

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/81382> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schaftenaar, F.H.

Title: Modulation of the immune system for treatment of atherosclerosis

Issue Date: 2019-12-05



Nederlandse Samenvatting

Achtergrond

Hart- en vaatziekten vormen de meest voorkomende doodsoorzaak in de westerse wereld met atherosclerose als de dominante etiologie. Atherosclerose wordt gekenmerkt door afzetting van lipiden in de intima van middelgrote tot grote slagaders, wat leidt tot immuuncel accumulatie in de vaatwand en een pathogene chronische ontsteking in de vaatwand. De ontstekingsreactie versterkt de ophoping van vetten en stimuleert daarmee de vorming van laesies. De ontwikkeling van een atherosclerotische laesie duurt meestal tientallen jaren. De vorming van grote plaques kan het lumen van de kransslagaders zodanig afsluiten dat tijdens inspanning de zuurstoftoevoer naar onderliggend myocardweefsel onvoldoende is, wat kan leiden tot symptomen zoals kortademigheid, misselijkheid en vermoeidheid, en druk op de borst. Alhoewel deze situatie van stabiele angina maar zwak gecorreleerd is met cardiovasculaire sterfte, is stabiele angina wel geassocieerd met hartfalen, verhoogde ziekenhuisopnames, en verminderde kwaliteit van leven. Naast stabiele angina kan atherosclerose ook leiden tot de vorming van kwetsbare laesies, die ten gevolge van scheuring van de plaque of erosie van de endotheel laag op de plaque, de vorming van een trombus kunnen veroorzaken. De gevormde trombus kan de bloedstroom in situ beperken, of kan losbreken van de plaats van trombus formatie en de slagader in de vernauwende vertakkingen van de slagaders verstopen. In beide gevallen kan een acuut zuurstoftekort in achterliggende weefsels ontstaan wat ten grondslag ligt aan de levensbedreigende situaties zoals een hartinfarct en ischemische beroerte. Behandeling van een acute verstopping van de slagaders is gericht op het zo snel mogelijk herstellen van de bloedstroom, door fibrinolytische behandeling of chirurgische verwijdering van de trombus, om weefselbeschadiging door zuurstoftekort te voorkomen. Ter voorkoming van cardiovasculaire gebeurtenissen kunnen kwetsbare of occlusieve atherosclerotische plaques operatief worden verwijderd door middel van endarterectomie. Verder kan de verminderde bloedstroom ten gevolge van een vernauwd slagaderlumen worden hersteld door te dotteren en een stent te plaatsen die het vatlumen open houdt, of door bypass-chirurgie die de bloedstroom omleidt. Restenose is een vaak voorkomend fenomeen na cardiovasculaire chirurgie, waardoor herhaalde interventies soms noodzakelijk zijn.

Huidige behandelingsregimes om progressie van atherosclerose en (her)optreden van cardiovasculaire gebeurtenissen te voorkomen zijn voornamelijk gericht op het normaliseren van lipide niveaus door een gezonde levensstijl en door het gebruik van lipide verlagende middelen zoals statines en PCSK9 remmers. Verlaging van de lipiden niveaus verlaagt het risico op een cardiovasculaire complicatie, maar bij sommige patiënten worden statines niet goed verdragen of is therapietrouw een probleem, wordt het lipide niveau niet voldoende verlaagd, of blijft er ondanks succesvolle verlaging van lipide niveaus een verhoogd risico aanwezig voor een cardiovasculaire gebeurtenis ten gevolge van een onopgeloste ontstekingsreactie. Het recente succes van de CANTOS-studie, waarin cardiovasculaire complicaties werden gereduceerd door toediening van een monoklonaal antilichaam dat het pro-inflammatoire cytokine IL-1 β neutraliseert (Canakinumab), impliceert dat modulatie

van het immuunsysteem ook een haalbare manier is om atherosclerose te behandelen, en het cardiovasculaire risico in de mens te verminderen. In navolging van het paradigma dat het verlagen van de ontsteking atherosclerose kan verminderen en zware cardiovasculaire complicaties kan voorkomen, zijn klinische onderzoeken met lage doses van de immunosuppressiva methotrexaat en colchicine in de context van atherosclerose gestart. De resultaten van de behandeling met lage doses methotrexaat waren echter teleurstellend, cardiovasculaire sterfte werd niet geremd door behandeling met methotrexaat, terwijl negatieve bijwerkingen, waaronder verhoogde leverenzymen in de bloedsomloop, een hogere incidentie van huidkanker (niet basaalcelcarcinoom) en meer voorkomende mondzweren en orale pijn, werden gevonden in de met methotrexaat behandelde groep. Ook voor canakinumab en colchicine worden veel voorkomende bijwerkingen beschreven. In experimentele modellen van atherosclerose, is de modulatie van de antigeen-specifieke immunrespons naar plaque bestanddelen, waaronder albumine, geoxideerd LDL, Apolipoproteïne-B100 (ApoB100), collageen, en heat shock-proteïnes, in staat om atherosclerose te verminderen. Deze specifieke immuun modulatie zal waarschijnlijk resulteren in veel minder bijwerkingen dan algehele immuun suppressie, en zou daarom interessant zijn om verder te onderzoeken voor gebruik in de mens.

In dit proefschrift

In dit proefschrift hebben we ernaar gestreefd om de immunrespons voor de behandeling van atherosclerose gunstig te moduleren. Hyperlipidemie en ontsteking zijn de drijvende factoren achter atherosclerose. De interacties tussen lipiden en het immuunsysteem zijn daarom samengevat in **hoofdstuk 2**. Omdat lipiden niet water oplosbaar zijn, worden lipiden (en andere niet water oplosbare stoffen) vervoerd in het bloed verpakt in lipoproteïnen. Lipoproteïnen vervoeren onder meer vetzuren en cholesterol, wat belangrijke bouwstenen zijn voor onder andere celmembranen, en ze vervullen daarmee een belangrijke fysiologische rol. Door een hoge concentratie lipoproteïnen in het bloed kunnen er echter op bepaalde plekken in het arterieel vaatstelsel ophopingen van lipoproteïnen in de vaatwand ontstaan. Dit is een cruciale stap in de ontwikkeling van atherosclerose omdat dit zorgt voor het aantrekken van macrofagen naar de plaats in de vaatwand, waar lipoproteïnen zich ophopen. De geoxideerde en geaggregeerde lipoproteïnen activeren macrofagen, wat samen met andere pro-inflammatoire factoren in de atherosclerotische omgeving ervoor zorgt dat macrofagen een pro-inflammatoir fenotype aannemen. Door afgifte van ontstekingsbevorderende cytokinen en chemokines trekken pro-inflammatoire macrofagen andere immuuncellen aan naar de atherosclerotische laesie, en houden op deze manier de ontsteking op gang.

Opname van grote hoeveelheden plaque materiaal door dendritische cellen en macrofagen en presentatie van deze plaque materialen, gecombineerd met de aanwezigheid van co-stimulerende moleculen op antigeen presenterende cellen, stimuleren de interactie met Th1 CD4 T helper cellen die specifiek reageren op plaque antigenen. Op deze manier wordt

gedurende de ontwikkeling van atherosclerose de van nature aanwezige immuun tolerantie voor lichaamseigen eiwitten in de plaque gebroken. De daaruit voortvloeiende auto-immuunachtige reactie tegen plaque eiwitten wordt atherosclerose stimulerend beschouwd. Onder andere de hoge IFN- γ en TNF- α niveaus in de atherosclerotische laesie, die karakteristiek zijn voor Th1 immuun reacties, zijn gecorreleerd met verergering van atherosclerose. Omdat immuunreacties tegen al dan niet geoxideerd LDL goed gedocumenteerd zijn in de context van atherosclerose, hebben we de immuunreactie tegen LDL op verschillende manieren gemoduleerd in **hoofdstuk 3-5** om atherosclerose te verminderen. In **hoofdstuk 6** probeerden we de pathogene immuunreactie als geheel te remmen door immunoproteasomale remming, wat verrassend genoeg ook verbeterde parameters van metabool syndroom en lipide homeostase induceerde.

Omdat atherosclerose wordt gekenmerkt door accumulatie van LDL in de vaatwand, wat leidt tot inductie van onder meer auto-reactieve (ox)LDL-specifieke CD4 T-cellen, zou het aantrekkelijk zijn om de natuurlijke tolerantie voor LDL herstellen, waardoor de pathogene ontsteking wordt verminderd en atherosclerose geremd. Omdat regulatoire CD4 T-cellen (Tregs) cruciaal zijn voor het behoud van immuuntolerantie en in staat om auto-immuun reacties te verminderen wilden we Tregs vermeerderen om atherosclerose te bestrijden in **hoofdstuk 3**. Voor de immunosuppressieve functie van Tregs is het niet perse nodig dat Tregs een antigeen specifiek herkennen, maar het immunosuppressieve effect van antigeen specifieke Tregs is wel groter dan dat van Tregs die een niet gerelateerd antigeen herkennen. Een mogelijkheid voor inductie van antigeen specifieke Tregs is de orale toediening van antigenen. Via deze route wordt het toegediende antigeen opgenomen en gepresenteerd door een tolerogene dendritische cel populatie in de darmen, waardoor inductie van onder meer antigeen specifieke induceerbare Tregs (iTregs) kan worden bevorderd. Via orale toediening van geoxideerd LDL werd eerder al atherosclerose verminderd door inductie van oxLDL-specifieke Tregs. Na de laatste behandeling met geoxideerd LDL nemen de Treg aantallen echter snel af tot controle niveaus. Het therapeutische effect van orale toediening van geoxideerd LDL zou daarom mogelijk verbeterd kunnen worden door de Treg aantallen kunstmatig hoog te houden na het induceren van geoxideerd LDL specifieke Tregs. Daarom hebben we muizen na orale toediening van geoxideerd LDL, behandeld met IL-2 gekoppeld aan een antilichaam (JES6-1A12). IL-2 is een belangrijke groeifactor voor regulatoire T cellen maar kan ook veel andere cellen aanzetten tot groei en celdeling. De meeste cellen hebben echter een andere receptor voor IL-2 dan Tregs. Door het koppelen van IL-2 aan JES6-1A12 blijft binding gewaarborgd aan de hoge affiniteit receptor voor IL-2 die aanwezig is op Tregs, maar wordt binding van IL-2 aan andere IL-2 receptoren verhinderd. Daarmee leidt toediening van IL-2 gekoppeld aan JES6-1A12 tot specifieke vermeerdering van Tregs.

Ondanks dat IL-2 behandeling inderdaad leidde tot verhoogde Tregs niveaus in onze studie, samenvallend met verlaagde aantallen circulerende immuuncellen wat een geslaagde immunosuppressie aangeeft, resulteerde alleen behandeling met geoxideerd LDL in een

significante reductie in atherosclerose. De reden voor het uitblijven van een additief effect van orale toediening van geoxideerd LDL en IL-2 is lastig aan te wijzen doordat antigeen specifieke Tregs moeilijk te onderscheiden zijn van andere Tregs, en omdat er geen sterke kenmerken zijn om verschillende Treg populaties, iTregs en Tregs geproduceerd in de thymus (nTregs), van elkaar te onderscheiden. Wel is aangetoond dat er een negatieve terugkoppeling bestaat tussen nTregs en iTregs door de transfusie van nTregs, wat leidde tot een reductie van iTregs. Het zou daarom kunnen dat IL-2 behandeling in plaats van het vergroten van de geoxideerd LDL specifieke Treg cellen, deze cellen juist heeft onderdrukt door het vergroten van de nTreg populatie. Na het specifiek stimuleren van geoxideerd LDL specifieke Tregs lijkt non-specifieke expansie van Tregs niet gunstig voor het behandelen van atherosclerose.

Door de heterogene en slecht gedefinieerde samenstelling van intact LDL is het niet geschikt voor gebruik in vaccins. Daarom zijn een groot aantal onderzoeken gewijd aan het vinden van immunogene epitopen in ApoB100, aanwezig in LDL, om te gebruiken voor modulatie van de immuunrespons tegen LDL. Een peptidebibliotheek die het volledige ApoB100-eiwit overspant, werd gescreend met humaan bloedplasma voor antilichaambinding om delen in ApoB100 te identificeren die worden herken door antilichamen. Eén van de peptiden die werd herkend door antilichamen uit humaan serum is p210, genoemd naar het peptidenummer in de peptidebibliotheek. Verschillende vaccinatiestrategieën met p210 zijn succesvol gebleken in het verminderen van atherosclerose, maar de werkingsmechanismen van p210 die zijn gerapporteerd zijn uiteenlopend. In lijn met de identificatie van p210 is bescherming tegen atherosclerose gekoppeld aan het opwekken van p210 antilichamen, maar ook gekoppeld aan inductie van regulatoire B cellen, regulatoire CD4 T cellen, en CD8 T-cellen. Voor therapeutisch toepasbaarheid, en om de vaccinformulering en toediening te optimaliseren, is het belangrijk om het werkingsmechanisme van immuunmodulatie met p210 te identificeren.

Omdat p210 een humaan ApoB100 afgeleide sequentie is met 90% homologie met de overeenkomstige sequentie in de muis hebben we een experimenteel model met endogene expressie van humaan ApoB100 gebruikt. Dit kan de selectie van T cel klonen specifiek voor menselijk apoB100 en p210 in de thymus beïnvloeden, en maakt de in vivo presentatie van het volledige p210 mogelijk. Zoals eerder getoond en herhaald in **hoofdstuk 3**, zorgt het opwekken van tolerantie voor geoxideerd LDL voor verminderde atherosclerose. Daarom hebben we eerst p210 gekoppeld aan cholera toxine B (CTB), waarvan bekend is dat het opname via de slijmvliezen verbeterd en tolerantie bevordert, oraal toegediend. Zoals al eerder beschreven na nasale toediening van CTB-p210, leidde orale CTB-p210 administratie tot hogere aantallen regulatoire B cellen en p210 antilichamen, maar observeerden wij geen verhoging in Tregs wat wel werd gezien na nasale toediening van dit vaccin. Orale behandeling met p210-CTB resulteerde in dit experiment niet in verminderde atherosclerose. Om te bekijken of hogere p210 antilichaam niveaus wel atheroprotectief zouden werken, hebben we vervolgens muizen gevaccineerd met p210 gekoppeld aan een sterk CD4 T cel epitoom (pan-DR-epitoom, PADRE) en in combinatie met aluminiumhydroxide. Aluminiumhydroxide is een adjuvans dat zorgt voor een depot effect waardoor antigenen langer gepresenteerd worden en het versterkt ook de fagocytose van antigenen door antigen

presenterende cellen. De koppeling van een B cel epitoom aan een CD4 T cel epitoom induceert T cel hulp voor een versterkte antilichaam productie. Door eerst hoge antilichaam levels tegen p210 op te wekken met 3 vaccinaties met tussenposen van 3 weken, alvorens muizen op westers dieet te zetten, zorgden we ervoor dat gedurende het complete proces van atherogenese hoge antilichaam levels aanwezig waren. Echter ook in deze studie konden we geen effect vinden van vaccinatie met p210 op atherosclerose parameters. In experimenten in een ander atherosclerose model (ApoE deficiënte muizen), was toediening van p210 echter wel effectief in het reduceren van atherosclerose. Ook in de mens zijn p210 IgM en IgG niveaus gecorreleerd met verbeterde (kleinere) intima-media dikte van de carotiden, wat wijst op atheroprotectieve eigenschappen van p210-antilichamen in de mens.

Het ontbreken van door p210-antilichaam geïnduceerde atherobescherming in onze studies zou kunnen komen door de biologische functie van p210 in ApoB100. In gekweekte adipocyten werd namelijk LDLr gemedieerde LDL opname geremd door p210 antilichamen, wat verklaard kan worden doordat p210 onderdeel uit maakt van LDLr binding plaats A in ApoB100. Verder tonen verschillende studies dat p210 antilichamen de vorming van schuimcellen kan voorkomen, onder andere door de verhoogde expressie van genen die gelinkt zijn aan de verwerking en van cholesterol. In onze studies naar p210 vaccinatie hebben we in plaats van ApoE deficiënte muizen, LDLr deficiënte muizen gebruikt. Het ontbreken van de interactie tussen p210 en de LDLr door afwezigheid van de LDLr in het door ons gebruikte atherosclerose model, zou het ontbreken van een effect van p210 antilichamen kunnen verklaren.

Naast de inductie van beschermende antilichamen, wordt het beschermende effect van vaccinatie met p210-formuleringen verklaard door de inductie van atheroprotectieve T cel populaties. Wij konden echter geen inductie van CD4 T cel of CD8 T cel populatie detecteren. Dit zou te wijten kunnen zijn aan een gebrek aan sterke T cel epitopen in p210, wat bevestigd lijkt te worden door in silico predictie modellen voor MHC-I binding, die voorspellen dat p210 niet goed kan binden aan MHC-I en MHC-II, een voorwaarde voor een goede T cel activatie. De eerder beschreven T cel effecten na immuun modulatie met verschillende p210 formuleringen zou verklaard kunnen worden door een adjuvans functie van p210. Koppeling van p210 aan een fluorescent eiwit (FITC) verhoogde namelijk eerder de opname van FITC in dendritische cellen. Verder werden de bindingeigenschappen van de LDLr bindingsplaatsen in ApoB100, die binding met heparansulfaat proteoglycanen en de LDLr mogelijk maken, gebruikt om de CD8 T cel reactie tegen een peptide te versterken door het peptide te koppelen aan de LDLr bindingsplaatsen afkomstig van ApoB100. Ook zagen wij in celkweken van de milt dat incubatie met CTB-p210, maar niet met p210 of CTB leidde tot verhoogde cel dood. Aangezien CTB in hoge concentraties in de cel apoptose teweeg kan brengen, lijkt p210 ook hier een adjuvans functie vervuld te hebben. Veel van de vaccinatie studies met p210 die een reductie aan atherosclerose hebben geweten aan stimulatie van verschillende T cel populaties hebben ook cationisch runderserum albumine als dragereiwit gebruikt voor de vaccinaties met p210. Aangezien vaccinatie met cationisch runderserum albumine afzonderlijk al eerder leidde tot een reductie in atherosclerose, zou adjuvans functie van p210

mogelijk dit effect versterkt kunnen hebben in studies waarin cationisch runderserum albumine gebruikt werd als dragereiwit.

Het verminderen van atherosclerose door vaccinatie met van ApoB100 afgeleide CD4 T cel epitopen blijkt wel mogelijk, aangezien immunisatie met ApoB100 afgeleide peptiden die voorspeld zijn aan MHC-II te binden, leidde tot een reductie in atherosclerose. Vaccinatie met deze CD4 T cel epitopen leidde tot een verhoogde IL-10-expressie in aorta's van ApoB100-peptide-gevaccineerde muizen wat suggereert dat regulerende CD4-T-cellen werden geïnduceerd door vaccinatie, alhoewel de totale FoxP3-cel levels niet waren verhoogd. In deze studie werd vaccinatie echter aangevangen voordat extensieve atherosclerotische laesies waren gevormd. In een klinische setting zou vaccinatie in eerste instantie waarschijnlijk plaats vinden in risicogroepen en mensen die al zware plaque vorming hebben. Daarom zou het interessant zijn om te beoordelen of deze tolerogene en protectieve immuun reactie op ApoB100 afkomstige CD4 epitopen vaccinatie nog steeds kan worden bewerkstelligd als pas met vaccinatie wordt begonnen als atherosclerose al reeds aanwezig is. Gedurende de ontwikkeling van atherosclerose wordt namelijk de immuun tolerantie tegen plaque antigenen afgebroken, wat zou kunnen leiden tot een andere, misschien wel pathogene, immuunreactie na vaccinatie met CD4 epitopen van plaque antigenen in latere stadia atherosclerose ontwikkeling. Het aanbieden van deze CD4 T cel epitopen in een meer tolerogene setting, zoals een mucosale toediening in combinatie met tolerogene adjuvans, zou een aantrekkelijke strategie kunnen zijn om plaque antigen specifieke CD4 Tregs op te wekken om de atherosclerotische immuunrespons te remmen.

Er is veel minder bekend over de relevantie van CD8 T-cellen in de context van atherosclerose, hoewel CD8 T-cellen in grote hoeveelheden aanwezig zijn in de atherosclerotische plaque en daar een geactiveerd fenotype lijken te hebben. CD8 T-cellen zijn gespecialiseerd in het doden van specifieke cellen die herkend worden aan een specifiek peptide gepresenteerd op MHC-I via interactie met de T-cel receptor (TCR) op de CD8 T cel. Het algemene beeld is dat CD8 T cellen, door afgifte van inflammatoire cytokines vooral atherosclerose bevorderen. Bepaalde antigen specifieke CD8 T cel reacties zijn echter geïdentificeerd die atherosclerose remmen. Omdat ApoB100 wordt beschouwd als een van de belangrijkste plaque antigenen, wilden we de rol van ApoB100-specifieke CD8 T-cellen in atherosclerose beoordelen. Presentatie van plaque-bestanddelen, waaronder ApoB100 door antigen presenterende cellen in de plaque, zou antigen presenterende cellen vatbaar kunnen maken voor het dood maken door ApoB100-specifieke CD8 T-cellen. Omdat verminderde celdood van macrofagen resulteert in toegenomen atherosclerose, stelden we de hypothese dat het vermeerderen van ApoB100-specifieke CD8 T-cellen het doden van plaque-macrofagen door CD8 T-cellen zou kunnen bevorderen en daarmee therapeutisch relevant kan zijn.

Daarom hebben we deze hypothese getest in een gehumaniseerd muismodel met muizen met transgene expressie van humaan ApoB100 en MHC-I (HLA-A2), en hebben deze muizen geïmmuniseerd met van humaan ApoB100 afkomstige CD8 T cel epitopen die op humaan

MHC-I (HLA-S2) kunnen worden gepresenteerd in **hoofdstuk 5**. Aan de hand van modellen voor peptideverwerking en HLA-A2-binding, selecteerden we 6 van ApoB100 afkomstige peptiden die voorspeld waren gepresenteerd te worden op HLA-A2. HLA-A2-binding werd bevestigd voor alle 6 peptiden. Door middel van toediening van dendritische cellen beladen met de peptiden konden we in HLA-A2 transgene muizen zonder humaan ApoB100, ook voor 5 van de 6 peptiden een peptide specifieke CD8 T cel reactie opwekken. Daarna hebben we in atherosclerose studies met muizen die humaan ApoB100 en HLA-A2 tot expressie brengen atherosclerose studies gedaan. Opnieuw activeerden we initieel CD8 T-cellen met peptide beladen dendritische cellen. Na een week kregen de muizen een booster vaccinatie met poly(I: C) en een CD40 stimulerend antilichaam. Dit vaccinatieregime was eerder effectief in het induceren van specifieke CD8 T cellen tegen neo-epitopen uit tumoren. De CD8 T cellen geactiveerd door deze vaccinatie waren effectief in het penetreren en doden van tumoren, wat aangeeft dat deze vaccinatieaanpak migrerende en functionele CD8 T cellen oplevert.

Voor ApoB₄₀₆₋₄₁₄, ApoB₃₀₇₀₋₃₀₇₈ en ApoB₄₅₃₁₋₄₅₃₉, werden immuunspecifieke CD8 T cellen gedecteerd in de milt van ApoB100-peptide gevaccineerde muizen, 8-9 weken na boostervaccinatie bij opoffering, wat aangeeft dat de vaccinatie succesvol was. Interessant genoeg konden we in deze studie geen ApoB₄₀₆₋₄₁₇ en ApoB₂₃₅₆₋₂₃₆₄ specifieke CD8 T cellen detecteren in de met ApoB100 peptide behandelde muizen. Het zou kunnen dat endogene expressie van humaan ApoB100 in deze muizen heeft geleid tot negatieve selectie in de thymus of inductie van perifere tolerantie van ApoB₄₀₆₋₄₁₇ en ApoB₂₃₅₆₋₂₃₆₄ specifieke CD8 T cel klonen. In mediastinale lymfeknopen waren ook ApoB100 peptide specifieke CD8 T cellen aanwezig maar dit konden we niet detecteren in de aortabogen, een plek met veel atherosclerose formatie. Het verhoogde percentage effector CD8 T cellen in het bloed, en het verhoogde CD8 T cel percentage in de aorta na vaccinatie met de CD8 T cel epitopen, en eerder behaalde resultaten met dit immunisatieregime, suggereert dat het zeer aannemelijk is dat ApoB100 peptide specifieke CD8 T cellen circuleerden in het bloed en ook naar de plaque migreerden. Het zou kunnen dat de plaque omgeving ervoor zorgt dat CD8 T cellen minder effectief reageren op stimulatie van de T cel receptor door de ApoB100 peptiden. Dit zou een CD8 T cel intrinsiek effect kunnen zijn. Chronische antigeen blootstelling in de plaque zou kunnen leiden tot CD8 T cel uitputting. In overeenstemming met CD8 T cel uitputting produceren CD8 T cellen afkomstig uit de plaque minder cytokines en werd verhoogde expressie van het activatie remmende PD-1 waargenomen bij atherosclerosepatiënten. Aan de andere kant werd ook verhoogde expressie van het activatie remmende PD-L1 gevonden op macrofagen uit menselijke laesies, waarmee activatie van CD8 T cellen in de plaque geremd zou kunnen worden door andere cellen in de plaque omgeving.

In lijn met de afwezigheid van detecteerbare CD8 T cel activatie door de ApoB100 peptiden in de aortabogen, zagen we geen verschil in cellulaire inhoud van de plaques en de grootte en stabiliteit van de plaque in behandelde en onbehandelde muizen. Omdat vaccinatie met deze van ApoB100 afgeleide CD8 T cel epitopen wel duidelijke CD8 T cel reacties opwekte maar dus geen invloed had op atherosclerose, lijkt vaccinatie met van ApoB100 afgeleide CD8

T cel epitopen niet effectief om atherosclerose te behandelen. Bovendien zou het opwekken van een sterke CD8 T cel reactie tegen een endogeen eiwit kunnen leiden tot auto-immuniteit en weefselbeschadiging in organen waarin het eiwit endogeen tot expressie wordt gebracht. Daarom zal de inductie van specifieke tolerantie tegen plaque-antigenen of het verminderen van de algehele ontsteking waarschijnlijk effectiever zijn voor de behandeling van atherosclerose dan het induceren van antigeen-specifieke CD8 T cel reacties.

Alhoewel momenteel geen geneesmiddel gericht op het vermindering van ontsteking is goedgekeurd voor de behandeling van atherosclerose door de FDA en EMA, hebben de LODOCO en CANTOS klinische studies aangetoond dat een reductie in cardiovasculair risico kan worden bereikt door remming van het immuunsysteem. Omdat remming van het immuunsysteem via remming van het immunoproteasoom met specifieke remmer ONX-0914 het ziektebeeld in meerdere experimentele auto-immuun modellen verbeterde, hebben we effect van behandeling met ONX-0914 op atherosclerose bestudeerd in **hoofdstuk 6**. Het immunoproteasome is een proteasoom-variant die vooral aanwezig is in immuuncellen, maar ook tot expressie gebracht kan worden door inflammatoire signalen zoals interferon- γ . Proteasomen breken het overgrote deel van de eiwitten af die moeten worden afgebroken in de cel. Daartoe bevatten proteasomen 3 verschillende catalytische subunits die na verschillende aminozuren eiwitten kunnen knippen. Immunoproteasomen en normale proteasomen verschillen in deze katalytische subunits, waardoor de verschillende proteasomen door afbraak van eiwitten ook verschillende peptides creëren. Meer peptides gecreëerd door het immunoproteasome kunnen goed binden aan MHC-I. Daarmee is het immunoproteasome belangrijk voor het mogelijk maken van CD8 T cel reacties. Meer recent hebben gen-deletie studies en studies met specifieke immunoproteasoom remmers laten zien dat het immunoproteasoom betrokken is bij de regulatie van veel meer celprocessen in immuuncellen, zoals cytokine productie, proliferatie en differentiatie. Hoe immunoproteasoom remming precies leidt tot immunosuppressie is niet precies duidelijk. Er zijn echter aanwijzingen dat door de remming van het immunoproteasome, door ophoping van niet gevouwen-, slecht gevouwen-, geoxideerde-, en geubiquitineerde eiwitten de ongevouwen eiwit reactie wordt gestart. Voor sommige eiwitten waarvan de hoeveelheid omhoog gaat gedurende de ongevouwen eiwit reactie is een immunosuppressieve werking bekend. Het is mogelijk dat op deze manier activatie van immuun cellen wordt beperkt die stimuli uit de omgeving niet goed kunnen verwerken, waarmee mogelijk onnodige immuun gemedieerde weefsel schade voorkomen wordt. In lijn met de eerder gerapporteerde immunosuppressieve werking van ONX-0914, werd de hoeveelheid en activatie van conventionele dendritische cellen verminderd door ONX-0914 behandeling. Verder waren in verschillende immuun compartimenten verminderde niveaus van geheugen CD4 en CD8 T cellen zichtbaar. Omdat de verhoogde activatie van DCs en verhoogde niveaus van circulerende geheugen T cellen gecorreleerd zijn met meer atherosclerose, zullen de waargenomen veranderingen in dendritische cellen en T cellen geïnduceerd door ONX-0914, waarschijnlijk bij hebben gedragen aan de verminderde atherosclerose gezien in met ONX-0914 behandelde groep .

Naast het ontwikkelen van atherosclerose ontwikkelen de LDLr deficiënte muizen die we gebruikt hebben in **hoofdstuk 6** op westers dieet, obesitas, metabool syndroom en insulineresistentie. Naast het verbeteren van atherosclerose, verminderde ONX-0914 het lichaamsgewicht in meerdere experimenten met WTD gevoede muizen. De massa van wit vetweefsel was aanzienlijk verminderd in alle onderzoeken, terwijl de vetvrije massa niet werd beïnvloed door de behandeling met ONX-0914. Samenvallend met de vermindering in wit vet, zagen we verbeteringen in metabole parameters zoals verlaagde insulineniveaus, verlaagde bloedglucose na vasten, verlaagde TG-spiegels, en verlaagde cholesterol gehalten in het bloed. Voor zover bekend bij ons, is dit de eerste studie die aantoont dat remming van het immunoproteasoom met behulp van de LMP7- en LMP2- specifieke remmer ONX-0914 behalve zijn immuun modulerende effecten ook metabole effecten heeft. Dit is waarschijnlijk gekoppeld aan het gebruik van een westers dieet in onze studie, wat leidt tot obesitas en de ontwikkeling van metabool syndroom, in plaats van het gebruik van magere muizen op een normaal dieet in andere onderzoeken met ONX-0914. Bovendien is ONX-0914 veel getest in andere ziektemodellen waarin gewichtsverlies door het opgewekte ziektebeeld aanwezig is, zoals in arthritis of colitis modellen, waardoor het effect van ONX-0914 op gewichtsverlies in deze studies misschien gemaskeerd is geweest.

Gewichtsverlies bleek niet afhankelijk van verminderde voedselinname of verhoogd energieverbruik wat we bepaalden in metabole kooien. Verder zagen we in deze studie ook geen versnelde klaring van cholesterol en vetzuren uit in de bloedbaan toegediende op VLDL lijkende deeltjes. Bij orale toediening van olijfolie werd echter een verminderde verhoging van de triglyceride niveaus in het bloed vastgesteld in ONX-0914 behandelde muizen. Omdat de klaring van cholesterol en triglyceriden uit het bloed eerder niet was verhoogd, duiden deze resultaten op verlaagde lipidenopname in de darmen door ONX-0914 behandeling. Evenzo werd verminderde opname van lipiden in de darmen waargenomen in dieren zonder expressie van LMP7. In LMP7 deficiënte muizen werd verminderde lipide opname geweid aan een verlaagde expressie van lipases uit de pancreas. Dit observeerden wij echter niet. Wij observeerden dat ONX-0914 herhaaldelijk leidde tot accumulatie van neutrofielen en macrofagen in wit vetweefsel. Mature vetcellen geïsoleerd uit gonadaal wit vetweefsel bleken ook immunoproteasomale katalytische subunits tot expressie te brengen en verhoogden expressie van CCL2 na incubatie in kweek met ONX-0914. CCL2 is zeer potent in het aantrekken van immuuncellen. Daarom zou de verhoogde expressie van CCL2 in vetweefsel na behandeling met ONX-0914 zeer waarschijnlijk bij hebben gedragen aan de accumulatie van neutrofielen en macrofagen in wit vetweefsel. Interessant is dat patiënten met een verlies van functiemutatie in het PSMB8 gen, dat codeert voor het LMP7 eiwit, zichzelf presenteren met vergelijkbare symptomen zoals ontsteking van het witte vetweefsel en sterk verminderde opbouw van vetweefsel. Behandeling met ONX-0914, na het doden van macrofagen in de buikholte met clodronate liposomen, leidde niet tot verminderde triglyceride niveaus in het bloed zoals het geval was met ONX-0914 apart. Daarmee lijkt het effect dat wij zien op lipide opname in de darm afhankelijk te zijn van macrofagen. Er zijn meerdere factoren die door macrofagen geproduceerd kunnen worden

waarvan is beschreven dat ze of gewichtsverlies of verminderde opname van vetten in de darm kunnen bewerkstelligen, zoals GDF15, IL-15 en IL-1 β . Aangezien we in muizen zonder expressie van GDF15 ook gewichtsverlies observeerden door behandeling met ONX-0914, lijkt GDF15 niet betrokken bij het gewichtsverlies tot stand gebracht door ONX-0914. Een veel voorkomende bijwerking van het (atheroprotectieve) IL-1 β neutraliserende antilichaam canacinumab (Ilaris) is gewichtstoename. Het zou daarom interessant zijn om te onderzoeken of IL-1 β verantwoordelijk was voor het door ONX-0914 veroorzaakte gewichtsverlies.

We hebben aangetoond dat de behandeling van muizen met ONX-0914 atherosclerose en de witte vet massa aanzienlijk vermindert, en parameters van metabool syndroom verbetert. Atherosclerose als wereldwijde doodsoorzaak nummer 1, en de wereldwijde obesitas epidemie die leidt metabool syndroom gerelateerde ziekten, vragen om effectieve therapieën. Ons onderzoek wekt de suggestie dat immunoproteasomale inhibitie een waardevol therapeutisch hulpmiddel zou kunnen zijn voor deze gezondheids dilemma's. Op dit moment zijn fase 1b-onderzoeken bij SLE-patiënten met de immunoproteasoom remmer KZR-616 bezig, met fase 2 klinische onderzoeken gericht op de behandeling van lupus nefritis, dermatomyositis, polymyositis, auto-immuun hemolytische anemie en immuuntrombocytopenie, op de planning. Het is interessant om in de gaten te houden of immunoproteasomale remming in deze patiënten groepen ook leidt tot gewichtsverlies en of er aanwijzingen zijn voor verminderde cardiovasculaire mortaliteit.

Toekomstperspectieven

Het recente succes van de CANTOS-studie, waarin zware cardiovasculaire gebeurtenissen vermindert werden door toediening van een neutraliserend monoklonaal antilichaam tegen het pro-inflammatoire cytokine IL-1 β (Canakinumab), laat zien dat modulatie van het immuunsysteem ook in de mens een haalbare manier is om atherosclerose te behandelen en het cardiovasculaire risico te verminderen. In overeenstemming met het paradigma dat het systemisch verlagen van ontsteking atherosclerose kan verminderen en belangrijke cardiovasculaire gebeurtenissen kan voorkomen, zijn klinische onderzoeken met lage doses van de immunosuppressiva methotrexaat en colchicine bezig. Indien succesvol, zouden lage dosis methotrexaat en colchicine de eerste op immunomodulatie toegespitste goedgekeurde behandelingen voor atherosclerose kunnen worden. Afhankelijk van het succes van de klinische onderzoeken met immunoproteasomale remmers in de context van andere auto-immuunziekten, zouden klinische studies met betrekking tot immunoproteasomale remming voor behandeling van atherosclerose en obesitas kunnen worden overwogen. Nadelen van algemene immunosuppressiva zijn natuurlijk de verhoogde vatbaarheid voor infectieziekten, maar methotrexaat en colchicine zijn ook andere bijwerkingen gemeld, zoals gastro-intestinale problemen. Vervelende bijwerkingen van medicatie die voor langere tijd gebruikt moeten worden, leiden tot verminderde therapietrouw van de patiënt.

Aan vaccinatiebenaderingen om atherosclerose te verminderen die specifiek zijn gericht op het moduleren van de immunoreactie tegen plaque-antigenen, en met name het herstellen van tolerantie voor plaque-antigenen, zullen waarschijnlijk veel minder bijwerkingen vast zitten. In preklinische atherosclerose modellen is het induceren van tolerantie tegen plaque antigenen, waaronder (geoxideerd) LDL en ApoB100 afkomstige peptiden, effectief geweest in het reduceren van atherosclerose, maar heeft nog geen vervolg gevonden in klinische studies. Het opwekken van tolerantie voor myeline afkomstige peptiden leidde bij multiple sclerose (MS) patiënten in een afname van antigeen specifieke T cel reacties tegen de myeline peptiden in een fase 1 onderzoek. Dit onderzoek laat zien dat het haalbaar is om auto-immuniteit te doorbreken in de mens met gerichte tolerogene vaccinatie strategieën . Momenteel is onze kennis over de antigeen specifieke T-celreacties die plaatsvinden in atherosclerose echter zeer beperkt maar zijn er CD4 T cel reacties tegen onder andere LDL, collageen type V en HSP's in humane atherosclerose gerapporteerd. In **hoofdstuk 3** waren we in staat atherosclerose te verminderen door het opwekken van tolerantie voor geoxideerd LDL door orale toediening van geoxideerd LDL. We konden echter geen bescherming tegen atherosclerose bereiken door de orale toediening van het p210-peptide, afkomstig van het ApoB100-eiwit dat aanwezig is in LDL. Het is waarschijnlijk dat een atheroprotectief effect van orale p210 administratie uit bleef door het ontbreken van een CD4 T cel epitooop in p210. Dit is direct ook een moeilijkheid voor het ontwikkelen van een tolerogeen vaccin voor de behandeling van atherosclerose. De identificatie van geschikte CD4 T-cel epitopen voor tolerisatie is lastig en door de vele variaties in menselijke MHC-allelen zullen veel epitopen slechts bij een deel van de patiënten het MHC-II kunnen binden, en dus effectief kunnen zijn. Daarom zal voor tolerantie inductie voor de behandeling van atherosclerose moeten worden overwogen om met (delen van) plaque antigenen, of meerdere CD4 T cel epitopen te vaccineren. Het gebruik van verschillende plaque antigenen en meerdere epitopen voor vaccinatie zou ook meer T cel klonen kunnen moduleren, wat waarschijnlijk een sterker effect teweeg zal brengen dan het tolerogeen moduleren van een enkele T cel kloon. Betere karakterisatie van de adaptieve immunrespons in humane atherosclerosis, zoals identificatie van antigenen en antigene epitopen zou daarmee zeer gunstig kunnen zijn voor de behandeling van atherosclerose. Een andere belangrijke hindernis voor het toepassen van tolerantie-inductie bij de mens is de ontwikkeling van de meest effectieve en veilige tolerantierégimes.

Naast het moduleren van de CD4 T cel respons, zijn er studies die laten zien dat vaccinatie met p210 en runderserum albumine als dragereiwit resulteerde in verminderde atherosclerose via activatie van CD8 T cellen. Wij konden echter geen beschermende effecten van vaccinatie met p210 onderscheiden, en zagen geen activatie van CD8 T cellen door vaccinatie met p210 in **hoofdstuk 4**. Verder zagen we ook geen reductie in atherosclerose in muizen gevaccineerd met CD8 T cel epitopen, wat wel leidde tot sterke CD8 T cel activatie, in **hoofdstuk 5**. Naast dat we geen atheroprotectief effect konden onderscheiden van vaccinatie met ApoB100 afkomstige CD8 T cel epitopen, is activatie van CD8 T cellen tegen plaque antigenen waarschijnlijk geen goed idee voor behandeling van atherosclerose. Door het opwekken van een CD8 T cel reactie tegen endogeen tot expressie komende eiwitten

bestaat de kans op weefselschade op plekken waar het eiwit endogeen wordt geproduceerd. Vaccinatiestrategieën met CD8 T cellen in een experimentele omgeving kunnen echter nog steeds zeer bruikbare inzichten verschaffen over de rol van CD8 T-cellen in atherosclerose.

Naast modulatie van T-cel responsen, is inductie van antilichamen (IgG) tegen verschillende plaque-antigenen in staat geweest om atherosclerose in preklinische studies te verminderen. Ook antilichamen tegen (epitopen) van (ox)LDL, waaronder p210, resulteerden in verlaagde atherosclerose in preklinische studies. Wij konden de atheroprotectieve eigenschappen van p210-antilichamen in **hoofdstuk 4** niet onderschrijven. Mogelijk is dit een gevolg van het gebruik van LDLr deficiënte muizen in onze studie doordat p210 deel uitmaakt van de LDLr bindingsplaats in ApoB100 in plaats van ApoE deficiënte muizen gebruikt in andere studies. Van p210 antilichamen en andere antilichamen tegen LDL is beschreven dat het de klaring van LDL kan versnellen en daarmee het circulerende cholesterol kan verlagen, wat dan weer leidde tot verminderde atherosclerose. Als dit inderdaad het mechanisme vormt waarmee antilichamen gericht tegen LDL atherosclerose verminderen, is het de vraag of deze antilichamen nog een additioneel gunstig effect hebben in combinatie met huidige en toekomstige lipide verlagende therapieën. Van antilichamen tegen collageen type VI werd gevonden dat het activatie van macrofagen kan remmen en expressie van cholesterol effluxgenen kan bewerkstelligen door te binden aan FC-receptoren. Onze kennis van de effecten en de werkingsmechanismen van deze antilichamen op atherosclerose is nog zeer beperkt, maar er zijn indicaties dat antilichamen gericht tegen plaque antigenen atheroprotectief kunnen werken. Via mucosale toediening van (delen van) plaque antigenen zouden tegelijkertijd therapeutisch gunstige antilichamen en tolerogene regulatoire CD4 T cellen opgewekt kunnen worden, en activatie van pathogene CD4 T cel en CD8 T cel types voorkomen kunnen worden.

Er zijn verschillende uitvoerbare benaderingen waarmee modulatie van het immuunsysteem kan worden ingezet om atherosclerose te verminderen. Algemene immunosuppressie in de vorm van lage dosis colchicine wordt momenteel getest in klinische studies voor de behandeling van atherosclerose, en zal indien succesvol waarschijnlijk de eerste op immunomodulatie toegespitste behandelingen vormen die beschikbaar komen voor de behandeling van atherosclerose. Antigen-specifieke modulatie van de immuunrespons voor behandeling van atherosclerose is verder weg, maar preklinische studies hebben aangegeven dat dergelijke benaderingen mogelijk zijn voor de behandeling van atherosclerose. Een combinatie van lipide- en immuun management, en het bevorderen van een gezonde levensstijl zullen waarschijnlijk de preventieve maatregelen van de toekomst omvatten om atherosclerose en hart- en vaatziekten te voorkomen.