

Caveolin1 and CD40LCD40TRAF interactions in vascular and metabolic disease

Citation for published version (APA):

Engel, D. (2012). *Caveolin1 and CD40LCD40TRAF interactions in vascular and metabolic disease*. BOXPress.

Document status and date:

Published: 01/01/2012

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Atherosclerosis and obesity are chronic inflammatory diseases. As such, they share characteristic features, which include the permanent accumulation of immune cells, dramatic changes in chemokine and cytokine levels and an elevated level of adhesion molecules. All of these features have been shown to be involved at the onset of the disease as well as in disease progression. The prevalence of atherosclerosis and obesity has increased over the last decades and has become a major health and economic problem. Furthermore, it has been shown that obesity, besides the classical risk factors like hypercholesterolemia, smoking, and high blood pressure amongst others, is an additional risk factor for cardiovascular disease. Due to the close relationship between atherosclerosis and obesity we focused on elucidating the molecular mechanisms behind the disease initiation and progression by using specialized mouse models.

Transport molecules, such as caveolin-1, and co-stimulatory molecules, such as the CD40L-CD40 dyad, have been shown to execute fundamental functions in atherosclerosis and in obesity. The loss of caveolin-1 leads to a tremendous decrease in atherosclerotic lesions in mice although elevated cholesterol levels have been reported. The CD40L-CD40 dyad has been shown to efficiently modulate atherosclerotic plaque formation and stability. Regarding obesity, it has become evident that sCD40L levels are up-regulated during obesity and that adipocytes express high levels of CD40. These facts render the CD40L-CD40 signaling cascade to be an interesting target in obesity research.

Transport mechanisms and co-stimulatory molecules are two of the main features involved in atherosclerosis and obesity. Consequently, this thesis focuses on elucidating the contributions of transport and co-stimulatory mechanisms in atherosclerosis and obesity in general and on a cell type specific level.

The genetic deletion of caveolin-1 in atherosclerotic prone mice has been shown to be atheroprotective. Besides elevated plasma cholesterol levels *Cav-1^{-/-}/ApoE^{-/-}* mice presented with significantly smaller atherosclerotic lesions compared to their wild type counterparts. In **chapter 2**, we identify that non-hematopoietic caveolin-1 deficiency is responsible for the diminished abundance and size of atherosclerotic plaques and constrains the leukocyte influx into atherosclerotic lesions. Furthermore, we show that caveolin-1 loss in hematopoietic cells results in an anti-inflammatory T cell response which is characterized by elevated levels of regulatory T cells.

In **chapter 3**, we describe the functions of co-stimulatory molecules in atherosclerosis with a special focus on the CD40L-CD40-TRAF axis. In this chapter, we give an overview of the current relevant knowledge on the impact of co-stimulatory molecules on leukocyte recruitment, plaque progression and destabilization. Furthermore, we discuss the therapeutic possibilities that may arise from targeted interventions in the CD40L-CD40-TRAF axis.

Inhibition of CD40L-CD40 signaling has been shown to be atheroprotective, but clinical trials were terminated due to thrombo-embolic complications. Therefore, we investigated if more specified intervention strategies in CD40 signaling harbor therapeutic potential. In **chapter 4**, we report that CD40 deficiency in the hematopoietic compartment leads to reduced atherosclerosis and results in a stable plaque phenotype. Moreover, abrogation of CD40-TRAF6, but not CD40-TRAF2/3/5 signaling in MHCII⁺ cells prevents atherosclerosis indicating that CD40-TRAF6 mediates the pro-atherogenic pathways. CD40-TRAF6 deficiency leads to a reduced number of inflammatory monocytes, less

recruitment of these cells to the arterial wall, and skews macrophages toward the anti-inflammatory M2 phenotype. Our data unravel the effects of specific interference with the CD40L-CD40-TRAF signaling cascade and establish that target specific intervention strategies hold the potential to achieve therapeutic effects in atherosclerosis.

In **chapter 5**, we review the current knowledge of CD40L-CD40 interactions in type 2 diabetes and how this co-stimulatory dyad links pancreatic, adipose tissue, and vascular inflammation. Furthermore, we elucidate the role of sCD40L in patients with type 2 diabetes and discuss its potential as biomarker for cardiovascular disease. In addition, we highlight the therapeutic potential of CD40L-CD40 blockage in type 2 diabetes.

Regarding the potent role of CD40L-CD40 interactions in type 2 diabetes and its complications, as reviewed in chapter 5, we examined the role of CD40L in a mouse model of diet induced obesity. In **chapter 6**, we show that genetic deficiency of CD40L diminishes adipose tissue inflammation, attenuates the development of diet-induced obesity, and increases systemic insulin sensitivity. Consequently, treatment with an anti-CD40L blocking antibody improved systemic insulin sensitivity, glucose tolerance and CD4⁺ T cell infiltration in adipose tissue. Our data harbor the potential to identify novel therapeutic targets to prevent or diminish obesity and its co-morbidities.

In line with chapter 4, we investigated the impact of CD40 downstream signaling intermediates in diet-induced obesity as well. In **chapter 7**, we investigated the effects that are caused by different CD40-TRAF deletions and assessed their impact on obesity. Our results show that CD40-TRAF2/3/5 deletion aggravated obesity and its co-morbidities in a mouse model of diet induced obesity, whereas *CD40-TRAF6*^{-/-} mice generally resembled the wild type phenotype. From our findings we conclude that the CD40-TRAF2/3/5 signaling axis is crucial in maintaining glucose homeostasis and adipose tissue inflammation in obesity. In addition, our research opens the window towards the discovery of new potential therapeutic targets in obesity.

Finally, **chapter 8** summarizes and discusses the findings of this thesis and future directions are given. In conclusion, this thesis provides novel insights into the biology of caveolae and co-stimulatory molecules in chronic inflammatory diseases. Especially for CD40L-CD40-TRAF interactions, cell type specific contributions are evaluated and potential therapeutic targets for new treatment strategies for atherosclerosis, obesity and the metabolic syndrome are highlighted.

Samenvatting

Atherosclerose, ook bekend onder de naam aderverkalking, en obesitas, beter bekend als vetzucht, zijn chronische inflammatoire ziekten, die karakteristieke kenmerken delen, zoals een permanente accumulatie van immuuncellen, sterke veranderingen in chemokine en cytokine expressie en een toename in adhesiemoleculen. Al deze factoren zijn zowel betrokken bij de initiatie van deze ziekten, als ook bij de verdere ontwikkeling hiervan. De prevalentie van atherosclerose en obesitas is in de laatste decennia sterk toegenomen en vormt een steeds groter wordend gezondheidsprobleem met groeiende economische gevolgen. Verder is aangetoond dat obesitas, onafhankelijk van de klassieke risicofactoren zoals hypercholesterolemie, roken en hoge bloeddruk, een risicofactor is voor cardiovasculaire aandoeningen. Vanwege de sterke relatie tussen atherosclerose en obesitas, hebben we ons gericht op het ontrafelen van de moleculaire mechanismen die van belang zijn bij initiatie en verder ontwikkeling van deze ziekten. Hierbij hebben we gebruik gemaakt van specifieke muismodellen.

Uit onderzoek is gebleken dat transportmoleculen, zoals caveoline-1, en co-stimulatoire moleculen, zoals het CD40-CD40L receptor-ligand paar, een fundamentele rol spelen in atherosclerose en obesitas. Muizen met caveoline-1 deficiëntie vertonen een sterke afname van het aantal atherosclerotische plaques en in de grootte hiervan, hoewel het cholesterolniveau in het bloed toeneemt. Het CD40-CD40L receptor-ligand paar kan op efficiënte wijze zorgen voor modulatie van de vorming en stabiliteit van atherosclerotische plaques. Op het gebied van obesitas is bekend dat sCD40L in het bloed verhoogd is en dat adipocyten CD40 verhoogd tot expressie brengen. Dit gegeven maakt de signaleringscascade van het CD40-CD40L receptor-ligand paar tot een interessant doelwit in het onderzoek naar de mechanismen van obesitas.

Transportmechanismen en co-stimulatoire moleculen zijn dus van groot belang in atherosclerose en obesitas. Vandaar dat dit proefschrift zich richt op het ontrafelen van de bijdrage die transportmechanismen en co-stimulatie leveren aan atherosclerose en obesitas, zowel op systemisch als op een celtype-specifiek niveau.

In de literatuur is reeds beschreven dat deletie van caveoline-1 in atherosclerotische muizen beschermt tegen de ontwikkeling van atherosclerose. Naast een stijging in plasma cholesterol niveau, hadden

Cav1^{-/-}/ApoE^{-/-} muizen significant kleinere atherosclerotische lesies in vergelijking met wildtype controles. In **hoofdstuk 2** hebben we aangetoond dat niet-hematopoietische caveoline-1 deficiëntie verantwoordelijk is voor de afname in het aantal atherosclerotische plaques, als ook voor een afname in plaque grootte. Verder beperkt niet-hematopoietische caveoline-1 deficiëntie de influx van leukocyten in de plaque. Daarnaast hebben we aangetoond dat afwezigheid van caveolin-1 in hematopoietische cellen zorgt voor een anti-inflammatoire T-cel respons, die gekenmerkt wordt door een toename in regulatoire T-cellen.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we de functies van co-stimulatoire moleculen in atherosclerose, met in het bijzonder de CD40L-CD40-TRAF as. In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de huidige kennis over de rol die co-stimulatoire moleculen spelen bij rekrutering van leukocyten, plaque ontwikkeling en plaque destabilisatie. Verder worden potentiële therapeutische opties op basis van interventies in de CD40L-CD40-TRAF as bediscussieerd.

Het is reeds aangetoond dat inhibitie van CD40L-CD40 signalering beschermt tegen atherosclerose. Helaas zijn de klinische trials op dit vlak stopgezet zijn in verband met trombo-embolische complicaties. Daarom hebben we onderzocht of meer specifieke interventies in CD40-signalering therapeutisch opties zouden kunnen bieden. In **hoofdstuk 4** tonen we aan dat CD40-deficiëntie in hematopoïetische cellen resulteert in een afname van atherosclerose en zorgt voor een stabiel plaque fenotype. Bovendien verhindert inhibitie van CD40-TRAF6 signalering, maar niet CD40-TRAF2/3/5 signalering in MHCII⁺ cellen, de ontwikkeling van atherosclerose. Dit geeft aan dat CD40-TRAF6 een belangrijke pro-atherogene rol speelt. CD40-TRAF6 deficiëntie leidt tot een vermindering in het aantal inflammatoire monocyten, een vermindering in rekrutering van deze cellen naar de arteriële vaatwand, en differentiatie van macrofagen naar een anti-inflammatoir M2 fenotype. Onze data tonen aan dat specifiek kan worden ingegrepen op de CD40L-CD40-TRAF as en dat gerichte interventies potentieel bruikbaar zijn voor klinische behandeling van atherosclerose.

Hoofdstuk 5 levert een overzicht over de huidige kennis van CD40L-CD40 interacties in type 2 diabetes, en over hoe dit co-stimulatorische systeem betrokken is bij ontsteking van de alvleesklier, het vetweefsel en de arteriën in type 2 diabetes. Verder lichten wij in dit hoofdstuk de rol van sCD40L in patiënten met type 2 diabetes toe en wordt de potentie van sCD40L als biomarker voor cardiovasculaire ziekten bediscussieerd. Aansluitend wordt er nog aandacht besteed aan de therapeutische mogelijkheden van CD40L-CD40 inhibitie in type 2 diabetes.

Met zicht op de potentiële rol van CD40L-CD40 interacties in type 2 diabetes en de complicaties hiervan, hebben we de rol van CD40L in een muismodel voor dieet-geïnduceerde obesitas onderzocht. In **hoofdstuk 6** tonen we aan dat genetische CD40L-deficiëntie een afname veroorzaakt in ontsteking van het vetweefsel. Bovendien remt CD40L-deficiëntie de ontwikkeling van dieet-geïnduceerde obesitas en zorgt het voor een toename van insuline-gevoeligheid. Inhibitie van CD40L met een blokkerend antilichaam leidde tot een verbetering van systemische insuline-gevoeligheid, glucose-tolerantie en CD4⁺ T-cel infiltratie in het vetweefsel.

In lijn met hoofdstuk 4, is ook de rol van signaal-transductiemoleculen van CD40 in dieet-geïnduceerde obesitas onderzocht. In **hoofdstuk 7** is gekeken naar de effecten die deletie van specifieke CD40-TRAF moleculen heeft op obesitas. Hieruit is gebleken dat deletie van CD40-TRAF2/3/5 leidt tot een verergering van obesitas en hieraan gerelateerde co-morbiditeit in muizen met dieet-geïnduceerde obesitas. Daarentegen toonden *CD40-TRAF6*^{-/-} muizen een fenotype dat overeenkomt met het fenotype in wildtype muizen. Hieruit concluderen wij dat de CD40-TRAF2/3/5 signaaltransductie van cruciaal belang is voor het behoud van de normale glucose homeostase en voor onderdrukking van inflammatie in vetweefsel. Aansluitend toont dit onderzoek potentiële opties voor nieuwe therapeutische mogelijkheden in het behandelen van obesitas.

Tot slot worden in **hoofdstuk 8** de bevindingen samengevat en bediscussieerd, en worden opties voor verder onderzoek besproken. Concluderend geeft dit proefschrift nieuwe inzichten in de biologie van caveolae en co-stimulatorische moleculen in chronische ontstekingsziekten. In het bijzonder worden celtype-specifieke bijdragen van de CD40L-CD40-TRAF as bestudeerd en worden potentiële therapeutische doelen voor de behandeling van atherosclerose, obesitas en het metabool syndroom belicht.