

Peri- and extravascular inflammation : impact on atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Daissormont, I. T. M. N. (2012). *Peri- and extravascular inflammation : impact on atherosclerosis*. Uitgeverij BOXPRESS. <https://doi.org/10.26481/dis.20120413id>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120413id](https://doi.org/10.26481/dis.20120413id)

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 is a chronic inflammatory disease of middle-sized and large arteries that is characterized by the accumulation of lipids and inflammatory cells in the vessel wall, resulting in the formation of an atherosclerotic lesion. The attraction of these vascular inflammatory cells is orchestrated by chemokines. **Chapter 2** provides an overview of the chemokines that have been implicated in atherosclerosis, and discusses their potential as biomarker of and therapeutic target for plaque destabilization and rupture.

While most chemokines are upregulated in response to inflammatory stimuli to control immune responses, homeostatic chemokines are constitutively expressed to regulate leukocyte trafficking to and compartmentalization in lymphoid organs. Recently, these homeostatic chemokines has been attributed a broader function in immune response modulation not only in lymphoid but also in non-lymphoid tissue and in the induction of cell survival and angiogenesis. In **Chapter 3**, we addressed, by a loss-of-function approach, the role of one of these homeostatic chemokines, CXCL12, and its receptor, CXCR4, in neutrophil senescence and implications thereof for murine atherosclerosis. Neutrophils lacking functional CXCR4 expression showed increased reactive oxygen species accumulation and increased adhesion to plaque endothelium, thereby aggravating atherosclerosis. These neutrophils displayed an enhanced circulation half-life. Importantly, patients with acute cardiovascular disease had decreased expression of CXCR4 on circulating neutrophils, substantiating the importance of neutrophil CXCR4 expression for disease development.

In **Chapter 4**, we investigated the role of another homeostatic chemokine, CXCL13, and its receptor, CXCR5, in atherosclerosis. Patients with angina pectoris and carotid artery atherosclerosis had increased CXCL13 plasma levels. Moreover, CXCL13 was expressed in human carotid atherosclerotic lesions, both in early as advanced (un)stable lesions, by adventitial cells but also by plaque macrophages and vascular smooth muscle cells. CXCL13 was seen to exert anti-apoptotic activity on monocytes and vascular smooth muscle cells, suggestive of a plaque stabilizing effect of CXCL13.

As the CXCL13/CXCR5 dyad is instrumental in T/B cell trafficking, and as both cell types have been attributed a major role in atherogenesis, we hypothesized that the CXCL13/CXCR5 axis might be involved in regulating T/B cell homing to

Summary

and/or function in the atherosclerotic vessel wall. Given that CXCL13 is constitutively expressed in the adventitia where it co-localizes amongst others with plaque macrophages and fibroblasts, we sought to demonstrate in **Chapter 5** the causal involvement of CXCL13 in atherosclerosis in mice. Hematopoietic deficiency of CXCL13 as well as of CXCR5 attenuated atherosclerosis development but did not affect lymphocyte homing towards the vessel wall. Instead, it appeared to alter monocyte/granulocyte function, and more in particular, interfered with survival of specific monocyte subsets, not only lowering monocyte levels but also skewing it towards the Ly6C(low) subsets. Lack of CXCL13/CXCR5 did not influence myeloid development and monocyte/granulocyte mobilization from bone marrow into circulation. These findings reveal a so far unknown role for CXCL13 and CXCR5 in monocyte/granulocyte homeostasis which is independent of the lipidemic status of the mice. We further show that, while our studies in Chapter 4 pointed to a plaque stabilizing activity of CXCL13, its peripheral effects seem to support a pro-atherogenic activity.

Our findings in Chapter 3 and 5 clearly illustrate that peripheral and perivascular immunity can affect atherosclerosis. In the second part of this thesis, we further explored how peripheral and extravascular immunity can modulate local processes in the plaque. In **Chapter 6**, we showed that plasmacytoid dendritic cells (pDCs) suppress T cell responses in the periphery, resulting in an attenuation of atherosclerosis development and progression. Moreover, we found that pDC suppress T cell proliferation in an indoleamine 2,3-dioxygenase dependent manner. Given the almost complete absence of pDCs in human and especially mouse atherosclerotic lesions, we propose that pDC most likely exert their atheroprotective effect from the outside of the vessel wall, from lymphoid tissue or thymus given their effect on T cell regulation.

In **Chapter 7**, we explored the impact of lymphatic capillaries in the adventitia on plaque development and inflammation. We showed that adventitial lymphatic capillaries expand early on in plaque development. Therefore, we hypothesized that adventitial lymphatic capillaries could contribute to atherogenesis by draining cytokines and leukocytes from the adventitia to draining lymph nodes. Along that line, draining lymph node excision is expected to dampen adventitial and plaque inflammation. However, removal of the draining lymph node resulted in T cell accumulation not only in the adventitia but also in the plaque, and deteriorated plaque development. In addition, we showed that T cells mainly enter the

atherosclerotic vessel wall via the adventitia in a CXCR3 dependent manner. Adventitial lymphangiogenesis was promoted by focal CXCR3 blockage and resulted in decreased plaque T cell content. Our findings thus suggest a protective effect of adventitial lymphatic capillaries in atherosclerosis. However, additional studies will be required to exclusively establish this hypothesis.

In **Chapter 8** the major findings in Chapters 3 to 7 are discussed. We conclude that peripheral and extravascular immunity profoundly impact local processes in the plaque. The novel findings presented in this thesis thus provide new insights in the pathogenesis of atherosclerosis.

Samenvatting

Atherosclerose, of aderverkalking, is een chronische ontstekingsziekte van de middelgrote en grote bloedvaten en wordt gekenmerkt door de ophoping van vetten en ontstekingscellen (inflammatoire cellen) in de vaatwand, resulterende in de vorming van een zogenaamde plaque. De plaque ontstaat wanneer het endotheel lokaal beschadigd raakt en ontstekingscellen aangetrokken worden om de schade te herstellen. Wanneer de plaque een zekere omvang bereikt, zal zich een kapsel van bindweefsel en gladde spiercellen vormen rondom de ontstekingshaard om de stabiliteit van de plaque te waarborgen. Dit kapsel kan echter afgebroken worden door een teveel aan ontstekingscellen. Als gevolg hiervan zal het fibreuze kapsel langzamerhand eroderen en de plaque instabiel worden (plaque destabilisatie), wat het risico vergroot dat zij onder stress zal openscheuren (plaque ruptuur). In dat geval komt het bloed in direct contact met de inhoud van de plaque en kan een bloedstolsel ontstaan. Dit stolsel kan het bloedvat afsluiten en daarmee de bloedtoevoer naar stroomafwaarts gelegen weefsel blokkeren, een proces dat, wanneer dit zich voordoet in de kransslagader, kan leiden tot een hartinfarct.

De aantrekking van ontstekingscellen naar de plaque is daarmee een bepalende factor niet alleen in de ontwikkeling van de plaque maar ook voor de ernst van de ziekte. Dit proces wordt gereguleerd door chemokines, kleine eiwitten die verantwoordelijk zijn voor de aantrekking (chemotaxis) van ontstekingscellen naar de ontstekingshaard. In **Hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van alle chemokines die betrokken zijn bij atherosclerose. Bovendien worden de perspectieven van chemokines en remmers daarvan voor diagnostische respectievelijk therapeutische doeleinden bij atherosclerose gerelateerde aandoeningen besproken.

In het eerste deel van deze thesis werd de rol van chemokines in atherosclerose bestudeerd. We hebben onderzocht hoe chemokines ontstekingsprocessen buiten de vaatwand (“extravasculair” of “perifeer”) beïnvloeden en wat het effect hiervan is op lokale ontstekingsprocessen in de plaque.

Het merendeel van de chemokines, de zogenaamde inflammatoire chemokines, worden verhoogd geproduceerd tijdens ontstekingsprocessen om op die manier de afweerreactie in gang te zetten dan wel te onderhouden.

Homeostatische chemokines daarentegen zijn chemokines die continu aangemaakt worden om het transport van ontstekingscellen naar en hun lokalisatie in de lymfeorganen te regelen. Uit recent onderzoek blijken de homeostatische chemokines ook een bredere functie te vervullen, in die zin dat ze betrokken zijn in de regulatie van afweerreacties in lymfe- en overige organen, in de cel-overleving alsook in de vorming van bloedvaten (angiogenese). In **Hoofdstuk 3** hebben we de rol van één van deze homeostatische chemokines, CXCL12, en haar receptor, CXCR4, in neutrofiel veroudering onderzocht in een muizenmodel van atherosclerose. Neutrofielen zijn witte bloedcellen die een cruciale rol spelen bij het elimineren van bacteriën, virussen maar ook van andere schadelijke factoren. Neutrofielen uit muizen met een verminderde werking van CXCR4 vertoonden een verhoogde activiteit, gekenmerkt door een verhoogde aanmaak van reactieve zuurstofradicalen (oxidanten), die cel- en weefselschade kunnen veroorzaken. Daarnaast hechten deze neutrofielen ook beter aan de plaque, wat het proces van atherosclerose bevordert. Verrassend was dat deze neutrofielen een verlengde levensduur kenden en bij veroudering minder efficiënt uit de bloedsomloop verwijderd werden, hetgeen suggereert dat verouderde neutrofielen betrokken zijn bij atherosclerose. Dat deze bevinding mogelijk ook voor de mens geldt hebben we tenslotte weten aan te tonen in patiënten die lijden aan atherosclerose, aangezien hun neutrofielen een verlaagde CXCR4 productie bleken te vertonen.

In **hoofdstuk 4** hebben we de rol van een ander homeostatisch chemokine, CXCL13, en zijn receptor, CXCR5, in atherosclerose onderzocht. De bloedwaarden van CXCL13 bleken sterk verhoogd in patiënten die lijden aan angina pectoris (een bepaalde hartkwaal en meestal de voorganger van atherosclerose, letterlijk “pijn aan de borst”) of atherosclerose. Daarenboven was CXCL13 aanwezig in de vaatwand van deze patiënten. Dit CXCL13 werd vooral aangemaakt door macrofagen (een type ontstekingscel die veel voorkomt in de plaque) en gladde spiercellen, maar werd ook aangetroffen in het weefsel rondom de vaatwand, de zogenaamde adventitia. CXCL13 oefende een anti-apoptotische (verhinderen van celdood) werking uit op monocyten en gladde spiercellen, wat suggereert dat CXCL13 een plaque stabiliserende werking heeft.

Daar CXCL13 en CXCR5 normaal gesproken het transport van T en B cellen (twee andere typen ontstekingscellen) door het lichaam regelt, en deze celtypen

een belangrijke rol spelen in atherosclerose, veronderstelden wij dat CXCL13 en CXCR5 vooral betrokken zijn bij T en B cel rekrutering naar en/of hun functie in de atherosclerotische vaatwand. Aangezien CXCL13 constant aangemaakt wordt door ontstekingscellen (bv. macrofagen) en bindweefselcellen in de adventitia, wilden we in **Hoofdstuk 5** niet alleen nagaan wat de bijdrage is van CXCL13 aan atherosclerose, maar ook welk celtype hier met name voor verantwoordelijk was. Uitschakeling van CXCL13 of CXCR5 in witte bloedcellen leidde tot een vertraagde ontwikkeling van atherosclerose maar had geen effect op de rekrutering van T en B cellen naar de vaatwand. Opmerkelijk was dat de functie van monocyt en granulocyt in deze muizen verstoord bleek, meer bepaald was er een verlaging in het aantal monocyt en granulocyt en een verschuiving van pro-inflammatoire Ly6C^{high} naar minder inflammatoire Ly6C^{low} monocyt. De monocyt/granulocyt ontwikkeling, of hun mobilisatie vanuit het beenmerg naar het bloed bleek onaangetast, wat suggereert dat de afname in monocyt en granulocyt te wijten is aan een effect op de overleving van deze cellen in de bloedsomloop. Deze bevindingen onthullen een tot nu toe onbekende rol van CXCL13 en CXCR5 in monocyt/granulocyt functie en levensduur, die onafhankelijk is van het dieet van de muizen. Bovendien tonen we aan dat CXCL13 en CXCR5, in tegenstelling tot de in Hoofdstuk 4 geopperde hypothese (een plaque stabiliserend effect), de ontwikkeling van atherosclerose juist bevorderen door beïnvloeding van processen in de periferie.

De bevindingen in Hoofdstuk 3 en 5 tonen aan dat perifere en extravasculaire ontstekingsprocessen de ontwikkeling van atherosclerose sterk kan beïnvloeden. In het tweede deel van dit proefschrift zijn we hier dieper op ingegaan. In **Hoofdstuk 6** tonen we aan dat plasmacytoïd dendritische cellen (pDCs) T cel reactie in de periferie onderdrukken, en daarmee de vorming van een atherosclerotische plaque afremt. Bovendien hebben we het enzyme weten te identificeren dat verantwoordelijk is voor de dempende werking van pDCs op de activatie van T cellen, indoleamine 2,3-dioxygenase. Daar pDCs bijna totaal ontbreken in atherosclerotische plaques, zowel in de muis als de mens, kunnen we concluderen dat zij hun beschermende werking uitoefenen in de periferie, hoogstwaarschijnlijk in lymfeorganen en/of de thymus.

In **Hoofdstuk 7** hebben we de rol van lymfevaten in de adventitia op plaque ontwikkeling onderzocht. Onze studies tonen aan dat het aantal lymfevaten in de

adventitia toeneemt tijdens plaque ontwikkeling. Op basis hiervan is de hypothese opgesteld dat de lymfevaten door drainage/afvoer van ontstekingsmediatoren en -cellen uit de vaatwand, een belangrijke rol spelen in atherosclerose, en dat verwijdering van de lokale lymfeklier de ontsteking in de adventitia en plaque zou moeten verminderen. In tegenstelling tot onze verwachting bleek dit laatste echter te resulteren in een verhoogde opstapeling van T cellen in de adventitia en de plaque, en de plaque ontwikkeling te verergeren. Bovendien tonen we aan dat T cellen de atherosclerotische vaatwand voornamelijk via de achterdeur, de adventitia, infiltreren en dat dit transport gestuurd wordt door de CXCR3 receptor. Lokale remming van CXCR3 verhoogde het aantal lymfevaten in de adventitia en verminderde de aanwezigheid van T cellen in de plaque. Onze data wijzen er dus op dat adventitiale lymfevaatjes een beschermend effect hebben op atherosclerose. Nader onderzoek zal deze hypothese moeten bevestigen.

De bevindingen beschreven in Hoofdstuk 3 tot en met 7 worden in **Hoofdstuk 8** tot slot bediscussieerd en in een breder kader geplaatst. We concluderen dat diverse perifere en extravasculaire immunoreacties lokale processen in de plaque sterk kunnen beïnvloeden. Dit proefschrift biedt in die zin dan ook een nieuw inzicht in het ontstaan van atherosclerose en vormt de basis voor verder onderzoek.