

Role of dendritic cell subsets in hyperlipidemia and atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Legein, B. (2016). *Role of dendritic cell subsets in hyperlipidemia and atherosclerosis*. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20160623bl>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160623bl](https://doi.org/10.26481/dis.20160623bl)

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 diseases are still the leading cause of mortality worldwide. Its most common underlying cause, atherosclerosis, is a lipid-driven chronic inflammatory disease of the arterial wall, involving both innate and adaptive immune responses. Specialized immune cells such as monocytes, macrophages, granulocytes, B and T cells, exert a range of inflammatory processes that drive disease progression. Data from the last decade indicate that another set of immune cells, the dendritic cells (DCs), known immune orchestrators, are involved in the disease process. DCs are present in atherosclerosis-prone regions in healthy vessels and accumulate during disease progression. Moreover, they are in close contact with T cells inside the atherosclerotic lesion and were shown to present prototype/model antigens to CD4⁺T cells in aortic explants. Although dendritic cells hold potential for the development of new efficient therapies, knowledge regarding the mechanisms by which DCs, in particular DC subsets, influence the pathogenesis of atherosclerosis is largely lacking. In addition, how DC subsets function in an atherosclerosis relevant hyperlipidemic environment and how DCs can be efficiently modulated to improve disease outcome remain poorly understood. Consequently, this thesis focuses on elucidating the contribution of DC subsets in hyperlipidemia-associated atherosclerosis and discusses potential modulators of DC differentiation and function relevant to atherosclerosis. In **Chapter 2**, we reviewed the current knowledge on the pathogenesis of atherosclerosis as a chronic inflammatory disorder, discussing the involvement of different innate and adaptive immune cells, as well as their interactions. **Chapter 3** summarizes the current view on the role of particular DC subsets in cardiovascular diseases, identifying underlying patterns, gaps in knowledge, as well as describing their potential as therapeutic targets in CVDs. In **Chapter 4**, we made use of the *Batf3*^{-/-} model to investigate the role of CD8⁺cDCs, and more general cross-presentation in atherosclerosis. As CD8⁺cDC deficiency did not alter atherosclerosis outcome, we concluded that CD8⁺cDCs and cross-presentation exerted by this subset play only a minor role in atherosclerosis. As hyperlipidemia, a key risk factor for atherosclerosis, was suggested to interfere with DC function we investigated its impact on DC progenitors, on mature DC subsets and on their activation status and function in **Chapters 5 and 6**. **Chapter 5** focuses on the impact of hyperlipidemia on human pDCs. We

Summary

demonstrated that human pDCs engulf lipids when exposed to excessive amounts of LDL or oxLDL *in vitro*, resulting in ablation of Toll-like receptor 7 and 9 induced pDC activation as witnessed by quenched production of pro-inflammatory cytokines as well as by downregulation of maturation markers. Eventually, oxLDL- abrogation of pDC activation resulted in impaired CD4⁺ T cell polarization. In **Chapter 6**, we addressed the early adaptive effects of hypercholesterolemia in DC (precursor) homeostasis, on DC lipid accumulation and on its consequences for T cell priming capacity *in vivo*. Our results indicate that HFD feeding augments MDP proliferation and numbers, but did not affect DC subset numbers in lymphoid compartments. However, HFD resulted in lipid accumulation by CD8⁻, and to a lesser extent CD8⁺ conventional DCs (cDC), but not plasmacytoid DCs (pDCs). Lipid loading resulted in increased costimulatory molecules expression, accumulation, and baseline TLR activation-associated cytokine release (IL-1 β , IL-6, TNF- α) by CD8⁻ cDCs, but caused a reduction in CD8⁻ DCs' capacity to stimulate naïve CD4⁺ T cells. Whether hyperlipidemia results in impaired host's defense against pathogens in humans remains elusive. In **Chapters 7 and 8**, we investigated potential targets to modulate DC function in order to improve atherosclerosis disease outcome. **Chapter 7** focused on the role of the RNA-binding protein Quaking (QKI) in DC development and function, and its impact on atherosclerosis. We used a model in which QKI was conditionally deleted in CD11c expressing DCs. QKI deficiency resulted in reduced DC generation and proinflammatory cytokine production by DCs *in vitro* and skewed DC differentiation towards CD8⁻ DC *in vivo*. CD11c-restricted loss of QKI indirectly resulted in a CD8⁺ shifted T cell profile and decreased CD4⁺ Th17 to Treg ratio. In the context of atherosclerosis, CD11c restricted loss of QKI expression attenuated plaque development and necrotic core size formation, indicating the potential as a target for therapy. In **Chapter 8**, we show that constitutive activation of CD40 signaling in DCs reduced atherosclerosis by strong intestinal inflammation resulting in reduced cholesterol levels, a critical driver of atherosclerosis. Finally, **Chapter 9** summarizes and discusses the most important findings of this thesis and defines the most relevant outstanding questions and future perspectives.

Altogether, this thesis provides novel insights into the biology of DC subsets in atherosclerosis, establishing the profound impact of hypercholesterolemia on DC function and a minor relevance for cross-presentation and CD8⁺DCs in the disease process. Moreover, we identified two interesting avenues for further research in DC modulation as potential therapy for cardiovascular disease.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten (HVZ) zijn tot op heden nog steeds de belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd. Het meest voorkomende pathologische proces dat hieraan ten grondslag ligt is atherosclerose. Atherosclerose is een lipide gedreven chronische ontstekingsziekte van de vaatwand, waarbij zowel aangeboren als verworven immuunreacties een grote rol spelen. Gespecialiseerde immuuncellen, zoals monocytten, macrofagen, granulocyten, B en T cellen, zijn verantwoordelijk voor een groot aantal ontstekingsreacties die samen bijdragen aan de progressie van de ziekte. Uit bevindingen van de laatste tien jaar blijkt dat ook een andere groep immuuncellen, namelijk de dendritische cellen (DCs), betrokken zijn in het ziekteproces. DCs zijn sleutelfiguren in het regelen van het immuunsysteem en het koppelen van aangeboren en verworven immuunreacties. Ze zijn aanwezig in atherosclerose-gevoelige gebieden van gezonde bloedvaten en stapelen daar op naarmate de ziekte verergert. Bovendien worden ze in atherosclerotische leasies aangetroffen in nauw contact met T cellen en heeft men aangetoond dat ze in gedissecteerde aortas in staat zijn om prototype/model antigenen te presenteren aan CD4⁺ T cellen. Hoewel dendritische cellen potentieel hebben voor het ontwikkelen van nieuwe efficiënte behandelingen ontbreekt voor een groot deel de kennis van de mechanismen waarbij DCs, en in het bijzonder hun specifieke subsets, de pathogenese van de ziekte beïnvloeden. Verder is er nog maar weinig bekend over hoe DC subsets functioneren in een overmatig vetrijke omgeving (relevant in atherosclerose) en over hoe DCs efficiënt kunnen worden beïnvloed om de uitkomst voor de patient te verbeteren. Dit proefschrift focust dan ook op de bijdrage van DC subtypes tot hyperlipidemia-geassocieerde atherosclerose. Daarnaast bespreken we potentiële regelmechanismen van DC ontwikkeling en functie relevant voor de behandeling van atherosclerose. In **hoofdstuk 2** geven we een overzicht van de stand van zaken over de pathogenese van atherosclerose als chronische ontstekingsziekte. Hierbij wordt zowel de betrokkenheid van, alsook de onderlinge interacties tussen, cellen van het aangeboren en verworven immuunsysteem besproken. **Hoofdstuk 3** beschrijft de huidige kennis over de rol van DC subtypes in HVZ. Hierbij ontrafelen we onderliggende patronen en brengen we tekortkomingen en mogelijkheden van DCs als therapeutische targets in HVZ in kaart. In **hoofdstuk 4** maken we

Samenvatting

gebruiken van het $Batf3^{-/-}$ model om de rol van $CD8^+cDCs$, en meer algemeen kruis-presentatie, in atherosclerose te bestuderen. Gezien verlies aan $CD8^+cDCs$ en hun kruispresentatie geen impact hadden op atherosclerose kunnen we besluiten dat deze slechts een beperkte rol spelen in atherosclerose. Aangezien hyperlipidemie, een belangrijke risicofactor van atherosclerose, mogelijks een invloed heeft op DC functie hebben we het effect hiervan op DC voorlopercellen, mature DC subsets, DC activatie status en hun functies bestudeerd in **hoofdstukken 5 en 6**. **Hoofdstuk 5** focust op de impact van hyperlipidemie op humane plasmacytoïde DCs (pDCs). We tonen aan dat human pDCs lipiden opnemen wanneer ze *in vitro* worden blootgesteld aan overmatige hoeveelheden LDL of oxLDL. Dit resulteert in een remming van Toll-like receptor 7 en 9 geïnduceerde activatie van pDCs, leidend tot verminderde productie van pro-inflammatoire cytokines alsook een verlaagde expressie van maturatie merkers. Uiteindelijk zorgt de blokkering van pDC activatie door oxLDL voor verminderde $CD4^+T$ polarisatie. In **hoofdstuk 6** onderzoeken we *in vivo* de vroege adaptieve effecten van hypercholesterolemie op DC (voorloper) homeostase, opstapeling van lipiden door DCs en de gevolgen voor hun T cel priming capaciteit. Onze resultaten tonen aan dat vetrijke dieet (HFD) zorgt voor een verhoging van monocyt en dendritische cell voorloper (MDP) deling en aantallen, maar geen invloed heeft op DC subset aantallen in lymfoïde compartimenten. Echter, HFD resulteert wel in opstapeling van lipiden in $CD8^+cDCs$ en in mindere mate ook $CD8^+cDCs$, maar niet in pDCs. Lipide lading in $CD8^+cDCs$ zorgt voor een verhoogde expressie van costimulatorische moleculen en verhoogde secretie van cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α), maar veroorzaakt een vermindering van de capaciteit $CD8^+cDCs$ om naïeve $CD4^+$ T cellen te stimuleren. Desondanks moet nog bevestigd worden of de effecten van hyperlipidemie leiden tot een verminderde afweer tegen ziekteverwekkers bij de mens. In **hoofdstuk 7 en 8** bestuderen we potentiële mechanismen om DC functie te regelen om zo atherosclerose te verbeteren. **Hoofdstuk 7** focust op de rol van de RNA-bindende eiwitten Quaking (QKI) in DC ontwikkeling en function, en hun impact op de ontwikkeling van atherosclerose. We gebruiken een model waarbij QKI conditioneel wordt verwijderd in cellen die CD11c tot uitdrukking brengen.

In vitro resulteert QKI deficiëntie in een afname van DC ontwikkeling en pro-inflammatoire cytokine productie door DCs. *In vivo* duwt CD11c-QKI deletie de differentiatie van DC in de richting $CD8^+cDC$ en resulteert het

indirect in een meer CD8⁺ getint T cel profiel en een verminderde CD4⁺ Th17 over Treg balans. In een context van atherosclerose leidt deletie van QKI in CD11c⁺ cellen tot een vermindering van plaque ontwikkeling en tot een kleinere necrotische kern. Dit wijst op een mogelijkheid voor QKI als doelwit voor therapie. In **hoofdstuk 8** tonen we aan dat aanhoudende activatie van CD40 signalisatie in DCs atherosclerose vermindert door het induceren van ernstige intestinale inflammatie resulterend in cholesterol verlaging, een belangrijke factor in atherosclerose. Tot slot bediscussiert **hoofdstuk 9** de meest opmerkelijke bevindingen van deze thesis en geeft het de meeste relevante openstaande vragen en toekomstperspectieven aan.

Samenvattend, bieden de resultaten van deze thesis nieuwe inzichten in de biologie van DC subtypes en hun rol in atherosclerose, duidend op de grote invloed van hypercholesterolemie op DC functie en draagt het bij aan de kennis betreffende de rol van kruispresentatie en CD8⁺cDCs in het ziekteproces. Bovendien definiëren we twee interessante mogelijkheden voor verder onderzoek naar het regelen van DCs als potentiële therapie voor hart- en vaatziekten.