



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel insights in MHC class II antigen presentation

Hoorn, B.M. van den

Citation

Hoorn, B. M. van den. (2011, April 6). *Novel insights in MHC class II antigen presentation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16694>

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/1887/16694>

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

Nederlandse samenvatting en discussie

Samenvatting en Discussie

Het huidige kennisniveau

Major Histocompatibility Complex klasse II (MHC-II) antigeen presentatie is betrokken bij de regulatie van afweer tegen infecties en tumoren. Het is ook sterk gerelateerd aan ontwikkeling en/of voortgang van auto-immuunziekten. Het is nodig om de regulatie van dit proces beter begrijpen om nieuwe therapieën te ontwikkelen. Dit heeft als doel de immuunreacties te verbeteren in geval van infecties en kanker en te verminderen in het geval van auto-immuniteit.

In de afgelopen 20 jaar hebben veel groepen bijgedragen aan het huidige kennisniveau van de MHC-II route in antigeen presenterende cellen, zoals beschreven in hoofdstuk 1 van dit proefschrift. Succesvolle antigeen presentatie door MHC-II is het resultaat van een reeks sterk gereguleerde cellulaire processen. Het begint met de transcriptie van MHC-II onder controle van de MHC-II regulator CIITA, gevolgd door synthese en samenvoeging van MHC-II complexen in het endoplasmatisch reticulum (ER), waar het ook een interactie aangaat met de Invariante keten (Ii). MHC-II wordt getransporteerd naar het MHC-II beladings compartiment (MIIC) met de hulp van Ii. De MIIC is een laat endosomaal organel gedefiniëerd door de aanwezigheid van MHC-II en haar chaperonne HLA-DM (DM). Hier wordt Ii afgebroken, gevolgd door binding van MHC-II met DM. DM katalyseert het uitwisselen van het Ii fragment, CLIP, voor antigene peptiden. Antigenen komen de cel binnen via het proces van endocytose. Ze worden afgebroken tot peptiden door de protease enzymen die aanwezig zijn in het MIIC. Daar kunnen deze peptiden worden geladen op MHC-II. Wanneer dat gebeurd is, moet MHC-II naar de plasma membraan worden getransporteerd om haar peptide aan het immuunsysteem te presenteren. Dit vereist transportroutes die worden aangedreven door motor eiwitten. Deze transportroutes kunnen buisvormige of blaasvormige/vesiculaire structuren zijn (al dan niet met intraluminale blaasjes/vesicles). Deze structuren fuseren dan weer met de plasmamembraan, waardoor MHC-II op de plasma membraan terecht komt. Wanneer er intraluminale vesicles (ILV) worden uitgescheiden, noemen we die exosomen. MHC-II antigeen presentatie kan worden beëindigd door internalisering van de op de plasmamembraan aanwezige MHC-II moleculen, gevolgd door afbraak of recycling.

Het onbekende

De MHC-II antigeen presentatie route is in grote lijnen bekend, maar de subtiële details missen nog. Deze details zijn vaak de sleutels voor het begrijpen van de precieze regulatie van het MHC-II antigeen presentatie proces. Dit kunnen belangrijke uitgangspunten zijn voor het ontwikkelen van geneesmiddelen op basis van medicijnen, antilichamen of peptiden. Om meer kennis te verkrijgen van het mechanisme van MHC-II antigeen presentatie kunnen twee strategieën worden toegepast. Eén daarvan is om een niche in de MHC-II route in detail beschrijven, met behulp van hoge resolutie, state-of-the-art technieken. Dit zal

meestal alleen statische en beschrijvende gegevens opleveren. Het alternatief is de toepassing van een genoombrede en objectieve benadering in combinatie met systeembioïogie, waarbij de complexe relatie tussen de nieuwe spelers die in de MHC-II route zullen worden gevonden met de al bekende factoren kan worden opgehelderd. Gegevens van verschillende databases, gecombineerd met een resultaten uit onderzoek van enkele nieuwe regulator eiwitten in MHC-II antigeen presentatie, zal leiden tot 'nieuwe bioïogie'. In dit proefschrift laten we voor beide strategieën een voorbeeld zien.

Strategie één - Inzoomen op details

Peptide belading van het MHC-II molecuul vindt plaats in de MIIC, een laat endosomaal multivesiculair organel, bestaande uit een buitenmembraan en intraluminaïe vesicles (ILV) (Neefjes et al., 1990; Peters et al., 1991). De MIIC is verrijkt met MHC-II eiwitten, de chaperonne DM en proteasen, die een pool van peptiden uit ge-endocyteerd materiaal kunnen genereren. De interactie tussen MHC-II en DM is het meest efficiënt op de ILVs, zoals gedetecteerd in FRET studies, suggererend dat daar peptide belading plaats vindt (Zwart et al., 2005). We veronderstellen dat tetraspanin eiwitten de interactie tussen MHC-II en DM vergemakkelijken, omdat ze zich in heel regelmatige patronen kunnen organiseren (eiwit microdomeinen) en daardoor fungeren als een platform voor eiwit interacties. De tetraspanins CD63 en CD82 zijn goede kandidaten om dergelijke microdomeinen te vormen, omdat ze verrijkt zijn op ILVs (Escola et al., 1998; Wubbolts et al., 2003) en met zowel MHC-II als DM een interactie aangaan (Hammond et al., 1998). We visualiseren de efficiëntie van de dynamische homo- en hetero-typische interacties tussen CD63 en CD82 met behulp van een techniek die seFRET wordt genoemd (Van Rheenen et al., 2004), zoals beschreven in hoofdstuk 2. Hoewel de twee tetraspanins efficiënter met elkaar een interactie aangaan op de buitenmembraan van de MIIC, hebben zowel MHC-II en DM een voorkeur voor een interactie met CD63 op ILVs. Op de buitenmembraan van een MIIC, heeft MHC-II de voorkeur voor een interactie met CD82. Deze voorkeur wordt ook waargenomen op de plasmamembraan.

In de laatste paar jaar zijn er maar enkele MHC-II gerelateerde tetraspanin functies geopperd. Onlangs is de suggestie gedaan dat tetraspanin CD9 betrokken zou kunnen zijn bij het sorteren van MHC-II op ILVs (Buschow et al., 2009). Daarnaast is op de plasmamembraan van muizencellen de betrokkenheid van CD9 bij de clustering van twee MHC-II varianten aangetoond. Dit is nodig voor de opbouw van het zogenaamde synaps (Unternaehrer et al., 2007). Wij suggereren dat CD63 de interactie tussen MHC-II en DM op de ILVs vergemakkelijkt. CD82 zou een rol kunnen spelen bij het sorteren van de peptide beladen MHC-II op de buitenmembraan voor het vervoer naar de plasmamembraan. Onze studies zijn uniek, omdat ze de dynamiek van tetraspanin netwerken binnen het MIIC laten zien en een verklaring bieden voor de ruimtelijke verdeling van MHC-II/DM complexen binnen deze intracellulaire compartimenten.

Strategie twee – High throughput - genoom brede screen

Om nieuwe spelers in de route van MHC-II antigeen presentatie te vinden, hebben we een genoombrede, objectieve RNAi screen gedaan, waarbij translatie van elk menselijk gen één voor één wordt stilgelegd (downregulatie). Het effect daarvan op de MHC-II oppervlakte-expressie en peptide belading hebben we geanalyseerd met flow-cytometrie. Hierbij hebben we een database gecreëerd van genen die invloed hebben op **MHC-II celoppervlakte expressie**, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Dit leidde tot het definiëren 276 nieuwe MHC-II regulators die ook tot expressie komen in primaire immuuncellen. Dit hebben we geanalyseerd met behulp van microarray-techniek wat de **mRNA expressie database** opleverde. Van deze 276 MHC-II regulators is tien procent al bekend als zijnde MHC-II gerelateerd en is acht procent gerelateerd aan auto-immuunziekten. Analyse van de nieuwe regulatoren met behulp van bestaande eiwit interactie databases leverde geen nieuwe functionele routes op, omdat veel hits een onbekende functie hebben. Wij hebben daarom een aantal functionele experimenten ontworpen om op een objectieve manier een functie te kunnen toekennen aan al die nieuwe MHC-II regulatoren.

Functionele experimenten

Om de nieuwe regulatoren te plaatsen in de MHC-II antigeen presentatie route, ontwierpen we twee soorten experimenten; (1) Analyse van MHC-II transcriptie en (2) visualisatie van MHC-II transport, sortering (Golgi) en antigeen toelevering (vroeg endosomen). We vonden negen genen die de transcriptie van MHC-II en/of gerelateerde genen beïnvloeden. We ontwierpen een nieuw experiment om deze hits in een complex terugkoppeling netwerk te plaatsen, waarbij we de effecten van de verschillende hits op elkaar konden bepalen. Visualisatie van de MHC-II routes laat zien dat de regulatoren te verdelen zijn in een aantal groepen die een verschillende fenotype hebben. Dit indelen werd gedaan met behulp van software: 'Supervised machine learning' (CP-analist 2). Dit resulteerde in de **MHC-II transport database**.

Systeembioologie: Integratie van databases

De databases, dusverre gegenereerd, werden geïntegreerd in een boomdiagram. Een groep nieuwe MHC-II regulatoren liet een MHC-II distributie fenotype zien, dat lijkt op het fenotype van gestimuleerde (volwassen of mature) Dendritische Cellen (DCs). Om te bevestigen dat deze genen invloed hebben op antigeen presentatie in professionele antigeen presenterende cellen, bestudeerden we de effecten van downregulatie van deze genen op expressie en intracellulaire lokalisatie van MHC-II in niet gestimuleerde (nog niet volwassen of immature) DCs.

De geselecteerde genen werden gedownreguleerd (door middel van virale transductie) in menselijke primaire monoccyten die vervolgens werden gedifferentieerd tot immature DCs. Inderdaad, MHC-II werd gedistribueerd naar de plasmamembraan, een fenotype dat kenmerkend is voor mature DCs. Bij viraal getransduceerde cellen ontbrak de kenmerkende expressie van maturatie markers op het celoppervlak, wat aangeeft dat MHC-II redistributie naar de

plasmamembraan het resultaat is van downregulatie van de geselecteerde genen en niet van maturatie. Op deze manier hebben immature DCs een MHC-II distributie fenotype van mature DCs gekregen.

Het oplossen van het mechanisme van nieuwe spelers

Eén van de genen die MHC-II redistributie veroorzaakt is de onbekende GTPase ARF7/ARL14. Dit eiwit had direct onze interesse, omdat bekend is dat ARF eiwitten een rol spelen in transport. Daarnaast is dit GTPase aanwezig op MHC-II compartimenten. GTPasen zijn actief in een GEF-afhankelijke, GTP-gebonden toestand en inactief in een GAP-afhankelijke GDP-gebonden toestand. We doorzochten onze databases en vonden een immuun-specifieke ARF-GEF, PSD4, die na downregulatie ook het MHC-II redistributie fenotype liet zien. PSD4 kon ARF7/ARL14 beladen met GTP en daarnaast bond het ook aan het phosphoinositide PIP2. Dit phosphoinositide is het product van gezamenlijke inspanningen van twee enzymen PI3K en PIP5K (die ook het MHC-II redistributie fenotype laten zien). Dit leidde tot het definiëren van een klein netwerk dat bestaat uit de eiwitten PI3KR2, PIP5K1A, ARF7/ARL14 en de GEF: PSD4.

GTPasen oefenen hun functie uit via interactie met effector-eiwitten. Door middel van een experimentele methode genaamd 'yeast two hybrid' identificeerden we een onbekende ARF7/ARL14 effector, C11orf46 (genaamd ARF7EP). Door het aantonen van een interactie tussen ARF7EP en de actine motor MYO1E in PBMC's (met behulp van GST-pull-down en massa-spectrometrie) konden we de GTPase relateren aan het actine cytoskelet. Deze interactie werd ook bevestigd door immunoprecipitatie. Deze aanpak laat zien dat informatie uit datasets aangevuld met resultaten uit laboratorium experimenten leidt tot snelle identificatie van nieuwe signaalwegen die essentieel zijn voor het functioneren van het immuunsysteem. Hier wordt dat geïllustreerd voor het fenotype van MHC-II redistributie na stimulatie van DCs

Van systeembioologie naar nieuwe biologie

Het is de vraag of we celbiologische processen kunnen ontrafelen op een high-throughput manier. Met de huidige technische kennis, kunnen we datasets en databases combineren en voorspellen welke eiwitten betrokken zullen zijn bij specifieke processen in de cel. Bovendien mogen we aannemen dat eiwitten die eenzelfde MHC-II fenotype laten zien na downregulatie, actief zijn in dezelfde signaleringsroute. Grote datasets die publiek beschikbaar zijn, kunnen worden gecombineerd door netwerk voorspellingprogramma's, zoals STRING en Humannet. Laboratorium experimenten blijven nodig om nieuwe interacties te testen en te valideren, zelfs al zijn deze voorspeld door computerprogramma's. Ook om de eiwitten die betrokken zijn bij één proces in een functionele volgorde te plaatsen, zullen laboratorium experimenten gedaan moeten worden.

Wij illustreren dit door het ontcijferen van een nieuwe transcriptie route, welke de expressie van MHC-II reguleert. Integratie van informatie uit de drie databases, de **MHC-II celoppervlakte expressie database**, de **mRNA expressie database** en de **MHC-II transport database**, maakte het mogelijk om een groep van genen met hetzelfde fenotype te selecteren. Namelijk het fenotype van MHC-

II redistributie naar de plasma membraan. Voor sommige van deze werd door experimenteel onderzoek in dendritische cellen bevestigd dat ze inderdaad verantwoordelijk zijn voor dit specifieke fenotype. Door het combineren van informatie uit de databases en biochemische experimenten konden we ARF7/ARL14 en haar interactors identificeren als moleculen met een sleutelrol in MHC-II transport.

Vooruitzichten

Het beter begrijpen van de subtiele regulatie van MHC-II antigeen presentatie is van essentieel belang, aangezien dit proces kritiek is bij het reguleren van afweerreacties. Een effectieve B-cel reactie is nodig om infecties goed te kunnen bestrijden. Dit vereist een optimale presentatie van antigenen door MHC-II. MHC-II is dus een centrale speler in de afweer tegen infectieziekten. Sommige van de door ons nieuw gevonden regulators kunnen perfecte kandidaten zijn om MHC-II antigeen presentatie te beïnvloeden en daarom mogelijk functioneren als doelwit (target) moleculen voor geneesmiddelontwikkeling.

MHC-II is ook sterk gerelateerd aan de ontwikkeling van auto-immuunziekten. Waarschijnlijk is een deel van de nieuwe MHC-II regulators, die in deze studie geïdentificeerd zijn, ook betrokken zijn bij de ontwikkeling en/of voortgang van auto-immuunziekten (van sommige eiwitten die geïdentificeerd in onze screen is het verband met auto-immuunziekten al aangetoond, zie figuur 2C in hoofdstuk 3). Deze genen moeten verder onderzocht worden om de complete routes die betrokken zijn bij auto-immuunziekten op te helderen. Deze informatie zal geneesmiddelontwikkeling op basis van medicijnen, antilichamen of peptiden positief beïnvloeden. Met als doel patiënten beter te kunnen behandelen.

Als eerste stap zal het belangrijk zijn om de invloed van de downregulatie of overexpressie van de deze nieuwe MHC-II regulators op de (auto) immuun reactie van B- en T-cellen te bepalen. Het zal een uitdaging zijn om de functie van deze nieuwe regulatoren in het MHC-II antigeen presentatie proces experimenteel te verifiëren in de context van het totale immuunsysteem. Het resultaat van een relevante wijziging in de afweer tegen infecties kan het best worden bestudeerd en geanalyseerd in een muismodel. De regulatoren die een relevante invloed hebben op MHC-II antigeen presentatie en de bijbehorende afweerreactie, moeten worden onderworpen aan verdere studies. Ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen is een duur en ingewikkeld proces. Het is belangrijk om het ideale target voor ontwikkeling van geneesmiddelen te bepalen. Identificatie van de routes waarbinnen deze regulatoren functioneren, zal leiden tot meer of betere targets die gebruikt kunnen worden voor ontwikkeling van geneesmiddelen. Het beste target zal worden geselecteerd voor verdere studies. Zo levert dit onderzoek een positieve bijdrage aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.

Geneesmiddelontwikkeling kan ook worden gestart vanaf de andere kant: het screenen van grote sets van chemische stofjes, waarbij het effect op de MHC-II antigeen presentatie wordt geanalyseerd. Hierbij kunnen nieuwe leads (basis voor geneesmiddel) worden geïdentificeerd. Die moeten verder worden ontwikkeld tot

geneesmiddelen die MHC-II antigeen presentatie kunnen manipuleren. De nieuwe regulatoren, geïdentificeerd in deze studie, kunnen helpen bij het bepalen van de juiste target-lead combinatie. Dit kan het begin zijn van de ontwikkeling van een succesvol geneesmiddel. Op deze manier krijgt fundamentele wetenschappelijke kennis een toepassing in het ziekenhuis.

Enkele recente pogingen om MHC-II antigeen presentatie te manipuleren door antilichamen en / of peptiden, zijn samengevat in de inleiding van dit proefschrift. Met deze studie hopen we een basis te leggen voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen die MHC-II antigeen presentatie kunnen beïnvloeden. Dit kan van belang zijn voor de immunologische gemeenschap, omdat het ontwikkelen van geneesmiddelen begint met het begrijpen de essentiële stappen in de afweerreactie op moleculair niveau. Deze informatie zal worden vertaald naar klinische toepassingen wanneer de targets zullen worden gebruikt om leads te definiëren voor verdere geneesmiddelontwikkeling.

Referenties

Buschow, S.I., Nolte-'t Hoen, E.N., van Niel, G., Pols, M.S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C.J., Raposo, G., Wubbolts, R., *et al.* (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 10, 1528-1542.

Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 20121-20127.

Hammond, C., Denzin, L.K., Pan, M., Griffith, J.M., Geuze, H.J., and Cresswell, P. (1998). The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol* 161, 3282-3291.

Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61, 171-183.

Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L., and Geuze, H.J. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349, 669-676.

Unternaehrer, J.J., Chow, A., Pypaert, M., Inaba, K., and Mellman, I. (2007). The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 234-239.

van Rheenen, J., Langeslag, M., and Jalink, K. (2004). Correcting confocal acquisition to optimize imaging of fluorescence resonance energy transfer by sensitized emission. *Biophys J* 86, 2517-2529.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278, 10963-10972.

Zwart, W., Griekspoor, A., Kuijl, C., Marsman, M., van Rheenen, J., Janssen, H., Calafat, J., van Ham, M., Janssen, L., van Lith, M., *et al.* (2005). Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MHC and phagosome-induced immune escape. *Immunity* 22, 221-233.

