



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Harnessing immune regulation for treatment of human diseases : CD4+CD25+ regulatory T cells & antibody glycosylation

Wang, J.

Citation

Wang, J. (2011, March 15). *Harnessing immune regulation for treatment of human diseases : CD4+CD25+ regulatory T cells & antibody glycosylation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16626>

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/1887/16626>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

1. Regulaire T-cellen

Het afweersysteem wordt gekenmerkt door een delicate tussen balans het verwijderen van schadelijke, “lichaamsvreemde” binnendringers en tolerantie tegen ongevaarlijke of lichaamseigen antigenen. Een verstoring van deze balans in een bepaalde richting kan bijvoorbeeld resulteren in uitgroei van tumoren en chronische infecties veroorzaakt door verstoorde afweerreacties, of auto-immuunziektes of weefselschade door ongewenste of overmatige afweerreacties. Behalve regulatoire mechanismen in de thymus en beenmerg, spelen verschillende celtypen in de periferie, zoals T- en B-lymfocyten en dendritische cellen (DCs) een belangrijke rol in het behouden van een goede balans. $CD4^+CD25^+$ regulatoire T cellen (Treg cellen) zijn in de afgelopen 2 decennia uitgebreid bestudeerd, omdat deze cellen belangrijke regulatoire eigenschappen bezitten. Ze kunnen het gewicht aan de ene kant van de balans verhogen door het bevorderen van tolerantie tegen lichaamseigen antigenen. Aan de andere kant van de balans kunnen ze het gewicht verlagen door het voorkomen van overmatige afweerreacties tegen lichaamsvreemde antigenen. Verstoring van het aantal of de functies van Treg cellen, gedefinieerd als T-cellen met expressie van CD25 en/of FOXP3, is gerapporteerd in patiënten met uiteenlopende ziektes. Anderen observeerden dit niet.

Onderzoek naar humaan FOXP3 toont aan dat FOXP3 tot expressie komt in geactiveerde conventionele T-cellen. Deze expressie is geassocieerd met het verkrijgen van een regulatoire functie van de T-cel populatie. Echter, met inachtneming van onze eerdere bevindingen dat humane Th1-cel klonen ook FOXP3 mRNA opreguleren na activatie, redeneerden we dat de endogene expressie van FOXP3 als zodanig in de mens niet specifiek is voor Treg cellen. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 2** onderzoek gedaan naar de dynamiek van endogene FOXP3 expressie en de relatie met de suppressieve functie in geactiveerde humane T-cellen op single-cell niveau door gebruik te maken van recent ontwikkelde FOXP3-specifieke antilichamen. Uit onze experimenten kwam naar voren dat, na *in vitro* stimulatie van humane $CD4^+CD25^+$ cellen, FOXP3 tot expressie komt in een hoog percentage geactiveerde T-cellen. Hoewel FOXP3 expressie in geactiveerde T-cellen in alle geteste donoren geassocieerd is met een verlaagde gevoeligheid en met verminderde cytokine productie na TCR-gemedieerde restimulatie, is er geen directe correlatie met hun suppressieve eigenschappen aangezien het in 6 van de 9 geteste individuen kortstondig tot expressie gebracht wordt in geactiveerde niet-suppressieve T-cellen. In geactiveerde T-cellen met een suppressieve functie én in geïsoleerde $CD4^+CD25^{++}$ Treg cellen daarentegen, wordt FOXP3 stabiel tot expressie gebracht. Onze data toont dus aan dat expressie van endogeen FOXP3 in de mens niet voldoende is voor het induceren van regulatoire T-cel activiteit en dat het niet voldoende is voor het identificeren van Tregs.

Onze bevindingen over het niet specifiek zijn van FOXP3 impliceren dat de tegenstrijdige data over de functie van geïsoleerde CD^+CD25^+ of $CD4^+CD45^{++}$ T-cellen in patiënten met infectieziektes mogelijk gerelateerd is aan “besmetting” met niet-regulatoire FOXP3⁺ cellen. Daarom hebben we ons in **Hoofdstuk 3** gericht op het definiëren van oppervlakte markers voor het identificeren en verrijken van Tregs met een maximaal regulerend vermogen binnen het $CD4^+CD25^{++}$ T-cel compartiment. In het licht van eerdere publicaties, waaruit blijkt dat anti-TNF α therapie de suppressieve capaciteit van $CD4^+CD25^+$ T-cellen in RA patienten kan versterken, en dat mTNF α expresserende T-cellen, zowel *in vitro* als *in vivo*, gedepleteerd kunnen worden door antilichamen gericht tegen TNF α , formuleerden we de hypothese dat de expressie van mTNF α gebruikt kan worden om onderscheid te maken tussen $CD4^+CD25^{++}$ cellen met of zonder suppressieve

functie. We toonden aan dat een groot aantal $CD4^+CD25^{++}$ T-cellen mTNF α tot expressie brengen. mTNF α^+ $CD4^+CD25^{++}$ T-cellen hebben een verlaagde productie van anti-inflammatoire cytokines en een minder uitgesproken suppressieve capaciteit. Bovendien toont onze data dat behandeling van RA patiënten met TNF α -specifieke antilichamen resulteert in een verlaging van mTNF α^+ $CD4^+CD25^{++}$ T-cellen in perifeer bloed. Deze data impliceert dat de afwezigheid van mTNF α op $CD4^+CD25^{++}$ T-cellen gebruikt kan worden om Treg cellen met een maximale suppressieve capaciteit te karakteriseren en te verrijken. De data impliceert verder dat een verrijking van mTNF $\alpha^-CD4^+CD25^{++}$ T-cellen in het $CD4^+CD25^{++}$ T-cel compartiment bij kan dragen aan een herstel van het suppressieve vermogen van $CD4^+CD25^{++}$ T-cel populaties in RA patiënten na anti-TNF α therapie.

Adoptieve overdracht van $CD4^+CD25^+$ Treg cellen is met succes gebruikt in verschillende diermodellen van afstotingsreacties en auto-immuunziekten. Treg cel gebaseerde immuuntherapie werd echter gehinderd in de kliniek door moeilijkheden met het verkrijgen van homogene Treg populaties met een stabiele en potente suppressieve functie door het ontbreken van specifieke markers voor het isoleren en karakteriseren van Treg cellen. Het klinisch gebruiken van een geëxpandeerde “Treg” populatie wordt verder bemoeilijkt doordat *ex vivo* geïsoleerde Treg cellen uit patiënten mogelijk een verstoorde functie hebben en/of doordat “niet-verstoorde” Treg cellen geïsoleerd uit gezonde donoren tijdens het *in vitro* expanderen redifferentiëren naar IL-17 producerende cellen. Geïnspireerd door recent onderzoek naar de rol van all-*trans* retinoic acid (ATRA) in de inductie van muizen Tregs, hebben we onderzoek gedaan naar het effect van ATRA op de *in vitro* conversie van Tregs van conventionele effector cellen en naar de expansie van geïsoleerde $CD4^+CD25^{++}$ T-cellen in de mens. De resultaten van deze studies zijn beschreven in **Hoofdstuk 4**. We vonden dat ATRA in combinatie met TGF- β efficiënt naïeve $CD4^+$ T-cellen uit humaan perifeer bloed kan converteren naar FOXP3 $^+$ Tregs met een stabiele en sterke suppressieve capaciteit. Verder vergroot stimulatie van geïsoleerde $CD4^+CD25^{++}$ T-cellen met ATRA/TGF- β hun suppressieve potentieel tijdens expansie. We vonden echter ook dat $CD4^+$ T-geheugencellen niet alleen resistent zijn tegen FOXP3 inductie, maar ook T-reg conversie van naïeve T-cellen remmen, deels door productie van IL-4. Dit negatieve effect van geheugencellen op Treg inductie kan niet omgekeerd worden door ATRA, hetgeen resulteert in een inconsistente inductie van Tregs vanuit $CD4^+CD25^-$ cellen in verschillende donoren.

Verschillend onderzoek, voornamelijk in C57BL/6 (B6) muizen, heeft laten zien dat ATRA TGF- β geïnduceerde generatie van Treg cellen kan versterken *via* verschillende mechanismen. Het effect is of direct op naïeve cellen door het versterken van de TGF- β signaleringsroute, of indirect *via* geheugencellen door het verminderen van hun cytokine secretie. Geïntrigeerd door onze humane data behandeld in **Hoofdstuk 4** waaruit blijkt dat er sprake is van een inconsistente inductie van Tregs door TGF- β en ATRA van $CD4^+CD25^-$ cellen, deels door IL-4 geproduceerd door geheugencellen, wilden we onderzoeken of de eerdergenoemde bevindingen opgedaan in B6 muizen geëxtrapoleerd kunnen worden naar andere veelgebruikte muisstammen. Verder wilden we, wanneer er verschillen tussen de stammen bestaan, nagaan, welke onderliggende mechanismen verantwoordelijk zijn en of deze verschillen overwonnen kunnen worden door manipulatie van de verantwoordelijke routes. Onze data, behandeld in **Hoofdstuk 5**, laat zien dat, hoewel gezuiverde naïeve cellen zeer gevoelig zijn voor conversie naar Tregs, de totale $CD4^+$ T-cel populatie in verschillende muizenstammen significant verschilt met betrekking tot gevoeligheid voor TGF- β /ATRA-geïnduceerde Treg conversie. De resistentie van “niet-reagerende” stammen is geassocieerd met een verhoogde productie van IL-4 door T-geheugencellen en een verhoogde sensitiviteit van naïeve T-cellen op IL-4. Neutralisatie

van IL-4 laat de verschillen tussen de stammen verdwijnen en geeft TGF- β /ATRA de mogelijkheid om grote aantallen functionele Treg cellen te genereren vanuit de totale CD4⁺ T-cel populatie op een consistente wijze in de verschillende stammen. Deze resultaten laten zien dat de geërfde resistentie van “niet-reagerende” muizenstammen tegen TGF- β /ATRA geïnduceerde Treg conversie te niet gedaan kan worden door neutralisatie van IL-4 geneutraliseerd wordt, en bieden hoop voor het extrapoleren van deze resultaten naar een humane setting.

2. Glycosylatie van IgG

Het is vastgesteld dat effector functies van IgG niet alleen beïnvloed worden door de aminozuursequentie van de constante regio, maar ook door koolhydraatstructuren verbonden met het residu asparagine 297 (Asn297) in het C γ 2 domein van elk IgG Fc gedeelte. Verder hebben patiënten met inflammatoire aandoeningen (bijvoorbeeld RA) een duidelijk verschillend glycaanprofiel van serum IgG vergeleken met die van gezonde individuen, en de glycosylatie patronen zijn mogelijk ook geassocieerd met ziekte activiteit, wat mogelijk aangeeft dat dit relevant is voor de pathogenese. Echter, er is weinig bekend over het glycosyleringsprofiel van specifieke antilichamen betrokken bij de pathogenese, bijvoorbeeld autoantistoffen bij auto-immuunziekten. Dit komt doordat in de meeste studies gebruik is gemaakt van totaal IgG. In **Hoofdstuk 6** hebben we een methode ontwikkeld om anti-gecitrullineerde peptide antilichamen (ACPA) te zuiveren en om Fc-glycosylatie te analyseren. ACPA zijn autoantistoffen die gevonden worden in RA patiënten en ze zijn geassocieerd met een versnelde ziekte progressie.

Met de methode beschreven in **Hoofdstuk 6**, hebben we recent aangetoond dat in RA het glycaanprofiel van ACPA aanzienlijk verschilt van het totale serum IgG. Verder heeft autoreactief, maar niet totaal IgG, aanwezig in lokale ontstekingsgebieden een nog sterkere verlaging van galactosylatie en sialylatie niveaus, vergeleken met serum. Ook is het interessant dat actieve immunisatie in muizen bij voorkeur de sialylatie van antigeen-specifiek IgG reduceert. Samen impliceren deze bevindingen dat glycosylering van IgG in de loop van een immuunreactie gereguleerd is op een antigeen-specifieke manier. Geïnspireerd door deze data wilden we omgevingsfactoren identificeren die aanwezig zijn tijdens B-cel activatie en die van invloed zouden kunnen zijn op het glycaanprofiel van gesecreteerd IgG door gebruik te maken van een *in vitro* B-cel kweekstelsel. De resultaten van deze inspanningen zijn beschreven in **Hoofdstuk 7**. Onze data laat zien dat behandeling van B-cellen met IL-21 en CpG de IgG1 Fc gelinkte galactosylatie en sialylatie niveaus significant verhoogd, terwijl het toevoegen van ATRA een omgekeerd effect heeft. Verder reduceert IL-21 en CpG de incidentie van IgG1 met een zogenaamd bisecting GlcNAc. Deze effecten leken stabiel en specifiek voor immunoglobulines aangezien geen significante veranderingen in de algehele glycovormen van cellulaire eiwitten konden worden waargenomen. Verder was het intrigerend dat er geen significante veranderingen waarneembaar waren in de algehele glycosyleringsprofielen van cellulaire eiwitten tussen de verschillende kweekcondities. Samen toont deze data aan dat factoren in de micro-omgeving aanwezig tijdens activatie van B-cellen en tijdens differentiatie van B-cellen naar antilichaam-secreterende cellen (ASCs) de koolhydraatstructuren van gesecreteerd IgG moduleren zonder dat ze een effect hebben op het cellulaire glycosyleringsapparaat. Onze studie kan daarom ons begrip van de regulering van IgG glycosylatie op cellulair niveau onder verschillende omstandigheden verder vergroten.