



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Antigen handling and cross-presentation by dendritic cells

Ho, N.I.S.C.

Citation

Ho, N. I. S. C. (2020, July 9). *Antigen handling and cross-presentation by dendritic cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/123272>

Version: 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/1887/123272>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



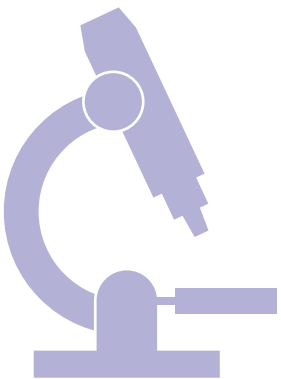
The handle <http://hdl.handle.net/1887/123272> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ho, N.I.S.C.

Title: Antigen handling and cross-presentation by dendritic cells

Issue Date: 2020-07-09

A



Appendices

Nederlandse samenvatting

Acknowledgements

Curriculum vitae

List of publications



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Ons immuunsysteem is het belangrijkste wapen dat wij van nature hebben meegekregen om ons te verdedigen tegen verschillende ziekteverwekkende indringers o.a. bacteriën en virussen. Het immuunsysteem bestaat uit verschillende cellen met ieder een eigen taak die vaak in verband staan met elkaar om samen als een legerfront te vechten tegen indringers. Eén van de cellen die een centrale rol speelt in het immuunsysteem is de dendritische cel (DC). Ze waren voor het eerst ontdekt door Paul Langerhans tegen het einde van de negentiende eeuw, en hebben hun naam te danken aan de voelsprietten (dendrietten) die de cellen hebben om de pathogene indringers op te sporen. Rond 1973 ontdekten Ralph Steinman en Zanvil Cohn dat DCs als een soort "scouts" in het lichaam patrouilleren om indringers op te sporen met hun voelsprietten. Vaak patrouilleren de DCs op plekken in het lichaam waar pathogenen binnendringen, zoals de huid en slijmvliezen. Op de voelsprietten zitten verschillende receptoren, zoals Toll-like receptoren (TLRs) and C-type lectine receptoren (CLRs), die delen van allerlei indringers kunnen herkennen. TLRs herkennen onderdelen van bijvoorbeeld bacteriën en virussen, CLRs herkennen suikerstructuren op onder andere bacteriën en schimmels. Daarnaast kunnen DCs ook antilichamen herkennen die gebonden zijn aan geïnfecteerde cellen of pathogenen door middel van Fcγ receptoren (FcγRs). Wanneer de receptoren op de DCs pathogenen herkennen worden de pathogenen opgenomen en de eiwitten daarvan (de antigenen) door de DCs verteerd tot kleinere stukjes. Deze stukjes worden daarna op het oppervlak van de DC gepresenteerd aan T-cellen, de "soldaten" van het immuunsysteem. Een unieke eigenschap van DCs is dat ze externe antigenen kunnen opnemen en aan specifieke "killer" T-cellen kunnen presenteren, ook wel "cross-presentatie" genoemd. Deze T-cellen worden geactiveerd zodra ze een DC "scout" zien die stukjes van een pathogeen presenteren waarmee de DC alarm slaat dat er ergens een vijand gesignaleerd is. De T-cellen gaan dan expanderen totdat ze een heel leger aan T-cel "soldaten" hebben die specifiek de vijand herkennen die eerder gerapporteerd werd door de DC. Het leger van T-cellen gaat dan naar de plek waar de pathogenen bevinden en ruimt ze dan op. Doordat DCs een onmisbare rol spelen in het activeren van het immuunsysteem en het aanzetten van T-cellen, worden er steeds meer onderzoeken gedaan naar hoe men deze DCs nog beter hun werk kunnen laten doen.

In dit proefschrift bestuderen we wat er met een antigeen gebeurt nadat het wordt opgenomen door DCs via receptoren op de voelsprietten. We maken gebruik van een model antigeen (OVA) en koppelen het aan antilichamen, die specifiek binden aan OVA, zodat er een immuuncomplex formatie van OVA met antilichamen (OVA IC) gevormd wordt. Deze OVA IC binden aan de FcγRs op de voelsprietten van de DCs en worden daarna opgenomen in de DCs. Onze onderzoeksgroep heeft al eerder laten zien dat deze OVA IC heel efficiënt worden opgenomen door DCs en ook DCs sterk kunnen activeren *in vitro*. Wanneer DCs

eerst beladen worden met tumor specifieke immuuncomplexen en ingespoten worden in muizen, wordt er een sterk CD8⁺ T-cel respons opgewekt waardoor tumoren aangevallen worden. In **hoofdstuk 2** laten we zien dat DCs voor een lange tijd OVA IC kunnen opslaan in de cel nadat de OVA IC zijn opgenomen *in vivo*. Een belangrijk gegeven is dat we in deze studie gebruik hebben gemaakt van een natuurlijke formatie van OVA IC door eerst antilichamen in te spuiten in de muis en vervolgens het antigeen om op deze manier de immuuncomplexen zelf te laten vormen in circulatie. Hiermee bootsten we de natuurlijke vorming van immuuncomplexen na in het lichaam. In het lichaam zijn meerdere DC types te vinden, waaronder CD8α⁺ (ook wel cDC1 genoemd), CD8α⁻ (ook wel cDC2 genoemd), en pDCs. We zagen dat alle DC types OVA IC kunnen opnemen en opslaan, maar dat er een verschil was in welke type T cellen werden geactiveerd. De CD8α⁺ DCs activeerden de CD8⁺ T-cellen (ook wel de killer T-cellen genoemd), terwijl de CD8α⁻ DCs veel beter de CD4⁺ T-cellen (ook wel de helper T cellen genoemd) activeerden. De CD8⁺ T-cellen kunnen tumorcellen aanvallen, waarbij CD4⁺ T-cellen een extra boost kunnen geven aan de DCs om de CD8⁺ T-cellen nog sterker te activeren. Opvallend was dat pDCs, die vaak een belangrijke rol spelen bij virale infecties, wel OVA IC konden opnemen en opslaan maar niet in staat waren om CD8⁺ of CD4⁺ T-cellen te activeren. In deze studie laten we zien dat DCs in staat zijn om antigenen voor lange duur op te slaan en daardoor ook voor lange duur antigenen kunnen presenteren aan T-cellen. Dit is van belang doordat DCs vaak tijd nodig hebben om te reizen vanaf de plek waar ze een pathogeen zijn tegengekomen tot de plekken (lymfeknopen) waar ze het antigeen presenteren aan T-cellen. Doordat DCs langdurig antigenen in hun opslag hebben en voor lange tijd aan T-cellen kunnen presenteren wordt een effectiever immuunrespons opgewekt.

Er werd altijd vanuit gegaan dat OVA IC worden opgenomen door DCs via de FcγRs op de voelsprietten van de DCs. We laten in **hoofdstuk 3** zien dat het echter veel complexer is. We hebben ontdekt dat C1q, die onderdeel is van het complementsysteem, een cruciale rol speelt in de opname van OVA IC door DCs *in vivo*. Hier hadden we ook weer gebruik gemaakt van natuurlijk gevormde immuuncomplexen in circulatie. Wanneer we muizen gebruikten die geen C1q hadden zagen we dat er geen OVA IC meer werden opgenomen door de DCs, waardoor er ook geen T-cellen meer werden geactiveerd. Het verbazingwekkende was dat we zelfs een verhoogde OVA IC opname zagen in DCs wanneer we gebruik maakten van muizen die geen FcγRs hadden *in vivo*. Het lijkt er op dat C1q een veel dominantere rol speelt dan FcγRs in OVA IC opname door DCs *in vivo*. Verder onderzoek naar de receptor voor C1q op de voelsprietten van DCs zou beter inzicht geven hoe IC worden opgenomen *in vivo*.

We hebben eerder door onze onderzoeksgroep en in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift laten zien dat DCs voor lange tijd antigeen kunnen opslaan waardoor er langdurig T-cellen geactiveerd kunnen worden. In **hoofdstuk 4** onderzochten we meer in detail waar de antigenen worden opgeslagen in DCs. We maakten gebruik van fluorescerend gelabelde

OVA IC die we konden volgen in de DCs met behulp van confocale microscopie. We laten zien dat OVA IC worden opgeslagen in een compartiment die positief is voor LAMP1, maar niet hetzelfde is als de compartimenten waar antigeen wordt beladen op MHCI of MHCII-moleculen. Wanneer de antigenen via een andere receptor, de C-type lectin receptor MGL1, worden opgenomen zien we dat de antigenen uiteindelijk in dezelfde compartimenten terechtkomen. Onze data suggereren dat de compartimenten antigenen kunnen opslaan die vanuit verschillende opname routes worden opgenomen door de DCs.

Om antigenen te kunnen volgen in DCs worden vaak fluoroforen gekoppeld aan de antigenen die je wilt visualiseren. Je kan dan confocale microscopie gebruiken om de fluoroforen te zien in de cellen. Helaas zijn de antigenen waar interesse voor is niet altijd beschikbaar met een fluorofoor, daarom hebben we in **hoofdstuk 7** gekeken naar de mogelijkheden om met een nieuwe techniek fluoroforen te koppelen aan een TLR2 ligand (Pam) geconjugerd met een OVA lang-peptide. We hebben eerder aangetoond dat de Pam in deze conjugaten DCs kunnen activeren en dat het OVA lang-peptide verwerkt wordt door de DC voor cross-presentatie aan CD8⁺ T-cellen. Deze combinatie is heel aantrekkelijk voor het ontwikkelen van vaccins tegen kanker doordat je met één conjugaat een specifiek antigeen en een adjuvans hebt voor het activeren van DCs. We zagen eerder dat DCs na opname van deze conjugaten ook voor meerdere dagen het antigeen konden cross-presenteren. Dit suggereert dat ook deze conjugaten worden opgeslagen in de DCs. Om de conjugaten te kunnen volgen in DCs hadden we de conjugaten gekoppeld aan fluorofoor TAMRA of Cy5. Vanwege de slechte oplosbaarheid van de conjugaten die gekoppeld waren aan TAMRA was het niet mogelijk deze conjugaten verder te gebruiken voor experimenten. De conjugaten die gekoppeld waren aan Cy5 werden efficiënt opgenomen door DCs en behielden de eigenschappen om DCs te activeren. Daarnaast hadden we ook een ander TLR-ligand (CpG) gekoppeld aan een OVA lang-peptide en gelabeld met Alexa 488 of Cy5. Beiden werden efficiënt opgenomen door DCs in endosomale compartimenten. Het is echter niet uitgesloten dat een fluorofoor de eigenschappen kunnen veranderen van een conjugaat, daarom is het belangrijk om nieuwe mogelijkheden in het labelen van conjugaten te ontdekken. Eén van de mogelijkheden is om eerst je antigeen te geven aan DCs en achteraf pas de fluorofoor vast te koppelen. Daar wordt nu intensief onderzoek aan gedaan.

In **hoofdstuk 5** modificeerden we het OVA-eiwit, dat normaal via de mannose receptor (MR) op DCs werd opgenomen, door er een suikerstructuur aan te koppelen. Door de koppeling van de suikerstructuur werd het OVA-eiwit opgenomen door de MGL1 receptor in plaats van MR. Dit zorgde ervoor dat naïeve CD4⁺ T-cellen veranderden naar IFN γ -producerende Th1 cellen en een betere activatie van CD8⁺ T-cellen. De opnamen van OVA via de MR vereist meestal een hoge hoeveelheid van beschikbare OVA om een efficiënte opname te realiseren in DCs. Daarnaast is ook een additioneel signaal nodig via bijvoorbeeld TLRs om de DCs te activeren. Door de modifictie van OVA en de opname via MGL1 te laten verlopen,

is er veel minder OVA nodig en geen additioneel activatie signaal om DCs te matureren voor efficiënte T-cel activatie. Daarnaast laten we zien dat OVA zonder suikerstructuur wordt opgenomen in EEA1⁺ Rab11⁺ compartimenten in DCs. Echter, wanneer een suikerstructuur aan OVA is gekoppeld wordt OVA gestuurd naar Rab11⁺ LAMP1⁺ compartimenten waar het opgeslagen wordt voor langdurige antigeen cross-presentatie aan CD8⁺ T-cellen.

Wat er precies met het antigeen gebeurt nadat het opgeslagen wordt in DCs en de route die het antigeen aflegt voordat het op het celoppervlak in MHC-moleculen wordt gepresenteerd aan T-cellen is nog niet helemaal ontrafeld. We hebben eerder laten zien dat de route die het antigeen aflegt vanuit de opslag TAP en proteasoom afhankelijk is, maar hoe het antigeen uit het opslag-compartiment wordt getransporteerd of verder gedegradeerd wordt is nog onduidelijk. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat het autofagie proces mogelijk de opslag-compartimenten afbreekt waardoor dit invloed kan hebben op de mate van antigeen cross-presentatie aan CD8⁺ T-cellen. Autofagie is een evolutionair geconserveerd systeem dat de degradatie van verschillende eiwitten en beschadigde organellen door lysosomen induceert. In dit hoofdstuk blokkeerden we autofagie met remmers of we gebruikten muizen die geen autofagie hadden en zagen dat DCs meer antigenen konden opslaan en een verhoogde antigeen cross-presentatie induceerden aan CD8⁺ T-cellen. Het lijkt er op dat autofagosomen de opslag compartimenten degraderen en daarbij de mate van antigeen cross-presentatie kunnen beïnvloeden.

In conclusie, in deze thesis is beschreven dat verschillende DC types capabel zijn om voor lange tijd verschillende typen antigenen op te slaan in speciale opslag-compartimenten. Dit draagt bij aan langdurige antigeen cross-presentatie aan T-cellen, waardoor een betere immuunrespons is op te wekken. Voor de ontwikkeling van toekomstige kankervaccins kan het van belang zijn dat de vaccin-antigenen langdurig opgeslagen worden in DCs en tegelijkertijd DCs kunnen activeren. Ook is het belangrijk om te weten door welke type DCs de antigenen opgenomen worden, aangezien verschillende DC types andere functies hebben. Het is gunstig als zowel de killer CD8⁺ T-cellen als de helper CD4⁺ T-cellen optimaal geactiveerd kunnen worden om de immuunrespons nog verder te kunnen versterken. Het immuunsysteem is echter zeer complex, er zijn veel factoren die een rol spelen bij immuuntherapie van patiënten met kanker. Vaak beïnvloeden tumorcellen de omgeving waardoor immuun cellen minder goed te tumorcellen kunnen bereiken of minder goed geactiveerd worden. In de toekomst zal steeds meer onderzoek gedaan worden om verschillende klassieke- en immuuntherapieën te combineren, waaronder specifieke kankervaccins met chemotherapie of tumor ablatie technieken om zo een sterke tumor specifieke immuunrespons op te wekken. Het is in ieder geval duidelijk dat DCs, sinds hun ontdekking, een dominante positie hebben verkregen in de ontwikkeling van vaccins tegen kanker. Verder onderzoek naar het mechanisme van DC cross-presentatie is noodzakelijk om deze cellen, die we van nature hebben meegekregen om te vechten tegen indringers, zo optimaal mogelijk te benutten.