen getoetst worden in transfer- of verouderingsmodellen. Modellen met genetische defecten in T-cel-activatie of TLR7/9-siginaalroutes zouden daarnaast cruciale inzichten kunnen geven in de essentiële signalen voor het ontstaan van ABCs. De heterogeniteit van ABCs, zichtbaar in variabele expressie van CD11c, T-bet en immuunregulerende moleculen zoals PD-L1¹⁴, suggereert dat ze niet één uniforme populatie vormen, maar bestaan uit functioneel verschillende subsets, met mogelijk ontstekingsbevorderende en ontstekingsremmende capaciteiten. Desalniettemin toont onze data aan dat ABCs atherosclerose verergeren via differentiatie tot antilichaamproducerende plasmacellen. Meer gedetailleerde analyses op RNA en eiwitniveau, in combinatie met transfer en deletie-experimenten, zijn nodig om subpopulaties van ABCs te identificeren, karakteriseren en hun rol in atherosclerose vast te kunnen stellen.

Spatial transcriptomics is een veelbelovende techniek om de ruimtelijke positionering van ABCs in kaart te brengen.⁵¹ Deze techniek behoudt de architectuur van weefsel en maakt het mogelijk om genexpressiepatronen te koppelen aan specifieke niches in atherosclerotische plaques, zoals de intima, adventitia of arteriële tertiaire lymfoïde structuren (ATLOs). In combinatie met Hyperion massacytometrie zouden eiwitexpressie, activatiemarkers en celinteracties op subcellulair niveau kunnen worden gedetecteerd. Bestaande literatuur heeft reeds aangetoond dat ATLOs in *Apoe*^{-/-} muizen een breed scala aan B-cellen bevatten.^{52,53} Immunohistochemische studies bij patiënten met lupus nefritis suggereren bovendien dat CD11c⁺ T-bet⁺ B-cellen zich in tertiaire lymfoïde structuren bevinden, mogelijk in samenwerking met cytotoxische GzmK⁺ CD8⁺ T-cellen⁵⁴, die wij eveneens observeerden

in onze modellen. Hoewel *spatial transcriptomics* data specifiek gericht op B-cellen nog beperkt is, wees recent werk van Ma *et al.* uit dat veroudering in muizen gepaard gaat met herstructurering van de immunologische architectuur en een toename van immuuncellen in diverse organen, inclusief een ophoping van IgG-producerende B-cellen in lymfoïde weefsels, welke mogelijk analoog zijn aan ABCs.⁵⁵

Naast ruimtelijke lokalisatie blijft het bepalen van antigeenspecificiteit middels *B-celreceptor sequencing* cruciaal. Door B-celreceptor-sequenties van B-cellen uit de circulatie, verschillende organen en de plaque te verzamelen en klonaal te reconstrueren, kan men bepalen welke antigenen ABCs aandrijven.⁵⁶ Recombinante antilichamen, gebaseerd op de volgorde van aminozuren in deze B-celreceptor sequenties, kunnen vervolgens getest worden op binding aan potentiële autoantigenen, zoals geoxideerd LDL, apoptotisch celmateriaal of microbiële mimetica.⁵⁷ Indien antigeenspecificiteit bevestigd wordt, kan men deze antigenen ook testen op hun vermogen om atherosclerose te induceren. In de toekomst zouden T-celtherapieën, die deze atherogene sequenties kunnen herkennen (CAR-T-cellen), of ontstekingsremmende specifieke nanodeeltjes ingezet kunnen worden om deze B-cellen te elimineren of herprogrammeren.^{58,59} Verder onderzoek naar de metabole en epigenetische eigenschappen van verouderde B-cellen kan ook aanknopingspunten bieden voor nieuwe therapieën. Zoals eerder beschreven zijn ABCs afhankelijk van oxidatieve fosforylatie en lipidenmetabolisme⁴², wat hen mogelijk voordeel geeft in inflammatoire niches. Het manipuleren van deze metabole routes, bijvoorbeeld via mTOR-remmers (zie **hoofdstuk 8**) of AMPK-modulators, zou hun overleving en ontstekingsbevorderende functies kunnen onderdrukken. Epigenetische verstoringen, zoals veranderingen in histonacetylering en -methylering, spelen eveneens een rol in de persistentie van autoreactieve B-cellen, zoals bekend in auto-immuunziekten.^{60,61} Toepassing van CRISPR-gebaseerde epigenetische bewerkingstechnieken zou nieuwe mogelijkheden bieden om deze routes in atherosclerose te bestuderen en therapeutisch te beïnvloeden.

De validatie en vergelijking van verschillende verouderingsmodellen is essentieel om de vertaling van experimentele bevindingen naar de kliniek te verbeteren. Standaard muismodellen zijn waardevol om mechanistische inzichten te verkrijgen en causaliteit te onderzoeken, maar reproduceren de menselijke immuunveroudering slechts gedeeltelijk door het behoud in een schone laboratorium omgeving. 'Wildling' muizen, laboratorium-muizen geboren uit wilde muizen^{62,63}, of muizen met een gehumaniseerd immuunsysteem⁶⁴, kunnen aanvullende inzichten geven in de menselijke leeftijdsgebonden veranderingen in het immuunsysteem. Ook muismodellen waarin plaques kunnen scheuren^{65,66}, zoals bij mensen, of modellen waarin een hartinfarct in oude muizen wordt nagebootst, vergroten onze kennis over de bijdrage van ABCs aan acute cardiovasculaire gebeurtenissen. Parallel hieraan is het belangrijk de ontwikkeling van niet-dierlijke systemen, zoals organ-on-a-chips met verouderde endotheel-, spieren immuuncellen, gecombineerd met fysiologische mechanische krachten⁶⁷, te stimuleren. Hoewel deze systemen niet de volledige complexiteit van systemische immunologische netwerken kunnen repliceren, bieden ze waardevolle aanvullende inzichten naast diersmodellen.

Het ontwikkelen van gerichte therapeutische strategieën vormt een belangrijk toekomstig doel binnen het cardiovasculaire onderzoeksveld. Algemeen werkende B-celdepletiemiddelen, zoals Rituximab,

worden reeds getest in hart- en vaatziektenpatiënten in klinische trials (zoals RITA-MI)^{68,69}, maar hun niet-selectieve aard vormt een mogelijk risico. Meer gespecificeerde therapieën, zoals bispecifieke antilichamen of CAR-T-cellen gericht op pathogene B-cellen zouden effectiever en veiliger kunnen zijn. Daarnaast biedt het gebruik van senolytica (**hoofdstuk 8**), gericht op het verwijderen van senescence immuuncellen^{70,71}, een innovatieve strategie om verouderingsgerelateerde ontsteking te verminderen, zonder de hele B-celpopulatie aan te tasten.

CONCLUSIE

Deze thesis draagt bij aan een beter begrip van hoe veroudering het B-cellandschap beïnvloedt binnen het ziekteproces van atherosclerose, en benadrukt het prognostische én therapeutische potentieel van leeftijdsgerelateerde B-cellen (ABCs) voor hart- en vaatziekten. Onze bevindingen tonen aan dat het cruciaal is om veroudering structureel mee te nemen in cardiovasculair onderzoek, en positioneren ABCs als veelbelovende biomarkers voor ziekteprogressie. Vooruitkijkend zullen geavanceerde technologieën zoals spatial transcriptomics en BCR-sequencing onmisbaar zijn om het functionele spectrum van B-celpopulaties verder te ontrafelen. Het gericht moduleren van pathogene B-celsubsets, met behoud van beschermende immuniteit, biedt een veelbelovende route naar meer precieze en doeltreffende interventies bij atherosclerotische hart- en vaatziekten.