



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immunochemical approaches to monitor and modulate the adaptive immune system

Luimstra, J.J.

Citation

Luimstra, J. J. (2020, February 12). *Immunochemical approaches to monitor and modulate the adaptive immune system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/85320>

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/1887/85320>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/85320> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Luimstra, J.J.

Title: Immunochemical approaches to monitor and modulate the adaptive immune system

Issue Date: 2020-02-12



A

Nederlandse samenvatting
List of publications
Curriculum vitae
Acknowledgements

A

Nederlandse samenvatting

ADAPTIEVE IMMUNITEIT IN EEN NOTENDOP

Ons immuunsysteem is geëvolueerd om ons te beschermen tegen infectie door virussen en andere pathogenen, maar biedt tegelijkertijd ook bescherming tegen kanker door cellen die gemuteerde eiwitten tot expressie brengen te elimineren. De twee takken van het immuunsysteem werken nauw samen om bedreigingen te detecteren en te elimineren. De eerstelijnsafweer wordt verzorgd door het aspecifieke aangeboren immuunsysteem, door middel van detectie van pathogene- of tumorcel-fragmenten¹. Patroonherkenningsreceptoren op aangeboren immuuncellen kunnen pathogeen- of gevaar-geassocieerde moleculaire patronen herkennen, waaronder cel-vrij DNA, dubbelstrengs RNA of componenten van de bacteriële celwand². Daarentegen kunnen cellen van het adaptieve (verworven) immuunsysteem pathogenen of maligne cellen specifiek herkennen en hierop reageren door het scannen van kleine fragmenten van eiwitten: peptiden. Deze peptiden kunnen door major histocompatibility complex klasse I (MHC I) moleculen worden gepresenteerd op het oppervlak van alle cellen die een kern hebben, voor surveillance door cytotoxische CD8⁺ T cellen³. Deze gespecialiseerde T cellen kunnen het repertoire aan gepresenteerde peptiden scannen en het onderscheid maken tussen lichaamseigen- en niet-eigen peptiden, middels hun buitengewoon specifieke T cel receptoren (TCR's). Deze T cellen kunnen andere cellen die tekenen vertonen van infectie of mutatie direct elimineren. Op eenzelfde wijze wordt de extracellulaire ruimte gemonitord door helper T (Th), of CD4⁺, cellen, die geïnternaliseerde extracellulaire peptiden scannen die worden gepresenteerd door MHC klasse II (MHCII)⁴. Bij herkenning van dergelijke uitheemse peptiden produceren CD4⁺ T cellen cytokines die klonale expansie en activatie van B cellen induceren, die vervolgens antilichamen kunnen produceren.

TCR activatie is de eerste van de drie signalen die nodig is voor het opwekken van een effectieve adaptieve immuunrespons; voor aanhoudende activatie en proliferatie is een tweede signaal noodzakelijk, welke wordt verstrekt door costimulatie^{5,6}. Costimulatoire receptoren op het celoppervlak van T cellen worden geactiveerd door het binden van hun liganden op geactiveerde antigeen-presenterende cellen, zoals dendritische cellen. Het costimulatoire pad dat het best gekarakteriseerd is omvat CD28, een receptor die constitutief tot expressie wordt gebracht op naïeve T cellen, en zijn liganden B7-1 (CD80) en B7-2 (CD86)⁷. CD4⁺ T cellen verschaffen hulp die cruciaal is voor de maturatie van dendritische cellen en het verhogen van de expressie van B7-1 en B7-2⁵. Hoewel geactiveerde T cellen een aantal proliferatierondes kunnen doormaken wanneer costimulatie

A

plaatsvindt is een derde signaal, verstrekt door cytokines, nodig voor klonale expansie, overleving en het vormen van geheugen⁹. Afwezigheid van dit derde signaal zal uiteindelijk tot tolerantie leiden¹⁰. Voor volledig functionele CD8⁺ T cellen zijn interleukine (IL) 12 of type I interferons (IFN's) nodig, die worden geproduceerd door CD4⁺ Th cellen¹¹.

MHCI antigeen presentatie en TCR activatie

MHCI wordt in het endoplasmatisch reticulum geladen met intracellulair geproduceerde peptiden, bij voorkeur met een lengte van 8-10 aminozuren. Twee alfa-helices vormen een groef met enkele inkepingen waarin de zijketens van de aminozuren van het peptide kunnen binden¹². De peptide-MHCI bindingsaffiniteit wordt bepaald door de interacties van de zware keten van MHCI met de ruggengraat en zijketens van het peptide¹³. De TCR bindt zowel de uitstekende zijketens van het peptide als de blootliggende residuen van de alfa-helices van het MHCI. De extreme selectiviteit van de TCR zorgt ervoor dat slechts één specifieke peptide-MHCI combinatie tot activatie leidt, om zo de hoge specificiteit te waarborgen die nodig is om zelftolerantie in stand te houden en auto-immuniteit te voorkomen.

De genen die coderen voor MHCI zijn verdeeld over drie groepen; in mensen humaan leukocytenantigeen (HLA) A, B en C. Deze genen zijn zeer polymorf, wat inhoudt dat er veel variaties zijn ontstaan door DNA mutatie, recombinatie en conversie. De verkregen allotypes kunnen verschillen in één of meerdere aminozuren, voornamelijk in de peptide-bindende groef, die van invloed zijn op de geprefereerde peptide motieven¹⁴. Ieder individu erft een HLA-A, een HLA-B en een HLA-C gen van iedere ouder, met als gevolg expressie van 3 tot 6 verschillende HLA allotypes per individu. Door expressie van meerdere subtypes kunnen meerdere fragmenten van een eiwit worden gepresenteerd, om zo brede immuun bescherming te bereiken.

IMMUUNTHERAPIE

Verbeterde peptide vaccins door chemische modificatie

Ons immuunsysteem is ontzettend geavanceerd als het aankomt op het detecteren en elimineren van geïnfecteerde of getransformeerde cellen. Dit vermogen wordt dankbaar omarmd door klinici: immuuntherapieën die antivirale of antitumor responsen kunnen opwekken hebben hun effectiviteit bewezen tegen zowel infectie als kanker. Het activeren van CD8⁺ T cellen wordt beschouwd al de meest rechtlijnige aanpak, omdat een cytotoxische respons specifiek gericht op geïnfecteerde of getransformeerde cellen zal leiden tot eliminatie van alléén die cellen die het antigeen tot expressie brengen, zelfs als

deze zich op afstand van de tumor bevinden. Diverse therapeutische strategieën kunnen worden toegepast, zoals vaccinatie met antigene peptiden, antigeen-coderend RNA, dendritische cellen geladen met antigeen of zelfs met antigeen-geactiveerde cellen¹⁵. Het ontwerpen van peptide vaccins heeft de afgelopen decennia bijzonder veel interesse gewekt en hun werkzaamheid, stabiliteit en farmacokinetiek zijn uitgebreid bestudeerd. Daarnaast is peptidesynthese gemakkelijk, goedkoop en flexibel¹⁶. Peptiden op zichzelf zijn maar matig immunogeen en pogingen om de antigeniciteit van bekende epitopen te verhogen zouden klinisch voordeel kunnen bieden. Lange tijd werd een hoge peptide-MHCI affiniteit gecorreleerd aan hoge immunogeniciteit en in die lijn hebben vele studies geprobeerd de immunogeniciteit van bekende epitopen te verhogen door hun affiniteit te verhogen^{17,18}. Door de aminozuren die het peptide in de MHC verankeren te modifieren kan de affiniteit van het peptide voor zijn MHC verhoogd worden, zonder te interfereren met T cel herkenning, wat grotendeels afhangt van de centrale aminozuren¹⁹. In **Hoofdstuk 2 en 3** beschrijven wij het ontwerp en gebruik van chemisch aangepaste peptide liganden (CPL's): epitopen die niet alleen gemodificeerd zijn met natuurlijk-voorkomende aminozuren, maar ook met chemisch gemodificeerde aminozuren. Het gebruik van dergelijke synthetische aminozuren biedt een aantal voordelen bovenop de verhoogde affiniteit, zoals verhoogde resistentie tegen proteasen en verbeterde biologische beschikbaarheid^{20,21}.

Het werk beschreven in **Hoofdstuk 2** had als doel om met chemisch-gemodificeerde aminozuren de affiniteit te verbeteren van epitopen specifiek voor HLA-A*02:01, het meest voorkomende allotype in Kaukasische populaties²². De zo gecreëerde CPL's werden ingezet als therapeutisch vaccin in de context van kanker. In **Hoofdstuk 3** is een preventieve insteek onderzocht in de context van virale infectie²³. In dat hoofdstuk zijn naast HLA-A*02:01 epitopen ook CPL's ontworpen voor een tweede veelvoorkomend allel in de Kaukasische bevolking, HLA-A*03:01, met als doel een breed beschermend influenza vaccin te creëren.

Kankerimmunotherapie

Sinds in 2018 de Nobelprijs voor Fysiologie of Geneeskunde is uitgereikt aan de nieuwe ontwikkelingen in kankerimmunotherapie heeft immunotherapie veel aandacht verworven. In veel gevallen treden cytotoxische responsen tegen kanker wel op, maar door de lage affiniteit van zelfantigenen, of door tumor-geassocieerde immuun suppressie, wordt effectieve anti-tumor immuniteit verzwakt^{32,37-40}. Immunotherapie richt zich op het wegnemen van de rem op anti-tumor responsen. Huidige immunotherapieën zijn voornamelijk biologisch, maar ook chemische stoffen, zogenaamde small molecules, kunnen een waardevolle bijdrage leveren, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**.

A

HET VISUALISEREN VAN IMMUNRESPONSEN MET pMHC1 MULTIMEREN

Het monitoren van de immuun status en respons op behandeling, samen met het in kaart brengen van antigene epitopen als therapeutische doelwitten, kan helpen bij diagnose en het ontwerpen van behandelplannen. De klassieke reagentia om antigeen-specifieke T cel responsen te visualiseren en monitoren bestaan uit MHC1 moleculen geladen met relevante peptiden²⁴. Omdat de dissociatiesnelheid van pMHC1 monomeren hoog is kunnen deze moleculen worden gemultimeriseerd om sterke TCR binding te waarborgen voor verdere experimentele analyse, zoals flow cytometrie²⁵. Het vouwen van pMHC1 complexen is tijdrovend en moet voor ieder te analyseren peptide apart uitgevoerd worden. Om de doorvoer op te schalen is er een aantal peptide-uitwisselingstechnologieën ontwikkeld²⁶⁻²⁸. Door gebruik te maken van zulke technologieën kan één grote hoeveelheid conditionele pMHC1 monomeren worden gegenereerd met een peptide dat onder aanbrenging van de juiste trigger zal dissociëren. Wanneer uitgevoerd in aanwezigheid van ander peptide zal deze in het complex worden geladen. Een van de meest gebruikte uitwisselingsmethodes maakt gebruik van een fotolabel peptide dat wordt geknipt onder invloed van UV straling^{29,30}. Deze methode heeft een aantal nadelen, zoals fotoschade aan fluoroforen, eiwitten of peptiden, de vorming van reactieve groepen en verdamping van het monster door hitteontwikkeling.

Hoofdstuk 5 beschrijft een nieuwe uitwisselingstechnologie, gebaseerd op peptide-dissociatie onder invloed van temperatuur. Door het modificeren van ankerresiduen hebben wij peptiden ontworpen voor HLA-A*02:01 en voor H-2K^b, het meest bestudeerde MHC1 allel in muizen, welke kunnen worden uitgewisseld door het verhogen van de temperatuur. Een groot voordeel is dat deze methode ook toegepast kan worden op multimeren, in tegenstelling tot UV-geïnduceerde uitwisseling waarbij fluoroforen gebleekt worden. Dit verkleint de verwerkingstijd voor kleuring aanzienlijk. In **Hoofdstuk 6** wordt in een protocol stap voor stap beschreven hoe deze conditionele multimeren kunnen worden geproduceerd en gebruikt.

Vervolgens is de technologie voor het in **Hoofdstuk 7** beschreven onderzoek uitgebreid met een DNA labelingsysteem. Hiermee wordt het aantal parameters dat te meten is in één analyse aanzienlijk vermeerderd ten opzichte van fluorescente labels. Deze technologie werd als proof-of-principle screen ingezet voor het identificeren van neoantigenen als potentiële doelwitten voor kankerimmunotherapie.

REFERENTIES

1. Vivier, E. & Malissen, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* **6**, 17-21 (2005).
2. Medzhitov, R. & Janeway, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**, 89-97 (2000).
3. Rock, K.L., Reits, E. & Neefjes, J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol* **37**, 724-737 (2016).
4. Neefjes, J., Jongstra, M.L., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**, 823-836 (2011).
5. Mescher, M.F., et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* **211**, 81-92 (2006).
6. Sharpe, A.H. & Abbas, A.K. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N Engl J Med* **355**, 973-975 (2006).
7. Gross, J.A., Callas, E. & Allison, J.P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol* **149**, 380-388 (1992).
8. Croft, M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 265-273 (2003).
9. Curtsinger, J.M. & Mescher, M.F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* **22**, 333-340 (2010).
10. Curtsinger, J.M., Lins, D.C. & Mescher, M.F. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* **197**, 1141-1151 (2003).
11. Valenzuela, J., Schmidt, C. & Mescher, M. The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells. *J Immunol* **169**, 6842-6849 (2002).
12. Madden, D.R. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* **13**, 587-622 (1995).
13. Rammensee, H.G., Friede, T. & Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* **41**, 178-228 (1995).
14. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. & Rammensee, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290-296 (1991).
15. Melief, C.J. & Kast, W.M. T-cell immunotherapy of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. *Immunol Rev* **145**, 167-177 (1995).
16. Purcell, A.W., McCluskey, J. & Rossjohn, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 404-414 (2007).
17. Engels, B., et al. Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. *Cancer Cell* **23**, 516-526 (2013).
18. Tangri, S., et al. Structural features of peptide analogs of human histocompatibility leukocyte antigen class I epitopes that are more potent and immunogenic than wild-type peptide. *J Exp Med* **194**, 833-846 (2001).
19. Valmori, D., et al. Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues. *J Immunol* **160**, 1750-1758 (1998).
20. Blanchet, J.S., et al. A new generation of Melan-A/MART-1 peptides that fulfill both increased immunogenicity and high resistance to biodegradation: implication for molecular anti-melanoma immunotherapy. *J Immunol* **167**, 5852-5861 (2001).
21. Marschutz, M.K., et al. Improvement of the enzymatic stability of a cytotoxic T-lymphocyte-epitope model peptide for its oral administration. *Peptides* **23**, 1727-1733 (2002).
22. Hoppes, R., et al. Altered peptide ligands revisited: vaccine design through chemically modified HLA-A2-restricted T cell epitopes. *J Immunol* **193**, 4803-4813 (2014).
23. Rosendahl Huber, S.K., et al. Chemical Modification of Influenza CD8+ T-Cell Epitopes Enhances Their Immunogenicity Regardless of Immunodominance. *PLoS One* **11**, e0156462 (2016).
24. Altman, J.D., et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96 (1996).
25. Davis, M.M., Altman, J.D. & Newell, E.W. Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis. *Nat Rev Immunol* **11**, 551-558 (2011).

26. Saini, S.K., et al. Dipeptides catalyze rapid peptide exchange on MHC class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 202-207 (2015).
27. Amore, A., et al. Development of a hypersensitive periodate-cleavable amino acid that is methionine- and disulfide-compatible and its application in MHC exchange reagents for T cell characterisation. *Chembiochem* **14**, 123-131 (2013).
28. Rodenko, B., et al. Class I major histocompatibility complexes loaded by a periodate trigger. *J Am Chem Soc* **131**, 12305-12313 (2009).
29. Rodenko, B., et al. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc* **1**, 1120-1132 (2006).
30. Toebes, M., et al. Design and use of conditional MHC class I ligands. *Nat Med* **12**, 246-251 (2006).

