

Summary – Samenvatting

In developed countries cardiovascular events such as myocardial infarction, peripheral arterial disease and stroke are still the main cause of death. In most cases the cardiovascular event is caused by luminal thrombosis, which is the result of rupture or erosion of an advanced atherosclerotic lesion. Atherosclerotic lesions are formed in large and medium sized arteries and progress during a person's lifetime. The aetiology of atherosclerosis is clearly multifactorial and epidemiologic studies have identified many risk factors for atherosclerosis including smoking, lack of exercise, a high fat diet, hyperlipidemia and hypertension. Although reducing these risk factors will decrease cardiovascular events, it will not prevent atherosclerosis completely.

Over the past decades, many researchers have investigated the initiation and progression of atherosclerosis and the prerequisites needed for atherosclerosis to cause cardiovascular events. Our current knowledge on the pathogenesis of atherosclerosis is the result of combining the findings of clinical investigations, population studies, *in vitro* experiments and studies in animal models. At present, it is widely accepted that atherosclerosis is a chronic inflammatory disease and initiation of the disease is the result of an innate immune response. Innate immune cells, mostly macrophages, try to eradicate retained lipoproteins from the vascular wall, but fail and become trapped as foam cells. Further progression of atherosclerosis into the advanced stages is the result of a balance between inflammation and tissue healing. Both innate and adaptive immunity contribute to this inflammatory response. In this thesis the involvement of adaptive immunity in advanced atherosclerosis was investigated.

In *Chapter 1* of this thesis the current understanding on the pathogenesis of atherosclerosis and the role of innate and adaptive immunity in atherogenesis are described in detail. In the next experimental chapters (*Chapter 2-6*), the importance of three major requirements of T-lymphocyte responses: antigen specificity, co-stimulation and regulation in advanced atherosclerosis are reported.

Chapter 2 describes the anti-oxLDL antibody response in atherosclerosis-prone mice versus wild-type mice. This evaluation demonstrated that atherosclerosis-prone mice as well as wild-type mice harbour detectable levels of circulating IgM and IgG anti-oxLDL

antibodies. Additionally, it was shown that only the progression of atherosclerosis from the early phase to the advanced phase, but not the severity of advanced atherosclerosis, was reflected by an increase in IgM anti-oxLDL antibody levels.

In *Chapter 3*, the hypothesis was tested that adaptive immune cells are responsible for the observed stable plaque phenotype in APOE^{-/-}CD40L^{-/-} mice. Although analysis of LDLR^{-/-} mice receiving CD40L^{-/-} BM clearly showed a diminished natural Treg population, the severity of advanced atherosclerosis was similar in both mice groups. Therefore, we concluded that the stable plaque phenotype observed after CD40L inhibition is not dependent on CD40L expressing leukocytes. To confirm that indeed CD40L expressing non-haemopoietic cells are involved and not leukocytes, a pilot experiment was performed in which LDLR^{-/-} mice transplanted with CD40L^{-/-} BM were treated with either anti-CD40L antibodies or control IgG. Surprisingly, all mice developed comparable advanced atherosclerosis. In all, a role for CD40L expressing non-haemopoietic cells in plaque stability after CD40L deficiency could not be proven, but a role for leukocyte CD40L could not be excluded either.

In *Chapter 4 and 5* the role of natural Tregs in advanced atherosclerosis was studied. Effects of the immunoregulatory cytokine, TGF- β , on advanced atherosclerosis are described in *Chapter 4*. APOE^{-/-} mice were treated with TGF β RII:Fc to inhibit TGF- β signalling. This treatment resulted in a rupture-prone plaque phenotype characterised by increased plaque inflammation and decreased plaque fibrosis. In *Chapter 5* natural Tregs were depleted in LDLR^{-/-} mice by administering anti-CD25 antibodies. In the absence of natural Tregs, mice developed a more inflammatory plaque phenotype that was characterised by an enhanced T-lymphocyte response. These results show that natural Tregs have a protective role in the progression of atherosclerosis.

In the last experimental chapter, *Chapter 6*, MHCII-deficient LDLR^{-/-} mice were generated to analyse the involvement of antigen specificity in advanced atherosclerosis. LDLR^{-/-}MHCII^{-/-} mice had lower cholesterol levels after high fat feeding than their littermates, but when this was correlated to the reduced total plaque area, it was shown that another factor was contributing to the observed effect on plaque size. Further

characterisation revealed that the advanced atherosclerotic lesions were less severe and that the CD4 T-lymphocyte response was clearly hampered in LDLR^{-/-}MHCII^{-/-} mice. Hence, these results prove that antigen presentation is part of the processes contributing to the progression of atherosclerosis.

Finally, in *Chapter 7* the presented results of this thesis are discussed and some future challenges are indicated.

In conclusion, this thesis has contributed to and expanded the knowledge of T-lymphocyte involvement in advanced atherosclerosis. Furthermore, the results described in this thesis show that manipulation of the T-lymphocyte response will not be straightforward because of its strict regulatory mechanisms. It will require detailed characterisation of both disease-related and protective immune responses to be able to apply immuno-therapy in patients suffering from cardiovascular disease.

Hart- en vaatziekten zijn nog steeds de meest voorkomende doodsoorzaak in Nederland en de meeste andere westerse landen. Cardiovasculaire complicaties (bijvoorbeeld een hartinfarct, perifere vaatlijden of een beroerte) zijn vaak het gevolg van verstopping van een bloedvat door een bloedstolsel. Dit bloedstolsel is meestal ontstaan als gevolg van aderverkalking (atherosclerose).

Elk mens ontwikkelt aderverkalking in meer of mindere mate. Dit hangt onder andere sterk af van de aanwezigheid van een of meerdere risicofactoren: roken, te weinig bewegen, een vetrijk dieet, een verhoogd cholesterolgehalte en een te hoge bloeddruk. Vroeger werd aderverkalking beschouwd als een opeenstapeling van cholesterol in de vaatwand die resulteerde in een verdikking (een lesie). Wanneer uiteindelijk de lesie zo groot werd dat deze een bloedvat afsloot, zou dit resulteren in een cardiovasculaire complicatie. Inmiddels heeft onderzoek aangetoond dat aderverkalking een chronische ontsteking van de vaatwand is. Het (geoxideerd) cholesterol (oxLDL) dat neerslaat in de vaatwand is een van de belangrijkste antigenen waartegen het afweersysteem reageert. In de beginfase van de ontstekingsreactie zijn met name cellen van het aangeboren afweermechanisme (in dit geval macrofagen) betrokken. Deze “stofzuigers” proberen het neergeslagen oxLDL op te ruimen, maar slagen hier niet volledig in en blijven gevangen in de vaatwand als schuimcellen. Door het aanhouden van de ontstekingsreactie raken ook de cellen van de specifieke immuniteit, met name T-lymfocyten, betrokken bij het ziekteproces. Deze chronische fase in het atherosclerotische proces is te classificeren in drie stadia: stabiel, instabiel of ruptuur-gevoelig. Vooral de instabiele en ruptuur-gevoelige lesies kunnen leiden tot het openscheuren van de vaatwand waardoor een bloedstolsel ontstaat en cardiovasculaire complicaties kunnen optreden. Opengescheurde lesies worden dan ook regelmatig gevonden bij patiënten met een acuut hart- of vaatprobleem.

Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar de rol van specifieke immuniteit in de pathogenese van chronische aderverkalking. In *Hoofdstuk 1* wordt uiteengezet wat op dit moment bekend is over het ziekteverloop van aderverkalking en hoe aangeboren en specifieke afweermechanismen hieraan bijdragen. In de volgende experimentele hoofdstukken (*Hoofdstuk 2-6*), wordt gerapporteerd in hoeverre de drie belangrijkste vereisten van een T-lymphocyt reactie: antigeen specificiteit, co-stimulatie en regulatie,

bijdragen aan het ontstaan en de ernst van aderverkalking. Dit onderzoek is verricht in twee muismodellen (APOE^{-/-} of LDLR^{-/-} muizen), die zodanig gevoelig gemaakt zijn dat ze aderverkalking ontwikkelen.

De specifieke immunoreactie in aderverkalking bestaat uit twee componenten: T-lymfocyten en antilichamen, die geproduceerd worden door B-lymfocyten. In mensen is gevonden dat anti-oxLDL antilichamen correleren met de ernst van chronische aderverkalking. Dit kan mogelijk betekenen dat de hoeveelheid anti-oxLDL antilichamen in het bloed te gebruiken is als maat voor het verschil tussen stabiele en instabiele of kwetsbare lesies. Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat atherosclerotische lesies in APOE^{-/-}CD40L^{-/-} muizen er stabiel uitzien dan die in controle (APOE^{-/-}) muizen. Daarnaast is de CD40-CD40L interactie van essentieel belang voor het verwisselen van het isotype (van IgM naar IgG) van een antilichaam in B-lymfocyten. Tevens is deze interactie belangrijk voor de inductie van T-lymfocyten met een helpende functie. *Hoofdstuk 2* beschrijft vervolgens hoe de anti-oxLDL antilichaam reactie zich ontwikkelt in muizen die aderverkalking hebben ten opzichte van controle muizen (zonder aderverkalking). Hieruit bleek dat de anti-oxLDL antilichaam reactie niet uniek was voor muizen met aderverkalking, omdat deze antilichamen ook aantoonbaar waren in controle muizen. Daarentegen hadden muizen met chronisch aderverkalking meer IgM anti-oxLDL antilichamen in hun bloed dan muizen met vroege aderverkalking.

In *Hoofdstuk 3* wordt de hypothese getest dat specifieke immuuncellen verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van atherosclerotische lesies met een stabiel fenotype in APOE^{-/-}CD40L^{-/-} muizen. Hiervoor werden LDLR^{-/-} muizen getransplanteerd met beenmerg geïsoleerd uit CD40L-deficiente muizen, zodat alle immuuncellen geen CD40L meer tot expressie kunnen brengen. Bestudering van deze muizen toonde aan dat de ontstane chronische aderverkalking vergelijkbaar was met die in controle muizen. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat het stabiele lesie fenotype dat gevonden wordt na CD40L blokkering niet afhankelijk is van CD40L positieve immuuncellen. Om te bewijzen dat inderdaad niet-beenmerg afkomstige cellen (die CD40L tot expressie brengen) betrokken zijn bij het ontstaan van atherosclerotische lesies met een stabiel fenotype, werden LDLR^{-/-} muizen die getransplanteerd waren met CD40L^{-/-} beenmerg tevens

behandeld met anti-CD40L antilichamen. Uit dit experiment bleek echter dat de ontstane chronische aderverkalking vergelijkbaar was tussen de twee muizengroepen. Deze resultaten bevestigen daarom geen duidelijke rol voor niet-beenmerg afkomstige cellen in lesie stabiliteit. Tevens kan echter een rol voor immuuncellen niet worden uitgesloten.

Het tweede gedeelte van dit proefschrift gaat in op de T-lymfocyt reactie in aderverkalking. Aangetoond is dat T-lymfocyten bijdragen aan de pathogenese van chronische aderverkalking. Normaliter is een T-lymfocyt reactie specifiek voor de veroorzaker van een ontsteking, zodat deze zo efficiënt mogelijk kan worden uitgeschakeld. Nadat de veroorzaker van een ontsteking volledig is verwijderd, moet de T-lymfocyt reactie zo snel mogelijk worden beëindigd om onnodige schade aan het omliggende weefsel te voorkomen. Het beëindigen van de T-lymfocyt reactie vindt plaats doordat regulerende T cellen de T-lymfocyt reactie onderdrukken, waardoor er vervolgens herstel kan optreden. Aangezien er onvoldoende bekend is over de rol van regulerende T cellen in chronische aderverkalking, werd dit in *Hoofdstuk 4* en *5* nader onderzocht. Daarnaast is tot op heden nog niet onomstotelijk bewezen dat T-lymfocyten, die in de atherosclerotische lesies aanwezig zijn, antigeen gedreven cellen zijn. Dit werd verder bestudeerd in *Hoofdstuk 6*.

Hoofdstuk 4 beschrijft de effecten van het blokkeren van het immunoregulerende cytokine, TGF- β , in chronische aderverkalking. APOE^{-/-} muizen behandeld met TGF β RII:Fc kregen atherosclerotische lesies met een meer ruptuur-gevoelig fenotype, dat gekenmerkt wordt door meer ontsteking en minder bindweefsel. In *Hoofdstuk 5* werden de regulerende T cellen gedepleteerd in LDLR^{-/-} muizen door ze te behandelen met anti-CD25 antilichamen. In de afwezigheid van regulerende T cellen ontwikkelden de muizen chronische atherosclerose met een meer inflammatoir fenotype dat gepaard ging met een toegenomen T-lymfocyt reactie. Deze resultaten tonen aan dat regulerende T cellen een beschermende rol spelen in chronische aderverkalking.

In het laatste experimentele hoofdstuk, *Hoofdstuk 6*, werden MHCII-deficiënte LDLR^{-/-} muizen gemaakt om de invloed van antigeen specificiteit op chronische aderverkalking te bestuderen. LDLR^{-/-}MHCII^{-/-} muizen bleken een lager cholesterol gehalte te hebben na het eten van een vetrijk dieet dan controle LDLR^{-/-} muizen, maar correlatie van dit cholesterol

gehalte met het afgenomen lesie oppervlak toonde aan dat er nog een andere factor bijdroeg aan het waargenomen effect op lesie grootte. Verdere analyse van de atherosclerotische lesies in de LDLR^{-/-}MHCII^{-/-} muizen lieten zien dat de chronische aderverkalking minder ernstig was en dat de CD4 T-lymfocyt reactie belemmerd was. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat antigeen presentatie een onderdeel is van de processen die leiden tot chronische aderverkalking.

Dit proefschrift heeft bijgedragen aan de verbreding van de kennis ten aanzien van de rol van T-lymfocyten in aderverkalking. De belangrijkste uitkomst van dit proefschrift is dat manipulatie van de T-lymfocyt reactie in chronische aderverkalking niet eenvoudig te realiseren is vanwege sterk regulerende mechanismen in het afweersysteem. Om uiteindelijk in staat te zijn patiënten die lijden aan hart- en vaatziekten te genezen of preventief te behandelen met immuno-therapie zal daarom meer onderzoek nodig zijn naar zowel ziekte gerelateerde als beschermende afweerreacties.