



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Dissection and manipulation of antigen-specific T cell responses**

Schepers, K.

### **Citation**

Schepers, K. (2006, October 19). *Dissection and manipulation of antigen-specific T cell responses*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4920>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4920>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# **Samenvatting**

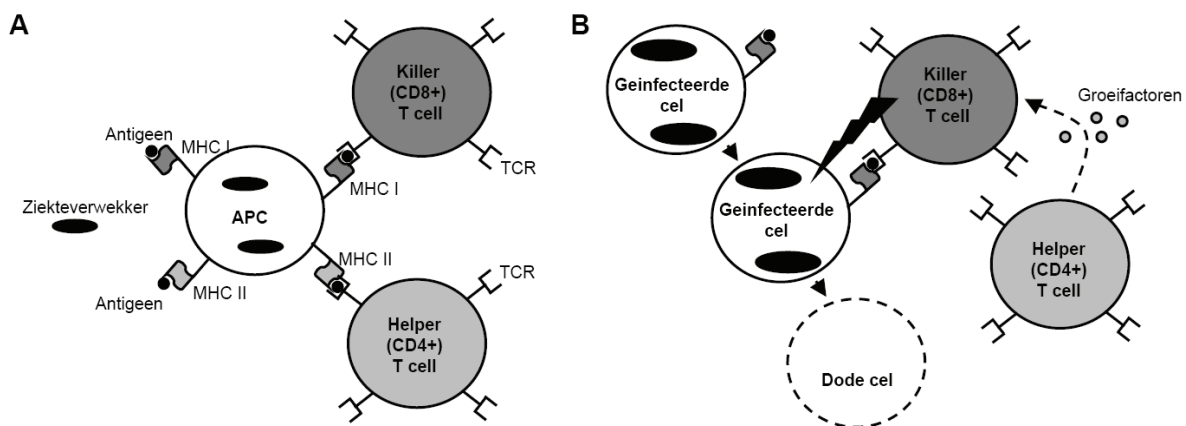


## Samenvatting

### Introductie

#### *Wat zijn T cellen?*

T cellen zijn witte bloedcellen die een cruciale rol spelen bij het beschermen tegen ziekteverwekkers zoals virussen en bacteriën. Dit doen zij door middel van het herkennen van fragmenten van de ziekteverwekker, zogenaamde antigenen, die zich op het oppervlak van geïnfecteerde cellen bevinden in major histocompatibiliteitscomplex (MHC) moleculen (Figuur 1A). In een lichaam komen zeer veel verschillende T cellen voor die elk andere MHC-antigeen complexen herkennen. De MHC-antigeen complexen worden herkend door detectoren die aanwezig zijn op het oppervlak van de T cel (T cell receptoren, TCRs). In sommige gevallen kunnen deze TCRs ook andere afwijkende cellen zoals tumorcellen herkennen. Killer T cellen (CD8+ T cellen) herkennen antigenen die zich in MHC klasse I moleculen bevinden welke op vrijwel elke cel voorkomen (Figuur 1A), en zijn gespecialiseerd in het doden van afwijkende cellen (Figuur 1B). Helper T cellen (CD4+ T cellen) herkennen antigenen die zich in MHC klasse II moleculen bevinden welke voorkomen op het oppervlak van zogenoemde professionele antigeen presenterende cellen (APCs, Figuur 1A). CD4+ T cellen zijn gespecialiseerd in het geven van ondersteunende signalen aan andere celtypen van het afweersysteem, zoals CD8+ T cellen en APCs, in de vorm van onder andere groeifactoren (Figuur 1B).

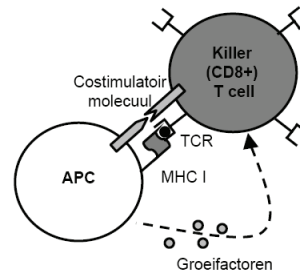


**Figuur 1. Herkenning door en werking van T cellen.** A) MHC-antigeen complex herkenning door CD4+ en CD8+ T cellen B) Werking van CD4+ en CD8+ T cellen

#### *T cel activatie*

Na ontwikkeling in de thymus (zwezerik) verspreiden T cellen zich via het bloed over de verschillende lymfoïde organen zoals de lymfeklieren en de milt. Op dat moment zijn de T cellen nog niet in aanraking geweest met het antigeen dat de TCR op hun oppervlak kan herkennen en worden daarom ook wel naïeve T cellen genoemd. In lymfoïde organen snuffelen naïeve CD4+ en CD8+ T cellen continu aan de fragmenten die zich bevinden in de

MHC moleculen op het oppervlak van APCs. Indien naïeve T cellen in aanraking komen met fragmenten van een ziekteverwekker kunnen zij worden geactiveerd (Figuur ). Of een naïeve T cel al dan niet geactiveerd wordt hangt niet alleen af van het feit of de TCR het antigeen-MHC complex op de APC herkent, maar ook van aanvullende signalen. Deze aanvullende signalen kunnen bestaan uit groeifactoren die de APC produceert of signalen die gegeven worden via zogenaamde co-stimulatoire moleculen. Co-stimulatoire moleculen zijn detectoren op het oppervlak van T cellen die indien zij in



**Figuur 2. T cel activatie door een APC.**

aanraking komen met moleculen op het oppervlak van de APC een activerend signaal aan de T cel kunnen geven. Na activatie beginnen de naïeve T cellen te delen en ontwikkelen zij zich tot een grote populatie van effector T cellen, die klaar

#### *Activatie en injectie van T cellen als therapie*

zijn om de strijd aan te gaan met vreemde indringers verspreid door het hele lichaam.

Vanwege de rol van antigeen-specifieke T cellen in tumor- en ziekteverwekker-specifieke afweer reacties, is het verhogen van de activiteit en de aantallen antigeen-specifieke T cellen een ideale methode om individuen te beschermen of te behandelen tegen infecties of bepaalde typen kanker. De meest gebruikte methode om antigeen-specifieke T cel reacties te versterken is vaccinatie, dit is de blootstelling van personen aan fragmenten van ziekteverwekkers- of tumoren in een context die het afweersysteem stimuleert. In gevallen dat vaccinatie minder effectief is, kan het inspuiten van buiten het lichaam gemaakte antigeen-specifieke T cellen een goede toevoeging of alternatief zijn. Een efficiënte manier om antigeen-specifieke CD8+ T cellen te produceren is door middel van TCR-gen transfer. Bij deze techniek worden T cellen uit het bloed geïsoleerd die allemaal verschillende antigenen herkennen. Vervolgens wordt in deze T cel populatie één bepaalde TCR ingebracht waardoor alle T cellen in deze populatie dezelfde tumor of ziekteverwekker zullen gaan herkennen.

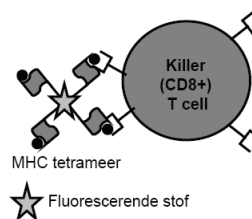
#### **Doel en aanpak van dit promotie onderzoek**

Het doel van dit promotie onderzoek was, om met behulp van het gebruik van proefdieronderzoek in muizen 1) meer inzicht te krijgen in antigeen-specifieke T cel reacties en 2) te bestuderen hoe antigeen-specifieke T cel reacties verbeterd kunnen worden. Voor het eerste doel hebben we nieuwe gereedschappen ontwikkeld die, doordat ze de visualisatie van antigeen-specifieke CD4+ en CD8+ T cellen mogelijk maken, ons meer inzicht verschaffen in de dynamiek van antigeen-specifieke T cel reacties gedurende een lopende afweerreactie (hoofdstuk 2). Daarnaast hebben we een nieuwe techniek ontwikkeld die de studie van familie

relaties tussen verschillende T cel populaties mogelijk maakt. Met deze techniek kan bijvoorbeeld bepaald worden of twee verschillende typen effector T cel populaties ontstaan uit dezelfde of verschillende naïeve T cellen (hoofdstuk 5). Voor het tweede doel hebben we geanalyseerd of antigeen-specifieke T cel reacties gemanipuleerd kunnen worden door T cellen te stimuleren via het co-stimulator molecuul CD27 (hoofdstuk 3), of door het inbrengen van TCRs in CD4<sup>+</sup> T cellen met behulp van TCR-gen transfer (hoofdstuk 4).

### Visualisatie van antigeen-specifieke T cellen

Om meer inzicht in antigeen-specifieke T cel reacties te krijgen hebben we in het laboratorium complexen gemaakt die bestaan uit vier MHC/antigeen complexen en zijn gelabeld met een fluorescerende stof. Dit gereedschap (MHC tetrameren genaamd; tetra = vier) kan gebruikt worden om T cellen aan te kleuren (Figuur 3). Het antigeen dat aanwezig is in het MHC tetrameer bepaalt welke T cellen met het MHC tetrameer kunnen worden gedetecteerd. Met behulp van deze MHC tetrameren hebben we de antigeen-specifieke CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T cel reacties gevisualiseerd in muizen die geïnfecteerd werden met een virus. In een vroeg stadium van de infectie bleken virus-specifieke CD4<sup>+</sup> T cellen in grote aantallen aanwezig te zijn op de plek van de infectie. In een later stadium van de infectie bleken de virus-specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen op deze plek te domineren. Verder bleken de virus-specifieke CD4<sup>+</sup> T cellen niet alleen bij te dragen aan de generatie van virus-specifieke CD8<sup>+</sup> T cel reacties, maar ook andere cellen van het afweer systeem te activeren. Samenvattend, bevestigen deze data de beschreven rol dat CD4<sup>+</sup> T cellen antigeen-specifieke CD8<sup>+</sup> T cel reacties verbeteren, en benadrukken het belang van CD4<sup>+</sup> T cellen in de (vroeg) fase van de afweer reactie op de plaats van infectie.



**Figuur 3. Detectie van antigeen-specifieke T cellen door middel van MHC tetrameren**

### Verbetering van antigeen-specifieke T cellen door middel van CD27 stimulatie

Met het doel om te bestuderen of de co-stimulatie via CD27 antigeen-specifieke T cel reacties kan verbeteren, hebben we antigeen-specifieke T cel reacties geanalyseerd in muizen waarin de T cellen continu gestimuleerd worden via CD27. Wij hebben gevonden dat deze muizen na een virus infectie of tumor injectie niet alleen verhoogde aantallen antigeen-specifieke T cellen bevatten, maar ook dat deze T cellen per cel beter functioneren. Ook vertonen deze muizen een verbeterde bescherming tegen de vorming van tumoren na een onderhuidse injectie met tumorcellen. Deze resultaten geven aan dat vaccinatie strategieën ter verbetering van antigeen-specifieke T cel reacties geoptimaliseerd zouden kunnen worden met methoden die aangrijpen op CD27 op de T cel.

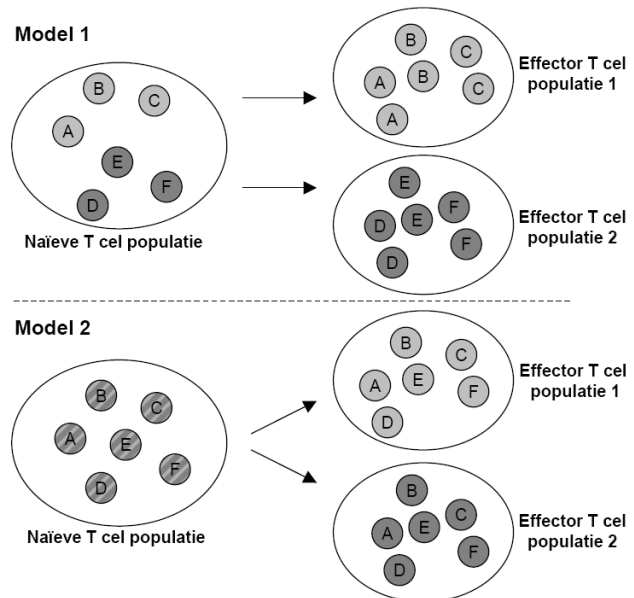
### **Verbetering van antigeen-specifieke T cellen door middel van het inbrengen van TCRs in CD4+ T cellen**

Een aantrekkelijke methode om antigeen-specifieke CD8+ T cel reacties te verbeteren is het inspuiten van buiten het lichaam gemaakte antigeen-specifieke CD8+ T cellen. Aangezien CD4+ T cellen in staat zijn om CD8+ T cellen te helpen, zou het gezamenlijk injecteren van antigeen-specifieke CD8+ en CD4+ T cellen mogelijk de therapeutische effectiviteit kunnen verhogen. Echter het aantal goed-gedefinieerde tumor-specifieke CD4+ T cel antigenen welke gebruikt kunnen worden voor dit soort therapieën is schaars. Daarom stelden wij ons tot doel om te bepalen of CD4+ T cellen die uitgerust worden met TCRs die normaal gesproken voorkomen op CD8+ T cellen ook in staat zijn om CD8+ T cellen te helpen. Voor dit doel werden TCRs die zich normaal gesproken bevinden op CD8+ T cellen geïntroduceerd in CD4+ T cellen door middel van TCR-gen transfer. Het bleek dat deze CD4+ T cellen net als gewone CD4+ T cellen in staat zijn om groeifactoren te produceren en APCs te activeren (hoofdstuk 4). Experimenten in muizen toonden aan dat deze CD4+ T cellen ook in staat zijn om zich te vermenigvuldigen en om antigeen-specifieke CD8+ T cel reacties te verbeteren. Wel bleek dat om de uit CD8+ T cellen afkomstige TCRs te laten functioneren in CD4+ T cellen het gezamenlijk inbrengen van de TCR en CD8 noodzakelijk was. Concluderend geven deze resultaten het bewijs dat grote aantallen functionele CD4+ T cellen kunnen worden geproduceerd door middel van de introductie van TCRs afkomstig van CD8+ T cellen.

### **Het bestuderen van familie relaties tussen verschillende T cel populaties**

Gedurende de afgelopen jaren is het steeds duidelijker geworden dat zowel CD4+ als CD8+ effector T cel populaties bestaan uit subpopulaties met verschillende eigenschappen, bijvoorbeeld wat betreft hun functie en migratie eigenschappen (zie hoofdstuk 1). Echter, hoe deze verschillende T cel populaties ontstaan uit naïve T cellen is grotendeels onbekend. Theoretisch zijn er twee mogelijkheden 1) elke populatie van effector T cellen is afkomstig uit een aparte naïeve T cel populatie (model 1, figuur 4) of 2) beide populaties zijn afkomstig uit één en dezelfde naïeve T cel populatie (model 2, figuur 4). Om hier een onderscheid tussen te maken hebben wij een nieuwe methode ontwikkeld die wij cellulaire barcoding hebben genoemd. Deze methode is gebaseerd op een markeer-systeem waarmee elke T cel in de naïeve T cel populatie gemarkeerd wordt met een unieke marker of barcode. De T cellen worden op een zodanige manier gemarkeerd dat als de T cel deelt de barcode wordt doorgegeven aan beide dochtercellen. Door in een later stadium de barcodes in de verschillende effector T cel populaties te analyseren kan bepaald worden of deze T cel populaties zijn ontstaan uit dezelfde of verschillende naïeve T cel populaties (Figuur 4). Indien de barcodes in beide T cel populaties overlappen zijn zij afkomstig uit dezelfde naïeve T cel populatie. Zijn de barcodes in beide populaties echter verschillend dan zijn zij afkomstig uit verschillende naïeve T cel populaties. In hoofdstuk 5 laten we zien dat deze cellulaire barcoding techniek inderdaad gebruikt kan worden voor de analyse van familie relaties tussen

verschillende T cel populaties. In muizen die tegelijkertijd werden geïnfecteerd met een griepvirus en geïnjecteerd met tumorcellen, welke beide hetzelfde antigeen bevatten, hebben wij aangetoond dat antigeen-specifieke T cellen die zich in long- en tumorweefsel bevinden, voor het grootste deel overlappende barcodes bevatten. Dit houdt in dat het merendeel van de T cellen die aanwezig zijn in ontstoken long- en tumorweefsel zijn ontstaan uit dezelfde populatie van naïeve T cellen. Gezamenlijk tonen deze resultaten aan dat cellulaire barcoding een krachtige techniek is voor het bestuderen van hoe verschillende T cel populaties ontstaan uit een populatie van naïeve T cellen. Verder denken wij dat deze techniek ook zeer goed gebruikt kan worden om familie relaties tussen populaties van andere celtypen te bestuderen.



**Figuur 4. Twee modellen voor hoe een naïeve T cel populatie kan uitgroeien tot twee verschillende effector T cel populaties**

### Conclusies

Dit proefschrift biedt nieuwe inzichten in de ontwikkeling van antigeen-specifieke T cel reacties en laat zien dat co-stimulatie via CD27 en de injectie van gemodificeerde CD4<sup>+</sup> T cellen antigeen-specifieke CD8<sup>+</sup> T cel reacties kan verhogen. Ook biedt het ons nieuwe gereedschappen om antigeen-specifieke T cel reacties te bestuderen, welke ons in staat moeten stellen om de kennis over antigeen-specifieke T cel reacties te vergroten. Gezamenlijk zal deze kennis de kans verhogen dat het afweersysteem succesvol kan worden gebruikt in de strijd tegen infectieziekten en kanker.



