



Universiteit
Leiden
The Netherlands

An engineering approach to decode immune responses

Bresser, K.

Citation

Bresser, K. (2023, November 15). *An engineering approach to decode immune responses*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3663147>

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/1887/3663147>

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

Nederlandse samenvatting

Naar mijn (wellicht wat subjectieve) oordeel, is het immuunsysteem het meest fascinerende onderdeel van het lichaam. Dit systeem bestaat uit vele cel typen en een onwaarschijnlijk grote hoeveelheid interacties en processen, die allen het gevolg zijn van een eeuwenoude evolutionaire wapenwedloop met de ziekteverwekkers om ons heen. Tijdens het samenstellen van dit proefschrift heb ik het genoeg gehad om verschillende componenten van het immuunsysteem te bestuderen, en bijdragen te leveren aan diverse onderwerpen binnen de immunologie. Middels deze samenvatting zal ik wat algemene achtergrondinformatie geven over het immuunsysteem, en vervolgens het onderwerp en de bevindingen van elk hoofdstuk kort toelichten.

De centrale taak van het immuunsysteem is om 'lichaamsvreemde entiteiten' die potentieel schadelijk zijn voor het lichaam op te sporen en vervolgens te vernietigen. Het opsporen en herkennen van pathogenen (i.e., ziekteverwekkers zoals bacteriën of parasieten) is gebaseerd op het algemene principe dat deze organismen er anders uitzien dan wij. De herkenning van zulke 'lichaamsvreemdheid' gebeurt overwegend op twee manieren: (1) Een relatief *aspecifieke* manier, waarbij een grote groep immuun cellen is betrokken die collectief het 'angeboren' immuunsysteem genoemd wordt. Deze cellen herkennen vaak algemene patronen die geassocieerd zijn met pathogenen, bijvoorbeeld bepaalde suikerverbindingen die uitsluitend door een grote familie van bacteriën worden geproduceerd en dus lichaamsvreemd zijn voor mensen. (2) Een *specifieke* manier, waarbij er primair een rol is voor de T en B cellen, die gezamenlijk de 'adaptieve' tak van het immuunsysteem vormen. Deze T en B cellen kunnen lichaamsvreemde eiwitten herkennen via speciale eiwitten die aanwezig zijn op hun celmembraan, respectievelijk de zogenaamde T en B cel receptoren. Tijdens de ontwikkeling van T en B cellen worden deze receptoren via een semi-willekeurig proces samengesteld, waardoor elke nieuwe T of B cel een unieke receptor verkrijgt. Door dit proces van diversificatie is er tijdens een infectie altijd wel minstens één T en B cel in het lichaam die het vermogen heeft een eiwit (of een fragment van een eiwit) van het desbetreffende pathogeen te herkennen. Zodra deze pathogeenspecifieke cellen hun doelwit herkennen neemt de activiteit van deze cellen sterk toe en beginnen de cellen in een hoog tempo te delen om zo een grote hoeveel dochtercellen te genereren welke allen—op een doelgerichte manier—het pathogeen kunnen aanvallen: B cellen doen dit laatste via de productie van antilichamen, en T cellen door de productie van cytotoxische moleculen of stoffen die andere cellen alarmeren voor het aanwezige gevaar. Uiteindelijk wordt, in de meeste gevallen, de lichaamsvreemde entiteit verslagen en opgeruimd door een gecoördineerde samenwerking tussen de vele cellen die opereren in deze twee takken van het immuunsysteem.

Omzeilen van herkenning door het immuunsysteem

De herkenning van lichaamsvreemde eiwitten—en de daaropvolgende afstoting—door het

immuunsysteem is normaliter een groot goed. In de biomedische wetenschap kunnen dit soort immuunreacties echter onwenselijk zijn. Een relevant voorbeeld hiervan zijn studies waarin het ‘natuurlijke gedrag’ van celtypen wordt onderzocht met behulp van fluorescente eiwitten. In dit soort experimenten worden cellen vaak bestudeerd in de context van een levend organisme, zoals de muis (*Mus musculus*), waarbij het cruciaal is dat de cellen van interesse goed kunnen worden onderscheiden van alle andere cellen in het lichaam. De oplossing die hiervoor over het algemeen wordt toegepast is om de cellen die bestudeerd worden te markeren met een fluorescent eiwit. Dit wordt gedaan door een gen dat codeert voor een fluorescent eiwit—vaak afkomstig van een kwal of koraal—in te brengen in het DNA van de cellen van interesse, waarna deze cellen zelf dit eiwit gaan produceren. Na deze genetische modificatie kunnen de cellen makkelijk onderscheiden worden van andere cellen op grond van hun fluorescentie. Een fundamenteel probleem bij deze methode is dat als dit type genetisch gemodificeerde cellen naar een muis met een competent immuunsysteem worden getransplanteerd, deze cellen vaak afgestoten worden. Niet geheel onverwacht, aangezien de gemodificeerde cellen nu een grote hoeveelheid lichaamsvreemd eiwit (b.v. afkomstig van een kwal) bevatten. Om deze reden zijn een groot aantal type experimenten moeilijk uit te voeren of geheel onmogelijk.

In **hoofdstuk 2** hebben wij een nieuw type genetisch gemodificeerde ‘transgene’ muis gecreëerd om dit probleem op te lossen. In onze aanpak zijn we uitgegaan van de volgende redenering: De gemodificeerde cellen worden afgestoten omdat het fluorescente eiwit lichaamsvreemd is. Door ervoor zorgen dat dit eiwit al vanaf de geboorte aanwezig is zal het als lichaamseigen herkend worden, en zal afstoting worden voorkomen. Om dit te bereiken hebben we de genetische code van verschillende fluorescente eiwitten ingebracht in het DNA van embryonale stamcellen van een muis, die we vervolgens hebben gebruikt om een transgene muis te creëren. Omdat we vanzelfsprekend niet wilden dat alle cellen in dit dier fluorescent zouden worden, hebben we de genetische code van de ingebrachte genen zo aangepast dat deze niet meer functioneel zijn. Deze methode staat beschreven in **hoofdstuk 2**. In dit hoofdstuk laten we vervolgens zien dat de transgene dieren inderdaad tolerant zijn geworden voor een aantal fluorescente eiwitten, waardoor cellen die met deze fluorescente eiwitten gemarkeerd zijn zonder problemen getransplanteerd kunnen worden. Deze transgene muizen stam hebben we beschikbaar gesteld aan de academische gemeenschap.

Het ‘uiterlijk’ van een cel voorspellen

Alle eiwitten in een cel hebben een bepaalde levensduur, waarna ze worden afgebroken in kleinere fragmenten, ook wel peptiden genoemd. Een groot deel van deze peptiden wordt verder afgebroken tot losse aminozuren, voor hergebruik in nieuwe cellulaire processen. Een kleiner deel wordt echter gebonden aan een gespecialiseerd eiwit genaamd HLA (Human Leukocyte Antigen) klasse I en uiteindelijk vervoerd naar het cel oppervlakte om gepresenteerd te worden aan het immuunsysteem. Cytotoxische T cellen scannen continu HLA-klasse I-peptiden complexen op het oppervlak van cellen met hun T cel receptor, en houden op deze manier in de gaten of er iets mis is met de cel. Wanneer cellen bijvoorbeeld geïnfecteerd zijn door een virus of als er gemuteerde eiwitten aanwezig zijn (zoals het geval is bij veel kankers), dan zullen er lichaamsvreemde peptiden gepresenteerd

worden. Deze lichaamsvreemde peptiden kunnen vervolgens door een T cel herkend worden, waarna de T cel geactiveerd raakt en de aangetaste cellen kan gaan opruimen.

In **hoofdstuk 3** hebben we meer inzicht verkregen in het proces van peptide presentatie door direct te meten welke peptiden gebonden waren aan HLA klasse I in een aantal verschillende melanoomlijnen. Middels deze data konden we genen (en eiwitten) vergelijken die al dan niet HLA-gebonden peptiden opleverden, met behulp van een grote database met gen- en eiwitkenmerken. Deze database bevatte meer dan 7.000 kenmerken, waaronder de frequentie van bepaalde motieven in de DNA-sequentie en mogelijke eiwitmodificaties. Met deze analyse hebben we vastgesteld dat genen (en eiwitten) waarvan gepresenteerde peptiden afkomstig zijn, vaak bepaalde kenmerken bevatten of juist missen. We vonden bijvoorbeeld dat aminozuur sequenties die gemodificeerd kunnen worden met een acetyl- of ubiquitine-groep verrijkt zijn in eiwitten die gepresenteerde peptiden bevatte. Vervolgens hebben we de database met eiwit- en gen-kenmerken opgenomen in een algoritme dat we hebben getraind om HLA klasse I gepresenteerde peptiden te voorspellen. Ten slotte konden we aantonen dat het incorporeren van deze informatie de voorspellende waarde van dergelijke algoritmen sterk verbeterde.

De rol van slapende T cellen in immunologisch geheugen

Op het moment dat een T cel gedurende een infectie geactiveerd raakt, gaat deze in een snel tempo delen. Het doel van dit proces is om een grote hoeveelheid dochtercellen te creëren die allen dezelfde T cel receptor tot expressie brengen, en dus allen specifiek de geïnfecteerde cellen kunnen herkennen en aanvallen. Als de infectie succesvol is afgeweerd sterft het overgrote deel van deze 'effector T cellen' af, ze zijn niet meer nodig. Een fractie van de pathogeen-specifieke T cellen blijft gedurende vele jaren aanwezig in het lichaam als een relatief stabiele populatie. Deze 'geheugen T cellen' kunnen tijdens een her-infectie veel sneller opnieuw een nieuwe golf effector T cellen genereren, en bieden het lichaam hierdoor langdurige bescherming tegen het desbetreffende pathogeen. Dit principe staat bijvoorbeeld centraal in de werking van vaccinatie, en om deze reden is de vorming en werking van geheugen T cellen een breed bestudeerd onderwerp in de immunologie.

Zoals hierboven opgemerkt, is celdeling een belangrijk kenmerk van de T-celrespons; er is echter weinig bekend over de relatie tussen proliferatie tijdens een infectie en de vorming van geheugen T cellen. Om dit proces te bestuderen hebben we in **hoofdstuk 4** een synthetisch transgeen construct (genaamd DivisionRecorder) ontwikkeld dat gebruikt kan worden om celdelingen te meten. De DivisionRecorder bevat een inactief gen dat codeert voor een fluorescerend eiwit. Dit gen is zodanig ontworpen dat er tijdens elke celdeling een kleine kans is dat het gen wordt geactiveerd, waardoor de cel onomkeerbaar fluorescent wordt. Dit betekent dat we de fractie fluorescente cellen binnen een populatie konden gebruiken als maat voor de hoeveelheid proliferatie die in het verleden had plaatsgevonden. Door middel van deze methode konden we relatieve bepalingen uitvoeren van de hoeveelheid celdelingen die verschillende groepen T cellen hadden ondergaan tijdens en na een infectie. Uit deze data werd duidelijk dat er een grote mate van heterogeniteit is in de hoeveelheid celdelingen die geheugen T cellen hebben ondergaan, en tevens vonden we dat deze heterogeniteit

geassocieerd was met specifieke karakteristieken. Zo vonden we dat er een groep geheugen T cellen bestaat die weinig celdelingen hebben ondergaan gedurende de immuunrespons. Deze ‘slapende’ geheugen T cellen bleken het hoogste potentieel te bezitten om tijdens een her-infectie opnieuw in snel tempo te gaan delen, wat deze cellen cruciaal maakt voor het immunologische geheugen.

Tumoren op scherp zetten

Net als ziekteverwekkers kunnen kankercellen door het immuunsysteem als lichaamsvreemd worden herkend. Tijdens de ontwikkeling van een tumor wordt deze ‘geïnfiltreerd’ door veel verschillende soorten immuun cellen. In veel gevallen is het immuunsysteem echter niet in staat de kankercellen af te stoten. De vervolgens tot stand gebrachte micro-omgeving van de tumor bevat een groot aantal immuun-ondersteunende en immuun-dempende moleculen die tezamen verweven zitten in een impasse. Fibroblasten kunnen bijvoorbeeld eiwitten uitscheiden (die chemokinen worden genoemd) die fungeren als signaalmoleculen om verschillende soorten immuun cellen aan te trekken, terwijl tumorcellen de hoeveelheid van membraangebonden immuun-remmende eiwitten (zoals CD47 of PD-L1) verhogen die de functionaliteit van immuun cellen kunnen blokkeren.

Eiwitten bestaan uit een aaneenschakeling van verschillende aminozuren die zich—door middel van hun volgorde—in complexe driedimensionale structuren kunnen vouwen. De vorming van zulke structuren is essentieel voor de functie van een eiwit, maar is vaak niet voldoende. Verdere modificaties aan de aminozuurresiduen kunnen nodig zijn voor de ‘maturatie’ van het eiwit. Een voorbeeld van een dergelijke modificatie is de cyclisatie van glutamine- of glutaminezuurresiduen die zich aan het begin van een eiwitketen bevinden, wat cruciaal is voor de functie van bepaalde membraangebonden en uitgescheiden eiwitten, waaronder verschillende chemokinen en immuun-remmend eiwit CD47. De vorming van deze modificatie wordt gekatalyseerd door het enzym glutaminyl-peptide cyclotransferase (QPCTL), waardoor dit enzym een potentieel belangrijke regulator is van de balans tussen immuun-ondersteunende en immuun-dempende moleculen in de micro-omgeving van de tumor.

In **hoofdstuk 5** hebben we gebruik gemaakt van genetisch gemodificeerde muizen en melanoomcellen om de groei en ontwikkeling van tumoren te onderzoeken in een scenario waarin QPCTL inactief is. Middels deze strategie vonden we dat, alhoewel tumorgroei onaangetast was, de compositie van de tumor significant veranderd was. De som van alle veranderingen die we vonden in de afwezigheid van QPCTL duidde erop dat de omgeving binnen de tumor veel meer weg had van een actieve ontsteking. Hieruit concludeerden we dat QPCTL-deficiënte tumoren wellicht sensitiever zouden zijn voor verdere immuuntherapie. Dit bevestigden we door QPCTL-uitschakeling te combineren met een immuun-activerende therapie (anti-PD-L1 therapie), waarop we langzamere tumorgroei en soms zelfs tumorregressie observeerden. Onze bevindingen laten zien dat QPCTL een interessant doelwit is om te inhiberen in combinatie met bestaande immuuntherapieën in de behandeling van kanker.