

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138854> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dijkgraaf, F.E.

Title: T cells in focus: Formation and function of tissue-resident memory

Issue date: 2021-01-12

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Wanneer een ziekteverwekker erin slaagt om een weefselbarrière te doorbreken, raken professionele antigeen presenterende cellen geactiveerd en presenteren ze fragmenten van de ziekteverwekker (antigenen) aan naïeve CD8⁺ T cellen in een lymfeklier. Zodra een antigeen-specifieke naïeve CD8⁺ T cel een antigeen van een ziekteverwekker herkent en daarnaast co-stimulatoire signalen en cytokines ontvangt, raakt deze geactiveerd. Vervolgens begint de cel zich snel te vermenigvuldigen en ontwikkelen zijn nakomelingen 'effector' capaciteiten waarmee ze de indringer kunnen opruimen in het geïnfecteerde weefsel. Wanneer de ziekteverwekker is opgeruimd, sterft het overgrote deel van de 'effector fase' CD8⁺ T cellen af omdat deze niet meer nodig zijn. Echter, een kleine populatie cellen overleeft en blijft langdurig aanwezig in het lichaam. Deze zogeheten 'memory' CD8⁺ T cellen overleven onafhankelijk van antigeen stimulatie en kunnen zichzelf snel vermenigvuldigen en 'effector' capaciteiten ontwikkelen zodra ze de ziekteverwekker weer tegenkomen. Memory CD8⁺ T cellen vormen daarmee als het ware een herinnering van alle ziekteverwekkers die het lichaam ooit is tegengekomen. Deze memory CD8⁺ T cellen circuleren niet alleen in het bloed en de interne organen, maar onderzoek van het afgelopen decennium heeft laten zien dat deze cellen ook kunnen achterblijven in het weefsel op de plek waar de ziekteverwekker is binnengedrongen. Deze zogeheten 'tissue-resident' memory CD8⁺ T cellen, afgekort T_{RM}, hebben de bloedcirculatie voorgoed verlaten en zijn nagenoeg in alle weefsels te vinden in muizen en mensen, zoals in de huid en de longen. Vanwege hun strategische locatie en hun capaciteit om snel in actie te komen, bieden CD8⁺ T_{RM} betere bescherming tegen lokale indringers dan circulerende memory CD8⁺ T cellen. Daarom is kennis over het ontstaan van deze celpopulatie en inzicht in hun gedrag binnen weefsels cruciaal voor de ontwikkeling van therapieën tegen lokale ziekteverwekkers.

In dit werk bestudeer ik het ontstaan en de functie van CD8⁺ T_{RM}. In de eerste twee hoofdstukken onderzoek ik welke genetische technieken gebruikt kunnen worden om de verschillende stappen in 'het leven van een T cel' te bestuderen (hoofdstuk 2-3). Vervolgens focus ik specifiek op CD8⁺ T_{RM} de huid, en bestudeer ik hoe naïeve CD8⁺ T cellen zich ontwikkelen tot CD8⁺ T_{RM} (hoofdstuk 4-5) en onderzoek ik via welke mechanismen deze cellen het weefsel beschermen (hoofdstuk 6-8).

Technieken om 'het leven van een T cel' te bestuderen

In **hoofdstuk 2** focussen we op zogeheten reportergenen. Dit zijn DNA fragmenten die coderen voor reportereiwitten, zoals fluorescente eiwitten, die in het genoom van cellen gebracht kunnen worden om te rapporteren voor een bepaalde gebeurtenis in de cel. In dit hoofdstuk gaan we na hoe genexpressie reporters en signaal reporters gebruikt kunnen worden om de activatie, vorming en functie van T cellen te bestuderen. We concluderen dat, zolang het ontwerp van de genetische reporters en de interpretatie van de data zorgvuldig

gebeurt, deze technieken krachtige middelen zijn om het natuurlijke gedrag van T cellen te bestuderen.

Om het gedrag van T cellen in muizen te bestuderen of te manipuleren, maken biomedische onderzoekers vaak gebruik van de bovengenoemde reportereiwitten of van 'modifier' eiwitten waarmee andere genen bijvoorbeeld aan of uit kunnen worden gezet. Echter, omdat deze eiwitten vaak afkomstig zijn van andere organismen dan de muis, bestaat er een kans dat cellen die reporter of 'modifier' eiwitten tot expressie brengen worden afgestoten door het immuunsysteem van de gastheer. Om dit probleem te omzeilen, hebben wij een nieuw genetisch gemanipuleerd muismodel ontwikkeld genaamd 'Tol'. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat deze muizenstam immunologisch tolerant is voor een serie reporter en 'modifier' eiwitten en gebruikt kan worden als ontvanger voor cellen die een van deze eiwitten tot expressie brengen. Daarnaast biedt onze methode een platform om nieuwe muismodellen te ontwikkelen die tolerant zijn voor andere eiwitten naar keuze.

De vorming van 'tissue-resident' memory CD8⁺ T cellen in de huid

In **hoofdstuk 4** bediscussiëren we de studies die de vorming van 'tissue-resident' memory CD8⁺ T cellen hebben onderzocht, en bespreken we de externe factoren die een rol spelen in dit proces. We laten zien dat het ontstaan van T_{RM} niet alleen afhankelijk is van factoren die aanwezig zijn in het geïnfecteerde weefsel, maar benadrukken dat er al vroeg in het proces factoren zijn die naïeve of geactiveerde T cellen kunnen voorbereiden op een leven in het weefsel. In **hoofdstuk 5** onderzoeken we de vraag waar en wanneer individuele CD8⁺ T cellen de capaciteit ontwikkelen om zich uiteindelijk in de huid te nestelen. Hiertoe hebben we individuele naïeve CD8⁺ T cellen voorzien van een unieke genetische code ('barcode'). Vervolgens hebben we de cellen geactiveerd door middel van een DNA vaccinatie behandeling op de huid en hebben we op verschillende tijdstippen vastgesteld waar hun nakomelingen terecht zijn gekomen. Zo hebben we ontdekt dat een subgroep CD8⁺ T cellen een verhoogde capaciteit heeft om de huid te bewonen. Dit vermogen om T_{RM} te worden blijkt al geïnstrueerd te zijn voordat de cellen de huid zijn binnengegaan en blijft bewaard na een nieuwe vaccinatie.

De beschermfunctie van 'tissue-resident' memory CD8⁺ T cellen in de huid

In **hoofdstuk 6** onderzoeken we de beschermingsmechanismen van CD8⁺ T_{RM} in de huid van muizen. We laten zien dat zodra CD8⁺ T_{RM} geactiveerd raken door antigeen, ze binnen een aantal uur onder andere het pro-inflammatoire cytokine interferon gamma (IFN γ) uitscheiden. Dit cytokine bereikt nabij- en verafgelegen huidcellen en brengt het weefsel in een antivirale en antimicrobiële toestand. Dit 'schild' beschermt de huid tegen een breed scala aan secundaire (opportunistische) infecties. Zo kan de activatie van een kleine groep

antigeen-specifieke $CD8^+ T_{RM}$ een meer algemene immuunreactie ontketenen waarbij een grote groep cellen in de omgeving betrokken is.

Om het gedrag van $CD8^+ T_{RM}$ en andere immuuncellen binnen de huid te volgen, hebben we een nieuwe *ex vivo* microscopie techniek ontwikkeld. In **hoofdstuk 7** wordt stap voor stap beschreven hoe $CD8^+$ T cellen en andere immuuncellen gevisualiseerd en gevolgd kunnen worden in huidbiopten van muis en mens. In **hoofdstuk 8** passen we deze methode toe om het migratiegedrag van $CD8^+ T_{RM}$ en andere immuuncellen te bestuderen in gezonde menselijke huidsamples. Hier laten we zien dat $CD8^+ T_{RM}$ actief migreren, ofwel patrouilleren, in de opper- en lederhuid. In de opperhuid migreren $CD8^+ T_{RM}$ in de basale laag onder een populatie van niet-bewegelijke Langerhans cellen (i.e. cellen van het aangeboren immuunsysteem). In de lederhuid bewegen $CD8^+ T_{RM}$ in gebieden waar veel of weinig collageen type I aanwezig is en migreren ze langs vaatjes. Deze *ex vivo* microscopie techniek maakt het mogelijk om het dynamische gedrag van $CD8^+ T_{RM}$ live te volgen in gezonde menselijke huid en biedt een platform om deze cellen ook te bestuderen in huidweefsel waarin een ontstekingsreactie plaatsvindt.

Conclusie en blik op de toekomst

Met dit proefschrift verschaft ik inzicht in hoe $CD8^+ T_{RM}$ ontstaan in de huid, hoe deze cellen bescherming bieden tegen infecties en hoe ze zich gedragen in gezonde menselijke huid. Ten eerste laat ik, samen met mijn collega's, zien dat $CD8^+ T_{RM}$ een andere afkomst hebben dan circulerende memory $CD8^+$ T cellen. Ten tweede laat dit werk zien dat $CD8^+ T_{RM}$ een poortwachtersfunctie vervullen, omdat ze snel hun omgeving alarmeren zodra ze een ziekteverwekker signaleren. Ten derde toon ik aan dat $CD8^+ T_{RM}$ patrouilleren in de menselijke huid. Daarnaast heb ik in samenwerking met mijn collega's twee nieuwe technieken ontwikkeld (i.e. de 'Tol' muizenstam en de *ex vivo* microscopie methode) die als zodanig of in aangepaste vorm gebruikt kunnen worden door andere biomedische onderzoekers om belangrijke aspecten van (T) cel gedrag en huidbiologie te bestuderen. Kennis over de vorming van $CD8^+ T_{RM}$, en inzichten over de functie van deze cellen in gezonde en ongezonde huid, zal cruciaal zijn om deze T cel populatie te manipuleren voor therapeutische doeleinden.

