



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Shaping innate immune responses: mechanisms that control type I interferon production

Oosenbrug, T.

Citation

Oosenbrug, T. (2023, January 12). *Shaping innate immune responses: mechanisms that control type I interferon production*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3512199>

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/1887/3512199>

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

A

Addendum

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Acknowledgements (Dankwoord)

NEDERLANDSE SAMENVATTING

“Vormgeven van aangeboren immuunresponsen: mechanismen die de productie van type I interferonen dirigeren”

Type I interferonen (IFN-I) vormen een belangrijke familie van cytokinen, bestaande uit onder andere verschillende IFN- α subtypen en IFN- β . IFN-I vervullen veelzijdige functies binnen het aangeboren immuunsysteem en spelen een belangrijke rol in de verdediging tegen binnendringende micro-organismen en kanker.

Wanneer cellen IFN-I eiwit produceren, wordt het eiwit uitgescheiden. Vervolgens kan IFN-I binden met de IFN- α/β receptor (IFNAR) wat aanwezig is op het celoppervlak van vrijwel alle celtypes. Hierdoor kan IFN-I effecten uitoefenen op zowel de IFN-I-producerende cel (autocrien effect) als op naburige cellen (paracrien effect). Activatie van de IFNAR bewerkstelligt de inductie van honderden IFN-gestimuleerde genen, waarvan veel van de genproducten direct betrokken zijn bij antimicrobiële processen. IFNAR-activiteit zorgt ook voor het remmen van celproliferatie en de stimulatie van celdood via apoptose. Hierdoor kunnen geïnfecteerde- en kankercellen effectief worden bestreden. Ook spelen IFN-I een belangrijke rol in het aantrekken en activeren van verschillende soorten immuun cellen. Vanwege de vele gunstige effecten van IFN-I, richten therapieën zich frequent op het induceren of bijsturen van IFN-I responsen. Denk hierbij aan antivirale medicijnen, adjuvans voor vaccins en anti-kanker medicijnen.

IFN-I zijn echter alleen gunstig voor immuunreacties als de hoeveelheid en duur van IFN-I productie juist gereguleerd is. Overmatige of chronische IFN-I productie kan leiden tot ernstige (weefsel)schade, zoals zichtbaar in verscheidene auto-immuun en auto-inflammatoire ziektes die gekenmerkt worden door constante IFN-I productie. Ook kan constitutieve IFN-I productie de activiteit of effectiviteit het immuunsysteem tijdens chronische vormen van virale infectie en kanker remmen. Voor een optimale immuunrespons is het dus belangrijk om de aanmaak van IFN-I goed te reguleren.

Cellen beschikken over een veelvoud van mechanismes om de productie van IFN-I mee te initiëren en reguleren. Het is belangrijk om deze moleculaire mechanismen gedetailleerd in kaart te brengen, om te kunnen begrijpen waarom de aanmaak van IFN-I in specifieke gevallen ontregelt raakt en om te bepalen hoe afwijkende IFN-I responsen (zowel te zwakke als te sterke responsen) therapeutisch bijgestuurd kunnen worden. De doelstelling van de experimenten beschreven in dit proefschrift was om vooralsnog onbekende moleculaire mechanismen die bijdragen aan de productie van IFN-I te ontrafelen.

In **hoofdstukken 2 t/m 4** focussen we op IFN-I productie via een familie van membraangebonden patroonherkenningsreceptoren, genaamd de Toll-like receptoren (TLRs). TLRs spelen een centrale rol in het aangeboren immuunsysteem: ze zijn aanwezig op of in cellen en tasten de omgeving af voor tekenen van infectie. Dit doen de TLRs door geconserveerde moleculaire patronen te detecteren die aanwezig zijn op micro-organismen maar niet op humane cellen (dit noemen we liganden voor de receptor). Activatie van een TLR door middel van binding met een ligand, induceert cellulaire signaaltransductieroutes die uiteindelijk resulteren in de productie van verschillende cytokinen en chemokinen. Meerdere TLRs kunnen de productie van IFN-I induceren, maar of en de mate waarin ze dit doen hangt sterk af van het soort TLR en het bestudeerde celtype.

In **hoofdstuk 2** geven we voor verschillende TLRs een overzicht van hoe de signaaltransductie die leidt tot IFN-I productie (o.a. via welke eiwitten) plaatsvindt in cellen. Hierbij lichten we toe hoe synthetische TLR-liganden hebben bijgedragen aan het ontcijferen van de werking van TLRs. Ook bediscussiëren we recente bevindingen waaruit is gebleken dat de signaaltransductie via specifieke TLRs en in bepaalde celtypen in de tijd en ruimte reguleert wordt, wat mogelijkheden biedt voor cellen om de mate van IFN-I productie te reguleren. We leggen dit concept uit aan de hand van TLR4-signalering in macrofagen. In deze cellen induceert TLR4 de signalen die leiden tot NF- κ B-afhankelijke productie van inflammatoire cytokinen vanaf het plasmamembraan, terwijl de signalen die leiden tot IFN-I productie worden geïnduceerd nadat de receptor is geïnternaliseerd in endosomen. Vervolgens behandelen we een soortgelijke dynamische regulatie van signalering via TLR2 en TLR9, met als kanttekening dat de moleculaire inzichten hiervan enkel zijn verkregen met behulp van muizencellen. Ten slotte stippen we aan dat voor de verdere opheldering van tijdruimtelijke aspecten van TLR-signalering er een groeiende vraag is naar nieuwe chemische reagentia waarmee de activiteit van TLRs conditioneel gereguleerd kan worden.

In **hoofdstuk 3** bestuderen we of het mogelijk is om de activiteit van TLR2 conditioneel te reguleren met “klik-om-los-te-laten” chemie. We modificeren een synthetisch TLR2 ligand met een verwijderbare chemische groep genaamd “*trans*-cyclooctene” (TCO) en tonen aan dat het resulterende reagens niet in staat is om TLR2-signalering te induceren in muizen- en humane cellen. Met een reagens genaamd “tetrazine”, kan de TCO-groep worden verwijderd om zo het TLR2 ligand te bevrijden. We tonen experimenteel aan dat hiermee de activiteit van TLR2 conditioneel en bijna onmiddellijk geïnduceerd kan worden in cellen die voorbehandeld zijn met het TCO-gemodificeerde ligand. We concluderen dat “klik-om-los-te-laten” chemie een uitermate geschikte methode is om de activiteit van TLR2 conditioneel mee te reguleren. Ten slotte bespreken we hoe

deze vorm van chemie mogelijk verder ontwikkeld kan worden om ruimtelijke controle uit te kunnen voeren, wat het ophelderen van tijdruimtelijke aspecten van TLR2 signalering zal vergemakkelijken.

Ondanks dat er indicaties waren dat de activatie van TLR2 op muizen myeloïde cellen kan leiden tot de productie van IFN-I en dat de signalering hiertoe in een tijdruimtelijke manier gereguleerd wordt, was het onduidelijk of, en zo ja, hoe humaan TLR2 de productie van IFN-I kan initiëren. In **hoofdstuk 4**, tonen we aan dat de stimulatie van humane monocyt-achtige cellen met verscheidene TLR2 liganden in de productie van een gematigde hoeveelheid IFN- β resulteert. Vervolgens ontrafelen we moleculaire mechanismen waarmee deze productie wordt geïnduceerd. Tot onze verassing kan de signalering die zorgt voor IFN-I productie geïnitieerd worden vanaf het celoppervlak (net als de signalering die zorgt voor activatie van NF- κ B). Hieruit blijkt dat de uitkomst van TLR2 signalering niet zo strikt is uitgesplitst over verschillende cellulaire lokalisaties als het geval is voor TLR4 signalering in macrofagen. Ook identificeren we dat hoewel monocyt-achtige cellen IFN-I produceren ten gevolge van TLR2 stimulatie, macrofaag-achtige cellen dit niet doen. Macrofagen zijn in wezen gedifferentieerde monocyten. Daarom concluderen we dat de uitkomst van TLR-signalering niet alleen afhangt van het celtype, maar ook van de differentiatie status van een gegeven cel.

In **hoofdstuk 5**, bestuderen we mechanismen die invloed hebben op de productie van IFN-I door tumorcellen die geïnfecteerd zijn met reovirus. Reovirus is een virus dat van nature tumorcellen infecteert en dood. Dit kan mogelijk therapeutisch worden ingezet als zogenaamde oncolytische virotherapie. Hoewel de IFN-I productie een remmend effect heeft op de replicatie en spreiding van reovirus, kan het toch bijdragen aan het therapeutisch effect van oncolytische virotherapie. Dit omdat IFN-I zowel directe antitumorale effecten uitoefenen als bijdragen aan het opzetten van potente anti-kanker immuunresponsen. We tonen aan dat getransformeerde (oftewel kankerachtige) humane myeloïde cellen geïnfecteerd kunnen worden door reovirus en merken dat – vergelijkbaar met onze bevindingen in hoofdstuk 4 – de differentiatie status van deze cellen uitmaakt voor de inductie van IFN-I. Echter, hier zien we een tegenovergesteld effect: alleen reovirus-geïnfecteerde macrofaag-achtige cellen produceren IFN-I. Middels deze cellen tonen we aan dat zowel virale replicatie als signalering via de IFNAR belangrijke rollen spelen in het opzetten van reovirus-geïnduceerde IFN-I productie. Beiden versterken de activiteit van IRF3, een transcriptiefactor die belangrijk is voor de expressie van IFN-I genen. Aangezien de IFNAR normaliter geactiveerd wordt na de initiële productie van IFN-I, stellen we een positief terugkoppelingsmodel voor waarin IFN-gestimuleerde genen de verdere productie van IFN-I bevorderen. Tumorcellen verstoren frequent de activiteit van de IFNAR om hun eigen overleving te bevorderen. Wij stellen voor

dat zulke IFNAR-deficiënte tumoren mogelijk extra therapeutische interventie nodig hebben om de productie van IFN-I ten gevolge van reovirus infectie te bevorderen.

In **hoofdstuk 6** worden de belangrijkste bevindingen samengevat en bediscussieerd in een bredere context. Onder andere wordt besproken hoe TLR2-geïnduceerde IFN-I productie mogelijk kan bijdragen aan de verdediging tegen microben en hoe verdere chemische ontwikkelingen kunnen bijdragen aan het bestuderen van mechanismen die resulteren in IFN-I productie. Ook bespreken we mogelijke mechanistische verklaringen voor de verschillen in IFN-I productie die we hebben gedetecteerd tussen monocyt- en macrofaag-achtige cellen na stimulatie met diverse liganden.

Het is overduidelijk dat cellen een veelvoud van moleculaire mechanismen hebben ontwikkeld om de productie van IFN-I mee te reguleren. Dit benadrukt het belang van de juiste regulatie van deze potente, maar mogelijk schadelijke, cytokinen. De bevindingen die beschreven staan in dit proefschrift dragen bij aan ons toenemende begrip van hoe IFN-I responsen worden opgezet en gereguleerd. Deze kennis vormt de benodigde basis voor de ontwikkeling van gerichte therapieën waarmee IFN-I responsen naar behoefte versterkt of afgezwakt kunnen worden, om optimale bescherming tegen pathogenen of kanker te induceren en tegelijkertijd schadelijke effecten te beperken.