



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Profiling of proteins and targeting of myeloid mechanisms in atherosclerosis

Delfos, L.

Citation

Delfos, L. (2026, June 30). *Profiling of proteins and targeting of myeloid mechanisms in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4307144>

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/1887/4307144>

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

Appendix

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum vitae

Nederlandse samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn de voornaamste doodsoorzaak wereldwijd. Deze ziekten worden over het algemeen veroorzaakt door slagaderverkalking ofwel atherosclerose, een ziekte waarbij plaques worden gevormd in de grote en middelgrote slagaderen door de ophoping van vetten en immuuncellen. Hoewel het is aangetoond dat lipiden-verlagende therapieën zoals statines effectief zijn in het beperken van acute hart- en vaatziekten, blijft er een inflammatoir risico bestaan. In de CANTOS studie is het bewezen dat ontstekingsremmende therapie het optreden van acute hart- en vaatziekten verlaagt. In deze klinische studie leidde toediening van het anti-IL-1 β antilichaam canakinumab tot een vermindering van secundaire cardiovasculaire incidenten in patiënten met hoge circulerende hsCRP niveaus (≥ 2 mg/L), die eerder al een hartinfarct hebben doorgemaakt. Echter, canakinumab verhoogde ook de kans op sterfte door infectie. In een andere studie verlaagde ook het anti-inflammatoire middel colchicine het optreden van cardiovasculaire incidenten in patiënten met coronaire hartziekten én het risico van cardiovasculaire incidenten in patiënten met een recent hartinfarct. In een recentere studie had colchicine behandeling echter geen effect op het risico op cardiovasculaire incidenten. Bovendien is het ook aangetoond dat colchicine het optreden van pneumonie verhoogd. Deze studies laten duidelijk de potentie van anti-inflammatoire therapieën voor atherosclerotische cardiovasculaire ziekten zien, maar ook dat deze anti-inflammatoire therapieën voor atherosclerose verder ontwikkeld moeten worden om bijwerkingen in de patiënt te verminderen.

Zowel cellen van het aangeboren immuunsysteem en van het adaptieve immuunsysteem dragen bij aan ziekteprocessen zoals de ontwikkeling van atherosclerose. Alle immuuncellen komen voort uit hematopoëtische stamcellen die zich bevinden in het beenmerg. Deze stamcellen differentiëren via multipotente voorlopercellen in gemeenschappelijke myeloïde en lymfoïde voorlopercellen. Daaruit ontwikkelen zich respectievelijk myeloïde en lymfoïde cellen. Aangeboren immuuncellen zijn over het algemeen myeloïde cellen, zoals neutrofielen, mestcellen, monocytten, macrofagen en dendritische cellen. De lymfoïde T en B cellen zijn adaptieve immuuncellen. In de afgelopen jaren is veel onderzoek gedaan naar de bijdrage van deze immuuncelpopulaties aan de vorming van slagaderverkalking.

In dit proefschrift hebben we als doel gesteld om potentiële nieuwe doelwitten voor de behandeling van atherosclerose te identificeren, waarbij we hebben gefocust op myeloïde cellen. Macrofagen zijn een belangrijke myeloïde celpopulatie in de plaque en kunnen op verschillende manieren bijdragen aan atherosclerose. De activatie van het NLRP3 inflammasoom in macrofagen leidt bijvoorbeeld tot de uitscheiding van de pro-inflammatoire cytokinen IL-1 β en IL-18, wat een inflammatoire response en pyroptose, een vorm van celdood, veroorzaakt. De CANTOS studie is een voorbeeld van een studie waarin wordt ingegrepen op dit inflammatoire proces. Daarnaast zijn macrofagen producenten van verschillende proteasen, enzymen die extracellulaire matrix moleculen kunnen afbreken, in atherosclerotische plaques. Een toename in enzymatische activiteit kan een van de mechanismen zijn die bijdraagt aan de vorming van onstabiele plaques. De destabilisatie van een atherosclerotische plaque is een belangrijk proces dat bijdraagt aan de incidentie van ernstige acute cardiovasculaire incidenten. Om nieuwe actieve enzymdoelwitten te identificeren, hebben we op activiteit gebaseerde eiwitprofilering (activity-based protein profiling (ABPP)) van de serine hydrolase enzymklasse uitgevoerd op vergevorderde humane atherosclerotische carotiden plaques, beschreven in **Hoofdstuk 2**. We hebben ons gericht op

deze serine hydrolases, omdat *in vivo* atherosclerose studies hebben aangetoond dat enzymen van deze klasse plaques kunnen destabiliseren en daarom mogelijke kandidaten voor therapie-ontwikkeling kunnen zijn. Een compleet profiel van de actieve serine hydrolases aanwezig in humane atherosclerotische plaques was echter nog niet gemaakt. In dit onderzoek zijn daarom humane atherosclerotische plaques geanalyseerd en hebben we vijftien actieve serine hydrolases geïdentificeerd, waaronder liver carboxylesterase 1 (CES1), Acylamino-acid-releasing enzyme (APEH) en platelet-activating factor acetylhydrolase (PLA2G7). Welke celtypen de geïdentificeerde enzymen tot expressie kunnen brengen, hebben we vervolgens in beschikbare humane atherosclerotische plaque single cell RNA sequencing (scRNA-seq) datasets bekeken. We hebben gevonden dat *Pla2g7* relatief hoog door myeloïde celclusters tot expressie wordt gebracht en abhydrolase domain-containing protein 16A (*Abhd16a*), retinal dehydrogenase 1 (*Aldh1a1*), 1,4-alpha-glucan-branching enzyme (*Gbe1*) and platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma (*Pafah1b3*) door de mestcelpopulatie. *Ces1* expressie was hoger in gladde spiercellen vergeleken met myeloïde cellen, en lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase (*Lipa*) bleek hoger in myeloïde cellen vergeleken met gladde spiercellen. De activiteit van de serine hydrolases verschilde niet tussen gevorderde plaques met meer stabiele ten opzichte van meer onstabiele karakteristieken. Concluderend zijn actieve serine hydrolases aanwezig in vergevorderde humane atherosclerotische plaques zoals aangetoond met ABPP, waarmee we hebben vastgesteld dat deze techniek geschikt is voor serine hydrolase activiteit metingen in dit complexe pathologische weefsel.

In **Hoofdstuk 3** en **4** hebben we preklinische experimenten uitgevoerd in muizen om de effecten van twee verschillende therapeutische middelen op de ontwikkeling en progressie van atherosclerose te bepalen. Eén van deze middelen is APAC (AntiPlatelet and AntiCoagulant), afgeleid van heparine proteoglycanen, zoals in **Hoofdstuk 3** beschreven. Heparine proteoglycanen afkomstig van mestcellen kunnen worden nagebootst door bioconjugaten die antitrombotische en anti-inflammatoire eigenschappen bezitten. APAC is gebaseerd op deze antitrombotische werking, waarbij een gestandaardiseerd aantal heparine ketens verbonden is met humaan serum albumine. Dit construct richt zich op geactiveerde endotheelcellen en de daarbij behorende adhesie moleculen, alsmede op subendotheliale matrix eiwitten. Onze hypothese was dat toediening van APAC cellulaire interacties in atherosclerotische plaque ontwikkeling zou kunnen remmen, en zodanig ook de vorming van atherosclerotische plaques. Om dit te bepalen hebben we effecten van behandeling met APAC tijdens de start (preventiestudie) en tijdens de progressie (therapeutische studie) van atherosclerose in een experimenteel muismodel bestudeerd. In het preventie experiment verlaagde APAC de carotide plaquegrootte en het volume met meer dan 50%. Daarbij nam ook de macrofaagoppervlakte en het collageengehalte in de plaques af. In het experiment, waarbij we de effecten van APAC op atheroscleroseprogressie hebben onderzocht als translationele therapeutische studie, verlaagde APAC macrofaag ophoping en de grootte van de necrotische kern. De atherosclerotische plaques bleken na behandeling met APAC stabiel. APAC heeft daarom de potentie om de progressie van atherosclerose te verminderen.

Ook hebben we effector mechanismen via het NLRP3 inflammasoom in atherosclerose onderzocht. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat componenten van het intracellulaire NLRP3 inflammasoom tot expressie worden gebracht door macrofagen in de atherosclerotische plaque en dat dit NLRP3 inflammasoom kan bijdragen aan de chronische ontsteking die in de slagaderverkalking plaatsvindt. Het eerder genoemde

ontstekingsremmende middel colchicine voorkomt de vorming van het NLRP3 inflammasoom. Daarnaast medieert het NLRP3 inflammasoom de activatie van IL-1 β , het cytokine dat wordt geremd door canakinumab in de CANTOS studie. Dit laat de potentie van interventie in deze route zien, echter zijn er bijwerkingen van deze middelen. Een nieuwe strategie om het risico op deze bijwerkingen te verlagen zou het remmen van het NLRP3 inflammasoom in een specifiek celtype kunnen zijn. Een nieuw bispecifiek antilichaam InflammAb is ontworpen om het NLRP3 inflammasoom te remmen, maar alleen in cellen die de interleukine-1 receptor type 1 tot expressie brengen. In **Hoofdstuk 4** hebben we de werkzaamheid van InflammAb in het inhiberen van atherosclerose bepaald. InflammAb remde de IL-1 β secretie door primaire muismacrofagen waarin het NLRP3 inflammasoom geactiveerd was. Ook verlaagde InflammAb circulerende IL-1 β niveaus in LPS-geïnjecteerde apolipoproteïne E deficiënte (apoE) muizen. Uit deze experimenten bleek dat InflammAb zowel *in vitro* als *in vivo* effectief is in het remmen van het NLRP3 inflammasoom. Vervolgens hebben we de effecten van InflammAb op de ontwikkeling van atherosclerose onderzocht. Atherosclerotische plaque ontwikkeling in apolipoproteïne E deficiënte muizen bleek significant geremd door behandeling met InflammAb, wat gepaard ging met een vermindering van het macrofaag en necrotische kern gehalte. InflammAb behandeling van reeds gevormde atherosclerotische plaques in apoE deficiënte muizen resulteerde niet in een effect op plaquegrootte. InflammAb zorgde echter wel voor een significante verlaging van het relatieve macrofaag en necrotische kern gehalte in deze plaques, wat een meer stabiel plaque fenotype weergeeft. Concluderend, remming van het NLRP3 inflammasoom door het bispecifieke antilichaam InflammAb toont een veelbelovende werkzaamheid in het remmen van atherosclerotische plaque ontwikkeling en destabilisatie in een muismodel voor atherosclerose.

In onze studies naar onderliggende mechanismen die bijdragen aan de ontwikkeling van atherosclerose maken we als onderzoeksgemeenschap veel gebruik van muismodellen. Daarnaast worden in preklinische studies naar atherosclerose ook varkens en konijnen gebruikt. In preklinische atherosclerose onderzoek is het echter vaak onduidelijk of het geslacht van dieren de therapeutische werkzaamheid kan beïnvloeden. In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of het geslacht van het dier effect heeft op de uitkomst van anti-inflammatoire therapieën in preklinische atherosclerose middels het uitvoeren van een systematisch review. Eerst hebben wij de effecten van bepaalde klassen van ontstekingsremmende therapie in diermodellen voor atherosclerose onderzocht in reeds gepubliceerde studies. We hebben daarbij gekozen om therapieën te onderzoeken, die ingrijpen op de IL-1, IL-6 en IL-18 signaleringscascades. Het ingrijpen op deze routes is, zoals eerder genoemd, een belangrijke focus in de ontwikkeling van anti-inflammatoire therapieën tegen atherosclerose en acute cardiovasculaire syndromen in mensen. In deze studie hebben we door systematisch literatuuronderzoek te doen, bekeken of diermodellen voor atherosclerose geschikt zijn om therapieën, die aangrijpen op deze cytokines, te onderzoeken. Daarnaast hadden we als doel om te bestuderen welk geslacht wordt gebruikt en of het geslacht van het dier invloed heeft op de therapeutische werkzaamheid van dit type interventies in atherosclerotische diermodellen. Om dit te onderzoeken hebben we Medline (PubMed) en EMBASE (OVID) doorzocht en gescreend om de studies te identificeren waarin de effecten van het ingrijpen op IL-1, IL-6 en IL-18 signalering in atherosclerotische diermodellen worden bestudeerd. Van de 1744 verkregen studies hebben we 62 artikelen geïnccludeerd in deze systematische review, waarvan 47 in de meta-analyses. Alle 47 studies hebben muizen gebruikt in de experimenten, waarvan 41 remmende interventies onderzochten en 8 stimulerende interventies. Meta-analyses toonden

een significant kleinere plaque grootte bij inhibitie van cytokine signalering en een significant grotere plaque bij stimulatie, wat grotendeels overeenkomt met de uitkomsten van de beschikbare klinische studies. Deze diermodellen achten we daarom geschikt om dit type onderzoek te doen. Het overgrote deel van de studies heeft echter mannelijke muizen gebruikt. Door het kleine aantal studies met vrouwelijke muizen, kon subgroep analyse voor geslacht alleen worden uitgevoerd voor mannelijke muizen, wat geen verschil aantoonde ten opzichte van de overkoepelende analyses. Dit suggereert dat mannelijke muizen geschikt zijn voor dergelijke studies. Meer studies met vrouwelijke muizen zijn nodig om daadwerkelijk te bepalen of het geslacht van dieren een variabele is in de werkzaamheid van behandelingen waarbij wordt ingegrepen in IL-1, IL-6 en IL-18 routes in atherosclerose.

Samenvattend hebben we in dit proefschrift de potentie van ABPP voor het ontdekken van potentiële nieuwe aangrijpingspunten voor onderzoek aan gevorderde atherosclerose getoond, preklinisch de anti-inflammatoire potentie van twee therapeutische middelen bevestigd en tenslotte het effect van de inclusie van geslacht als variabele in preklinische studies bestudeerd. Aan de hand van onze onderzoeken met APAC, **Hoofdstuk 3**, en InflammAb, **Hoofdstuk 4**, lijkt het richten op myeloïde cellen een veel belovende richting voor de ontwikkeling van een therapie voor atherosclerose. Het richten op endotheel adhesiemoleculen en dus potentieel de rekrutering van myeloïde cellen naar de plaque of het richten op de remming van het NLRP3 inflammasoom in een specifieke myeloïde celsubset in atherosclerotisch weefsel, leidden beide tot een significante verlaging van het relatieve macrofaag en necrotische kern gehalte in plaques en dus meer stabiliteit. Duale therapeutische middelen zoals InflammAb, waarbij het bispecifieke antilichaam bindt aan de interleukine-1 receptor type 1 en intracellulair het NLRP3 inflammasoom remt, zijn specifiek relevant voor therapieën gericht op aangeboren immuuncellen.

Om de vertaling van dit type preklinisch atherosclerose onderzoek naar de mens te verbeteren dient er bestudeert te worden of en wat geoptimaliseerd moet worden in het preklinische onderzoek. Onderzoek naar het effect van het geslacht van muizen op de effecten van anti-inflammatoire therapieën zal aantonen of er verfijning van deze dierstudies betreffende het geslacht van de dieren moet plaatsvinden. In onze systematische review, **Hoofdstuk 5**, aangaande studies in atherosclerotische diermodellen met interventies in IL-1, IL-6 en IL-18 routes vonden we dat de meerderheid van de studies die het geslacht hadden gespecificeerd mannen hadden geïncludeerd, wat het onmogelijk maakte om het effect op de plaque voor vrouwen te bepalen. Daarom raden we aan om het geslacht van de dieren te includeren als variabele in dit soort preklinische studies om het bestuderen van het effect van het geslacht mogelijk te maken. Wanneer dit bepaald kan worden, kan waar nodig dit preklinische onderzoek worden verfijnd wat de vertaling naar de kliniek kan verbeteren. Daarnaast hebben wij aangetoond dat ABPP van humaan plaque weefsel kan resulteren in nieuwe voor de mens relevante myeloïde doelwitten waar duale therapeutische middelen voor ontwikkeld kunnen worden. Het gebruik van meer ruimtelijke technieken, zoals ruimtelijke ABPP (spatial ABPP) waarbij de locatie van verschillende eiwitten in de plaque kan worden bepaald, kunnen helpen bij het bepalen in welke processen in de plaque bepaalde eiwitten betrokken zijn. In combinatie met scRNA-seq kan er bepaald worden in welke cellen de potentiële doel eiwitten aanwezig zijn. Vervolgens kunnen er duale therapeutische middelen worden ontwikkeld voor deze eiwitten in specifieke celtypen.

Concluderend, door eerst juist het onderzoek te verbreden door beide geslachten in preklinisch atherosclerose onderzoek te includeren en door meerdere technieken te combineren, kunnen we precisie therapie voor atherosclerose mogelijk verwezenlijken.