

A fatal attraction: macrophage recruitment to the atherosclerotic plaque

Citation for published version (APA):

Goossens, P. (2012). *A fatal attraction: macrophage recruitment to the atherosclerotic plaque*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20120215pg>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120215pg](https://doi.org/10.26481/dis.20120215pg)

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

Cardiovascular events are the number one cause of death in western society and even gain quickly in importance since a disease-promoting lifestyle becomes more common. Obesity, high blood pressure, smoking and a lack of exercise are just some of the risk factors that contribute to atherosclerosis, the underlying pathogenesis of most of these cardiovascular diseases. While we have a fair idea of the cellular and molecular mechanisms that contribute to atherogenesis, treatment options are still mainly focused on reducing the risk factors.

The disease initiates when macrophages migrate to the vessel wall of an artery, where they take up modified lipids. This turns them into large, lipid-laden foam cells that cannot re-enter the blood stream but instead secrete factors that create a local inflammation, attracting even more macrophages and other immune cells. This accumulation of lipids and cells in the vessel wall is called an atherosclerotic plaque. In the chronic disease phase, the plaque will further grow until it ruptures and thereby forms a blood clot that can occlude downstream blood vessels. Depending on the location of the affected blood vessel, this results in acute manifestations such as ischemia, stroke or heart attack.

The macrophages are the most abundant cell type within the plaques and play a key role in all disease phases, from early atherogenesis to plaque rupture. This makes them potentially interesting targets for future therapies. Consequently, the experiments presented in this thesis mainly focus on the macrophages and their signaling pathways that are involved in the creation of an inflammatory environment as well as the recruitment of other cells to the plaque.

In **Chapter 2**, we investigated the effect of type I interferons (IFN) on the plaque macrophages. Although classically seen as antiviral mediators, it is becoming increasingly clear that these cytokines also play a major role in normal physiology and can act both as pro- or anti-inflammatory mediators in a variety of non-pathogen associated diseases. Using both treatment with IFN β and myeloid specific knockouts for the type I interferon (IFN) receptor (IFNAR1) we have investigated the functional role of type I IFN in atherosclerosis in experimental models. We show that IFN β enhances atherogenesis in two well established mouse models of atherosclerosis by upregulating chemokines and chemokine receptors that are necessary for atherosclerotic lesion development. In addition, we show that major targets for endogenous type I IFNs in atherosclerosis are myeloid cells, since mice with a myeloid specific deletion of IFNAR1 show reduced accumulation of myeloid cells in atherosclerotic lesions and thereby have reduced disease development. Moreover, we show that type I IFN signaling pathways are also activated in human atherosclerotic lesions and are associated with plaque rupture, making them potentially relevant for clinical outcome of disease.

It has been shown before that both the level of inflammation and the balance between pro- and anti-inflammatory mechanisms tremendously regulate the growth and composition of the atherosclerotic plaque. An important transcription factor involved in this regulation is NF- κ B, which has indeed been described, by our group and others, to affect the process of atherogenesis. Its precise role(s) in the different cell types present in the plaque however remains unclear. In **Chapter 3**, the role of the NF- κ B pathway in atherogenesis is further assessed by deletion of NF- κ B's main inhibitor, I κ B α , in the myeloid cells of a murine atherosclerosis model. It resulted in a two-fold increase in the size of the plaques. Further analysis suggests that myeloid I κ B α deletion promotes atherogenesis by an enhanced recruitment of myeloid cells to plaques. This was supported by an immunohistochemical staining of the plaques with the ER-MP58 antibody, a novel method to quantify myeloid cell recruitment to the atherosclerotic plaque that we introduce in this chapter. This effect of myeloid I κ B α deletion on murine atherogenesis is of high relevance in the further assessment of the role of inflammatory signaling pathways in the atherosclerotic plaque.

Chapter 4 features a new vaccination strategy in the treatment of experimental atherosclerosis, using a lentiviral vaccination approach to specifically target newly recruited macrophages in the atherosclerotic plaque. Evoking an immune reactivity against the antigen 'survivin' indeed resulted in a reduction of the plaque size and a local accumulation of cytotoxic T cells without causing adverse side effects.

Survivin is mainly known as a tumor-specific antigen since its expression in healthy cells is low but it is upregulated in virtually all tumors. Several survivin-based (gene) therapies targeting tumor cells have been developed in experimental models and some of them have already been applied in the clinic. Next to its tumor-specificity however, an article published a few years ago described that newly recruited macrophages in human atherosclerotic plaques also express survivin under the influence of local growth factors.

We confirm survivin expression in the newly recruited macrophages of murine plaques, target them using a vaccination strategy with a survivin-expressing lentivirus and demonstrate that this results in a significant reduction in lesion growth accompanied by an induction of recruitment of CD3⁺ T cells and CD8⁺ cytotoxic T cells to the plaque. This completely novel approach in experimental atherosclerosis may open up the potential of new therapies for this disease.

In **Chapter 5**, we describe the characteristics of different macrophage subsets and their specialized functions. While this wide range of phenotypes is already well described in other diseases with a key role for macrophages, like infection diseases and cancer, it most probably also affects atherogenesis. In this chapter we give an overview of the current relevant knowledge on macrophage heterogeneity and its putative roles in

disease progression, but also speculate on diagnostic and therapeutic possibilities that may benefit from it.

In conclusion, this thesis illustrates through different KO and treatment models the importance of macrophages and their inflammatory and chemotactic signaling pathways in the pathogenesis of atherosclerosis. Next to showing the disease promoting effect of enhanced recruitment of macrophages to the plaque, we also demonstrate that the specific targeting of these newly recruited cells may present a new strategy for plaque reducing therapies.

Samenvatting

Cerebrovasculaire accidenten zijn de voornaamste doodsoorzaak in de westerse samenleving en winnen nog steeds aan belang wegens het groeiend aantal mensen met een levensstijl die deze aandoeningen in de hand werkt. Obesitas, een verhoogde bloeddruk, roken en een gebrek aan lichaamsbeweging zijn slechts enkele van de risicofactoren die bijdragen tot atherosclerose, in de volksmond ook wel aderverkalking genoemd, de ziekte die de meeste van die accidenten veroorzaakt. En hoewel we al vrij goed op de hoogte zijn van de cellulaire en moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor het ziekteverloop van atherosclerose, blijven de therapeutische opties voorlopig beperkt en wordt er vooral gefocust op het elimineren van de risicofactoren.

Atherogenese begint wanneer macrofagen vanuit het bloed naar de vaatwand van een slagader migreren, waar ze chemisch gemodificeerde lipiden opnemen. Hierdoor veranderen ze in zogenaamde schuimcellen. Deze grote, met vet gevulde cellen kunnen niet meer terug migreren naar de bloedbaan en zitten dus vast in de vaatwand. Van daar secreteren ze specifieke ontstekingsseiwitten die nog meer macrofagen en andere immuuncellen rekruteren. Deze lokale ontstekingshaard en de opeenstapeling van cellen in de vaatwand wordt een atherosclerotische plaque genoemd. Gedurende de chronische fase van de ziekte zal deze plaque steeds verder groeien tot ze uiteindelijk openscheurt, waarbij zich een bloedklonter vormt die stroomafwaarts kleinere slagaders kan verstoppen. Afhankelijk van de slagader waarin de bloedstroom wordt afgesloten veroorzaakt dit acute problemen zoals lokaal zuurstoftekort, een beroerte of een hartaanval.

Een plaque bestaat voor een groot deel uit macrofagen en zij spelen dan ook een hoofdrol in elke fase van de ziekte, van de vroegste atherogenese tot het scheuren van de plaque. Dit maakt ze interessante doelwitten in de zoektocht naar nieuwe therapieën. De experimenten die in deze thesis worden beschreven focussen daarom voornamelijk op de rol van macrofaag signaaltransductie in het creëren van een inflammatoire omgeving en het aantrekken van nieuwe cellen naar de plaque.

In **Hoofdstuk 2** gaan we dieper in op het effect van type I interferonen (IFN) op plaquemacrofagen. Hoewel deze cytokines vooral zijn bestudeerd omwille van hun antivirale effecten, krijgen hun fysiologische functies steeds meer aandacht en is het duidelijk dat ze ook in andere, niet-infectieuze ziektes een rol spelen die zowel pro- als anti-inflammatoir kan zijn. Onze studie van deze type I interferonen in atherosclerose bestond zowel uit KO- als behandelingsexperimenten: in twee verschillende muismodellen voor atherosclerose konden we aantonen dat een dagelijkse behandeling met IFN β de atherosclerotische plaquegroei stimuleert via een verhoogde productie van enkele chemokines en chemokinereceptoren die essentieel zijn in de

plaquevorming. Daarnaast beschrijven we hoe, binnen de plaque, myeloïde cellen het belangrijkste doelwit zijn van endogene interferonen, aangezien muizen waarin de receptor voor IFN (IFNAR) specifiek ontbreekt in de beenmerg afgeleide cellen minder accumulatie van cellen in de vaatwand vertonen en daardoor een vertraagd ziekteverloop hebben. Ten slotte bekijken we ook atherosclerotische plaques uit patiënten, waarin de IFN-signalering ook is geactiveerd en kan worden geassocieerd met het scheuren van de plaque. Dit wijst op een mogelijke klinische relevantie die verder onderzoek vereist.

Het is reeds vaak beschreven dat de groei en samenstelling van de atherosclerotische plaque zeer afhankelijk is van de mate van ontsteking alsook van de balans tussen pro- en anti-inflammatoire mechanismen. Bij de regulatie hiervan is een centrale rol weggelegd voor de transcriptiefactor NF- κ B, waarvan inderdaad eerder al door zowel onze groep als andere groepen een invloed op het atherogeneseproces is beschreven. Desondanks blijft het precieze mechanisme in de verschillende celtypes van een plaque voorlopig onduidelijk. In **Hoofdstuk 3** wordt deze rol van NF- κ B verder onderzocht door middel van een muismodel waarin I κ B α , de belangrijkste inhibitor van NF- κ B, ontbreekt in de beenmergafgeleide cellen. Het resultaat is een verdubbeling van de plaquegrootte in de muizen met I κ B α -deletie. Verdere analyse van deze plaques suggereert dat dit kan worden verklaard door een verhoogde rekrutering van myeloïde cellen naar de plaques. Dit wordt bevestigd door immunohistochemische kleuringen van de plaques met het antilichaam ER-MP58, een in dit hoofdstuk geïntroduceerde methode voor het bepalen van de hoeveelheid nieuw-gerekruteerde macrofagen in een plaque. Dit effect van myeloïde I κ B α -deletie kan van groot belang zijn in de verdere studies naar de rol van inflammatoire signalering in plaque-ontwikkeling.

In **Hoofdstuk 4** introduceren we vaccinatie met lentivirussen die een immuunreactie tegen het antigen 'survivin' induceren als een nieuwe strategie in de behandeling van experimentele atherosclerose. Door zo specifiek de nieuw-gerekruteerde macrofagen in de plaque te viseren konden we inderdaad de plaquegrootte reduceren zonder belangrijke neveneffecten te induceren. Survivin is vooral bekend als tumorspecifiek antigen aangezien het nauwelijks detecteerbaar is in gezonde cellen maar sterk tot expressie komt in zowat alle tumoren. Bij onderzoek in experimentele tumormodellen werd van deze eigenschap reeds gebruik gemaakt voor het ontwikkelen van verschillende survivin-gebaseerde (gen)therapieën, waarvan sommige intussen zelfs al succesvol in de kliniek worden toegepast. Een publicatie van enkele jaren geleden beschreef echter dat, naast deze tumorspecificiteit, nieuw-gerekruteerde macrofagen van humane plaques ook survivin tot expressie brengen onder invloed van lokale groeifactoren. Wij bevestigden de aanwezigheid van deze survivin-positieve, nieuw-gerekruteerde macrofagen in atherosclerotische plaques van de muis. Wanneer we

deze cellen gericht viseerden door middel van een vaccinatie met survivin-producerende lentivirussen, resulteerde dit in een significante vermindering van de plaquegroei en een verhoogde aanwezigheid van CD3⁺ T-cellen en CD8⁺ cytotoxische T-cellen in de plaques. Deze nieuwe behandelingsstrategie in experimentele atherosclerose zou het pad kunnen effenen voor nieuwe therapiemogelijkheden.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we de eigenschappen en specifieke functies van de verschillende macrofaagsubsets. Hoewel het bestaan van een brede waaier aan macrofaagfenotypes reeds uitvoerig is beschreven bij ziektes met een hoofdrol voor macrofagen, zoals infectieziektes en kanker, is dit concept hoogstwaarschijnlijk ook relevant voor de macrofagen in een atherosclerotische plaque. We geven daarom eerst een overzicht van de relevante kennis die over deze verschillende macrofagen bestaat, relateren dit aan de gekende macrofaagfuncties in een plaque en beschrijven tot slot enkele mogelijke diagnostische en therapeutische toepassingen.

Samenvattend illustreert deze thesis in verschillende KO- en behandelingsmodellen het belang van macrofagen en hun inflammatoire en chemotactische signalering in de pathogenese van atherosclerose. Behalve een sneller ziekteverloop ten gevolge van een verhoogde rekrutering van macrofagen naar de plaque, tonen we ook dat een specifieke targeting van deze nieuw-gerekrueteerde cellen een nieuwe strategie voor atherosclerose-therapieën kan zijn.

