



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Spatio-temporal aspects of antigen cross-presentation in dendritic cells: with click-to-release chemistry

Ligthart, N.A.M.

Citation

Ligthart, N. A. M. (2024, September 12). *Spatio-temporal aspects of antigen cross-presentation in dendritic cells: with click-to-release chemistry*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4083585>

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/1887/4083585>

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

Appendices

**Nederlandse Samenvatting
List of Publications
Curriculum Vitae
Dankwoord**



Nederlandse Samenvatting

De eerste stappen zijn gezet in de gepersonaliseerde kankervaccinatie, deze gepersonaliseerde vaccines zorgen voor een specifiekere immuunrespons waardoor er minder bijwerkingen zijn. Tijdens de immuunrespons is de activatie van cytotoxische T-cellen ($CD8^+$ T-cellen) cruciaal voor de effectiviteit. Deze cellen activeren na het ontvangen van drie signalen: T-cel receptor (TCR) binding met in MHC-I (major histocompatibility complex klasse I) gepresenteerd antigeen (signaal 1), de co-stimulatie ook wel het gevaren signaal genoemd (signaal 2) en cytokines uitgescheiden door omliggende immuuncellen (signaal 3). In dit proefschrift worden de cellulaire processen achter antigeen kruispresentatie (signaal 1) verder onderzocht.

Antigeen kruispresentatie is een vorm van antigeenpresentatie waarbij extracellulair antigeen wordt opgenomen door antigeen presenterende cellen (APCs), zoals de dendritische cel. Tijdens antigeenpresentatie in MHC-I wordt een stukje afgebroken eiwit (peptide) op het celoppervlak tentoongesteld. Wanneer dit peptide niet lichaamseigen of gemuteerd is kan het worden herkend door de $CD8^+$ T-cellen, waarna ze in combinatie met signaal 2 en 3 gaan prolifereren en vervolgens de geïnfecteerde of gemuteerde cel elimineren. Tijdens kruispresentatie door dendritische cellen komt het peptide niet uit de cel zelf maar vanuit de extracellulaire omgeving, door het vervolgens te presenteren in MHC-I wordt de kans op T-cel activatie vergroot en signaal 1 dus versterkt.

Om kruispresentatie verder te onderzoeken maken we gebruik van de bioorthogonale Inverse Electron-Demand Diels-Alder pyridazine eliminatiereactie (IEDDA-PE of 'click-to-release') om glycolipiden en peptide antigenen af te schermen en weer te ontschermen. Het strategisch geplaatste molecuul, *trans*-cyclo-octeen (TCO), wordt gebruikt om T-celactivatie te blokkeren zonder te interfereren met de biologische omgeving. De chemische beschermgroep kan selectief worden verwijderd met behulp van een tetrazine molecuul. De tetrazine bindt aan de beschermende TCO-groep, waardoor het gehele tetrazine-TCO-complex loslaat. Deze 'click-to-release' benadering maakt precieze regulatie van T-cel activatie mogelijk. Hierdoor kan de mate van T-cel

activatie gebruikt worden om kruispresentatie te onderzoeken, zowel in de tijd als ruimte.

Hoofdstuk 1 | In dit inleidende hoofdstuk wordt het bestuderen van kruispresentatie door dendritische cellen in breder perspectief geplaatst. De focus ligt hier op het verbeteren van immunotherapieën met behulp van beter inzicht in kruispresentatie. Nieuwe gepersonaliseerde vaccinatiestrategieën en hun effect op T-cel activatie wordt besproken. Tot slot wordt er van dit proefschrift per hoofdstuk een korte vooruitblik gegeven.

Hoofdstuk 2 | Antigeenpresentatie resulteert in het verschijnen van meerdere peptide epitopen op het celoppervlak, deze kunnen vervolgens T-cel activatie induceren bij hoge immunogeniciteit. Hoewel het belang van antigeen kruispresentatie duidelijk is, wordt er nog steeds gediscussieerd over de mogelijke routes voor kruispresentatie en hoeveel tijd deze kosten. In dit hoofdstuk bespreken we de beide voorgestelde, 'cytosolic' en 'vacuolar', routes en beschrijven we de huidige kennis over de temporele aspecten van antigeenpresentatie. Gezien de nodige onbekende, zullen we verschillende technieken beschrijven om de antigeen (kruis)presentatie verder te onderzoeken.

Hoofdstuk 3 | Kruispresentatie wordt sterk beïnvloed door het systeem waarin het bestudeerd wordt. Het is daarom essentieel dat verschillende modelsystemen worden onderzocht, waarvan de meest optimale vervolgens gebruikt kan worden voor onderzoek naar kruispresentatie beschreven in de opeenvolgende hoofdstukken.

Kruispresentatie wordt het meest effectief uitgevoerd door de klassieke type 1 dendritische cellen (cDC1s). Echter, komen deze cellen alleen in lage getalen voor bij zowel mensen en muizen, waardoor voor grote experimenten imitatie celculturen nodig zijn. Op dit moment is er geen ideale imitatie cultuur voor de cDC1s, en aangezien de gevoelige immuuncellen afhankelijk zijn van de omgevingsfactoren, verschillen de exacte kweekcondities ook tussen laboratoria. Het doel van dit hoofdstuk is het identificeren van een optimale *in vitro* cDC1 imitatie cultuur, gebaseerd op zowel de kweekcondities en de uiterlijke kenmerken. Zes verschillende celculturen worden getest en vergeleken. Hoewel directe isolatie van cDC1s uit muizen resulteert in minimale hoeveelheden, leveren de meeste primaire culturen voldoende cellen op.

Ondanks de aantallen missen deze cellen bepaalde typische cDC1 kenmerken, en de cDC1-achtige cellen zijn vaak in de minderheid vergeleken bij de andere celtypen in de cultuur. Na uitgebreide evaluatie blijkt de D1 cellijn het beste modelsysteem te zijn voor optimalisatiestudies. Deze cellen vereisen het minste onderhoud, zijn stabiel en kunnen kruis presenteren. De meest geschikte primaire kweek was de iCD103⁺ dendritische cel kweek, waarbij 94% van de populatie zowel CD103 als CD24 tot expressie brengt. Deze cultuur is het meest geschikt voor *in vitro* studies naar kruispresentatie door cDC1s.

Hoofdstuk 4 | Bioorthogonale ontscherming is goed te gebruiken om biologische functies op celniveau te controleren. Hier presenteren we een lysosoom-gestuurde tetrazine voor een ontschermingsreactie specifiek binnen dit organel, waarmee we de ruimtelijke resolutie van deze reactie verbeteren. We laten zien dat TCO ontscherming met dit reagens kan worden gebruikt om het biologische effect van antigenen op iNKTs (invariant natural killer T cells) te controleren binnen het lysosoom en vervolgens licht te werpen op de antigeenverwerkingsroute. Daarnaast gebruiken we de lysosoom-gestuurde tetrazine om aan te tonen dat lang-peptide antigenen, voor activatie van CD8⁺ T-cellen, niet door dit organel heen gaan voor presentatie, wat suggereert dat de eerdere endosomale compartimenten een rol spelen bij de verwerking ervan.

Hoofdstuk 5 | De timing voor het laden van peptide in MHC-I en het verschijnen aan het oppervlak leidt tot de volgende tegenstrijdigheid: terwijl antigeenpresentatie binnen een paar uur resulteert in verschijnen van peptide gebonden MHC-I, duurt migratie naar de lymfeklieren minstens een dag. Dit roept de vraag op wat de fysiologische rol is van deze snelle presentatie. Het kwantificeren van de bijdrage van deze vroege component aan de immuunrespons blijft een uitdaging, voornamelijk *in vivo*. Dit is te wijten aan de dynamische aard van het proces, de betrokkenheid van meerdere celtypen en het feit dat de cellen migreren. Bovendien, waarbij *in vitro* de antigeenverwerking en presentatie kan worden gestopt met behulp van een lage dosis fixatief als glutaraaldehyde, bestaat er geen techniek die het proces *in vivo* kan stoppen.

In dit hoofdstuk presenteren we een dergelijke methode, namelijk de bioorthogonale 'click-to-release' reactie, waarmee chemische bindingen verbroken kunnen worden. We gebruiken deze chemie om de bijdrage van

vroeg gepresenteerde antigenen aan de gehele T-cel activeringsrespons te bestuderen. Door een lang synthetisch peptide te voorzien van een TCO-beschermingsgroep, wordt de herkenning door de TCR geblokkeerd. Het toevoegen van een cel-impermeabele tetrazine elimineert deze beschermende groep van alle peptiden die op dat moment op het celoppervlak aanwezig zijn. Zorgvuldige *in vitro* vergelijking van deze aanpak laat zien dat deze 'click-to-release' strategie de fixatie met behulp van glutaaraldehyde nabootst en dat het peptide gebonden MHC-I dat binnen 3 uur verschijnt bijdraagt aan 65% van de immuunrespons. Dit is zelfs het geval wanneer er 24 uur wordt gewacht na het wegwassen van de tetrazine, wat suggereert dat de werkelijke halfwaardetijd van peptide gebonden MHC-I op het oppervlak lang genoeg is om de migratietijd van de dendritische cel naar de secundaire lymfoïde organen te overbruggen.

Conclusie | Concluderend kan worden gesteld dat het onderzoek beschreven in dit proefschrift bijdraagt aan een beter begrip van kruisrepresentatie. Daarnaast kan de organel specifieke 'click-to-release' strategie niet alleen gebruikt worden op het gebied van antigeenpresentatie, maar ook op andere vlakken binnen het celbiologisch onderzoek. Het organel specifieke systeem heeft als voordeel dat lokale processen in hun natuurlijke omgeving bestudeerd kunnen worden. Zo kunnen bijvoorbeeld, zonder de organellen zelf te isoleren, chemisch-beschermde eiwitten op locatie worden gereactiveerd en kunnen de grotere effecten op het functioneren van de cel worden gemeten. De opgedane kennis over de bijdrage van de vroeg gepresenteerde antigenen kan gebruikt worden om de hoeveelheid antigeen in de loop van de tijd bij te stellen. Vooral bij het opwekken van een kunstmatige immuunrespons door vaccinatie. Dit is erg belangrijk omdat een te weinig antigeenpresentatie leidt tot te weinig T-cel activatie, maar ook omdat langdurige antigeenpresentatie de T-cel kan uitputten wat het behandeltraject tegen werkt.