

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

Achtergrond

Het immuunsysteem beschermt ons tegen gevaarlijke virussen en bacteriën en is in staat om bedreigende veranderingen in het lichaam te detecteren. Er zijn twee soorten afweerreacties; een snelle antigeen onafhankelijke respons en een trager op gang komende, maar langduriger beschermende, antigeen specifieke respons. Een antigeen is een molecuul dat herkend kan worden door het immuunsysteem en een afweerreactie kan opwekken. Een effectieve immuunrespons is sterk afhankelijk van de ontwikkeling en optimale activering van zogenaamde antigeen presenterende cellen, met name de dendritische cellen (DC). DC staan bekend als de dirigenten van de afweerrespons. Er zijn een aantal verschillende soorten DC en wij hebben onderzoek gedaan naar de Langerhans cellen (LC), die voorkomen in de opperhuid, en de dermale DC, die voorkomen in de lederhuid. (zie figuur 2 van de introductie). Een DC ontstaat uit een voorloper cel onder invloed van verschillende groeifactoren; deze ontwikkeling wordt differentiatie genoemd (zie figuren 1 en 3 van de introductie). Deze groeifactoren, ook wel cytokines genoemd, worden door verscheidene lichaamscellen gemaakt en uitgescheiden en kunnen in het lichaam zelf de circulerende voorlopercellen stimuleren tot LC of dermale DC differentiatie. In het lab kunnen we deze differentiatie nabootsen. Als voorlopercellen gebruikten wij voor onze studies cellen geïsoleerd uit bloed (CD14⁺ monocyten en CD34⁺ voorloper cellen) en de CD34⁺ MUTZ3 DC cellijn¹.

Onder normale omstandigheden zijn de DC in het lichaam in een immatuur ('onvolwassen') stadium aanwezig. De primaire functie van immature DC is het opnemen van antigenen uit de omgeving en deze verder verwerken voor presentatie aan andere afweercellen. Een immature DC is slecht in staat om een afweerreactie in gang te zetten. In een gezond lichaam is dit geen probleem, omdat in dit geval de antigenen die opgenomen worden door immature DC lichaamseigen antigenen zijn of antigenen afkomstig van onschadelijke bacteriën en tegen geen van beide is een afweerreactie gewenst. Gebeurt dit wel, dan kunnen autoimmuunziektes zoals reumatoïde artritis optreden. Indien er geen gevaren (b.v. bacteriële of virale infecties) in ons lichaam aanwezig zijn, hoeft het immuunsysteem dus niet gealarmeerd te worden, maar bij infecties of kanker moet dit juist wèl.

Indien schadelijke virussen of bacteriën aanwezig zijn, zullen de DC zogenaamde 'gevaarsignalen' ontvangen. Het contact tussen het virus/de bacterie en de DC zorgt ervoor dat er in de DC processen gestart worden die ertoe leiden dat de DC geactiveerd raken. Dit geactiveerd raken heet ook wel maturatie en leidt tot mature ('volwassen') DC. Ook bepaalde cytokines die door lichaamscellen uitgescheiden worden als reactie op een infectie kunnen de DC activeren. Tijdens DC maturatie verandert de mate van aanwezigheid (expressie) van verschillende oppervlaktemoleculen en zullen de DC zich verplaatsen (migreren) naar de lymfeklieren. Hier komen ze in contact met de uitvoerende (effector) cellen van het immuunsysteem, de T- en B-cellen. Volledig mature DC zijn perfect in staat om T cellen te activeren. De geactiveerde T cellen zullen gaan delen en uitrijpen en zijn dan in staat om virusgeïnfekteerde cellen of gemuteerde tumorcellen aan de hand van specifieke antigenen te herkennen en te elimineren. Sommige tumorcellen zijn in staat om te ontsnappen aan het immuunsysteem en muteren/veranderen dan vaak nog verder en worden zo minder immunogeen. Dat wil zeggen dat ze allerlei strategieën ontwikkelen om niet door de immuuncellen herkend te worden.

¹Verschillende celtypes hebben verschillende moleculen (waaronder verschillende zgn. Cluster of Differentiation (CD)-moleculen) op hun oppervlakte, waardoor ze van elkaar te onderscheiden zijn. Deze moleculen worden ook wel 'markers' genoemd; CD14 en CD34 zijn hier voorbeelden van.

Immuuntherapie wordt toegepast om het immuunsysteem wakker te schudden om (opnieuw) tumorcellen te herkennen en te elimineren. DC zijn ideaal voor immuuntherapie, omdat ze perfect in staat zijn om tumorantigenen te presenteren en tumor antigeenspecifieke T cellen te stimuleren tot zowel een snelle antitumor respons als een geheugenrespons. Therapieën die gebaseerd zijn op de werking van DC, kunnen gebruik maken van in het lab gekweekte (*in vitro*) DC uit voorlopercellen van de patiënt zelf of uit voorlopercellen van een donor of cellijn. Deze DC kunnen dan gebruikt worden om tumorspecifieke antigenen te presenteren. Een andere manier is het doelgericht activeren van DC in het lichaam (*in vivo*), bijvoorbeeld met antilichamen en/of onschadelijk gemaakte virussen die de genetische code voor een geselecteerd tumorantigeen in zich dragen. Om optimaal gebruik te maken van DC voor deze immuuntherapeutische strategieën, is het belangrijk om te weten welke factoren en welke eiwitten de ontwikkeling en het functioneren van DC kunnen beïnvloeden.

In dit proefschrift hebben we onderzocht of een bepaalde groep eiwitten, de zogenaamde "ATP-bindende cassette transporter" eiwitten (ABC transporters) aanwezig zijn tijdens de verschillende ontwikkelingsstadia van de DC en of deze een rol spelen in de ontwikkeling en het functioneren van DC. ABC transporters zijn pompen op het celmembraan (zie figuur 4 van de introductie) die in staat zijn om allerlei stoffen (substraten) die in de cel geproduceerd worden uit de cel te pompen. Deze transporters behoren tot een grote familie van membraaneiwitten die met behulp van de energie die vrij komt door omzetting van de cellulaire "brandstof" ATP (adenosine trifosfaat) hun substraten kunnen verpompen. De meest bekende leden van deze familie zijn P-glycoproteïne (P-gp), de multidrug resistentie proteïnen (MRPs) en het borstkanker resistentie proteïne (BCRP). De ABC transporters zijn in eerste instantie bekend geworden door hun rol in het veroorzaken van resistentie van tumorcellen tegen drugs die gebruikt worden tijdens chemotherapie behandelingen, een fenomeen dat bekend staat als multidrug resistentie (MDR). Het bleek dat ABC transporters in staat zijn om meerdere, vaak verschillende, drugs uit tumorcellen te pompen, waardoor de chemotherapie niet effectief is. Door de jaren heen is gebleken dat deze transporters ook een functie hebben in belangrijke processen in het lichaam; met name het beschermen van allerlei organen zoals de nieren, de hersenen en de lever tegen giftige stoffen. Wat minder lang bekend is, is dat ABC transporters ook aanwezig zijn op cellen van het immuunsysteem en dat ze in staat zijn om stoffen die belangrijk zijn voor de afweerreactie te verpompen. Deze ABC transporters zouden dus belangrijk kunnen zijn voor het ontwikkelen van een effectieve (antitumor) immuunrespons.

Om multidrug resistentie van tumorcellen tegen te gaan, worden er therapieën ontwikkeld waarbij tijdens het geven van chemotherapie de werking van de ABC transporters stilgelegd kan worden. Het idee hierachter is dat de transporters dan geen drugs meer uit de tumorcellen kunnen pompen en dat daardoor de drugs hun werk wel goed kunnen doen en de tumorcellen kunnen vernietigen. Tot op heden kunnen zulke strategieën echter nog niet specifiek op de tumorcellen gericht zijn en zal dus op meerdere plaatsen in het lichaam de werking van de ABC transporters worden stilgelegd. Indien ABC transporters een rol spelen in de ontwikkeling en het functioneren van DC, zal het blokkeren van de activiteit van de transporters dus ook gevolgen kunnen hebben voor de DC ontwikkeling en daarmee op het gehele verloop van een immuunrespons. Vanuit dit oogpunt is het daarom belangrijk te onderzoeken of ABC transporters aanwezig zijn op DC en zo ja, of hun aanwezigheid ook gevolgen heeft voor de ontwikkeling of het functioneren van DC.

Naast de rol van ABC transporters tijdens DC ontwikkeling, hebben we bestudeerd of verschillende drugs, die gebruikt worden bij chemotherapie (zogenaamde cytostatica), de ontwikkeling van DC kunnen beïnvloeden. Deze drugs zijn in het algemeen toxisch voor het lichaam en ook voor het immuunsysteem. Enkele studies hebben echter laten zien dat lokale toediening van een lage dosis van deze drugs het immuunsysteem (en mogelijk ook DC) juist kan activeren.

Bij het onderzoek beschreven in dit proefschrift hadden we drie hoofddoelstellingen:

- i) Ophelderen of ABC transporters een rol spelen in de ontwikkeling en het functioneren van DC.
- ii) Onderzoeken welke effecten cytostatica kunnen hebben op de ontwikkeling en het functioneren van DC.
- iii) Aanwijzingen vinden hoe we d.m.v. cytostatica en/of het veranderen van de aanwezigheid van ABC transporters het functioneren van DC kunnen verbeteren in kankerpatiënten met een onderdrukt immuunsysteem.

Resultaten

Het onderzoek heeft aangetoond dat verschillende leden van de ABC transporter familie aanwezig zijn op DC gekweekt uit voorlopercellen uit bloed, op DC gekweekt uit de MUTZ3 DC cellijn en op DC die aanwezig zijn in de humane huid (**hoofdstukken 2, 3, 6 en 9**). De aanwezigheid van deze transporters op DC zou dus kunnen betekenen dat ze ook fysiologische functies hebben. De mogelijke functies van multidrug resistentie proteïne 1 (MRP1) (**hoofdstuk 2**), borstkanker resistentie proteïne (BCRP) (**hoofdstuk 3**) en multidrug resistentie proteïne 4 (MRP4) (**hoofdstuk 6 en 7**) zijn onderzocht.

Door de activiteit van de ABC transporter MRP1 stil te leggen tijdens het differentiatieproces van voorlopercellen naar immature DC, bleek dat deze transporter actief moet zijn voor een optimale ontwikkeling van de DC (**hoofdstuk 2**). In de afwezigheid van actief MRP1, bleven de DC in een onderontwikkeld stadium en waren niet in staat om T cellen te activeren. Actief MRP1 is dus belangrijk voor een goede DC ontwikkeling en daarmee voor een efficiënte immuunrespons.

Onze studies toonden aan dat ABC transporter BCRP aanwezig is in DC in de huid. De data in **hoofdstuk 3** laten zien dat een geïnduceerde, verhoogde aanwezigheid van BCRP in DC voorlopercellen er toe leidt dat deze cellen zich sneller kunnen ontwikkelen in Langerhans cellen. Het verhogen van BCRP expressie in DC voorlopercellen zou dus een manier kunnen zijn om een snelle ontwikkeling van LC te bevorderen, wat een verbeterde immuunrespons als gevolg zou kunnen hebben.

In eerdere studies was aangetoond dat de ABC transporters P-glycoproteïne en MRP1 nodig zijn voor de migratie van DC van de huid naar de lymfeklieren. In **hoofdstuk 6** tonen we aan dat DC ook MRP4 nodig hebben om goed te kunnen migreren. In humane huid zorgden het stilleggen van de MRP4 activiteit of het specifiek verlagen van de expressie van MRP4 in huid-DC ervoor dat er minder DC uit de huid migreerden. Eenzelfde blokkade in migratie werd gezien met MUTZ3-LC waarin de aanwezigheid van MRP4 was verlaagd. Aangezien DC naar de lymfeklieren moeten migreren om daar antigeenspecifieke T cellen te activeren, kan het stilleggen van de MRP4 activiteit dus een negatief effect hebben op de algehele immuunrespons. In **hoofdstuk 7** hebben we bestudeerd of MRP4 ook in muizen belangrijk is voor DC migratie en de ontwikkeling van een goede immuunrespons. Indien dit het geval zou zijn, zouden muizen namelijk een goed model zijn om verder onderzoek te doen naar het belang van MRP4 voor de immuunrespons. Om dit te onderzoeken hebben we wildtype muizen en MRP4 knock-out muizen vergeleken. In MRP4 knock-out muizen is het MRP4 eiwit kunstmatig verwijderd. In tegenstelling tot de humane situatie, waar MRP4 belangrijk was voor DC migratie, bleek de afwezigheid van MRP4 in muizen geen effect te hebben op DC migratie of de ontwikkeling van een immuunrespons. Deze resultaten geven aan dat verschillende ABC transporters mogelijk andere functies hebben in verschillende organismen.

Het tweede hoofddoel van dit proefschrift was onderzoeken welke effecten drugs die gebruikt worden tijdens chemotherapie (de cytostica) kunnen hebben op de ontwikkeling van DC. Aangezien het bekend is dat ABC

transporters in staat zijn om cytostatica te verpompen, hebben we getest of twee belangrijke drugs substraten, mitoxantrone en doxorubicin, de ontwikkeling van DC zouden kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** zijn de korte termijn effecten van mitoxantrone en doxorubicin op de differentiatie van DC bestudeerd. Tijdens een toxiciteitsexperiment (om de gevoeligheid van de MUTZ3 DC cellijn voor deze drugs te bestuderen) viel het ons op dat de cellen van vorm veranderden. Eenmalige toevoeging van de drugs tijdens differentiatie in combinatie met DC-groefactoren, gaf een versnelde differentiatie. Aangezien voor de ontwikkeling van DC-vaccins het belangrijk is dat er in zo kort mogelijke tijd en met zo laag mogelijke kosten een optimaal vaccin geproduceerd kan worden, is een kweekmethode geoptimaliseerd waarbij in 3-4 dagen functioneel actieve, mature DC gekweekt kunnen worden met behulp van een lage dosering (2nM) drugs (in dit geval mitoxantrone). Onder normale omstandigheden (met alleen groeifactoren) duurt een DC differentiatie in het lab 7-9 dagen. Deze mitox-DC zijn getest op hun vermogen om te migreren, om T cellen tot deling aan te zetten en om tumor antigeenspecifieke T cellen te activeren en bleken over alle eigenschappen te beschikken die essentieel zijn voor effectieve antikanker vaccinatie.

In **hoofdstuk 5** was het doel om te bestuderen of langdurige selectie van DC voorlopercellen (in dit geval MUTZ3 cellen) met de drug doxorubicin ertoe zou leiden dat de cellen een hogere expressie van ABC transporters vertoonden, met eventueel veranderingen in DC ontwikkeling als gevolg. Hoewel geen verhoging van de ABC transporter expressie niveaus werd gevonden, bleek dat langdurige aanwezigheid van cytostatica een nadelig effect had op de DC voorlopercellen. De capaciteit om tot DC te differentiëren verminderde. Echter, het verwijderen van de drug zorgde ervoor dat de cellen weer bijna volledig herstelden in hun capaciteit om tot DC te differentiëren. De resultaten van deze studie wijzen op een mogelijk negatief effect van chronische, langdurige behandeling met cytostatica op DC ontwikkeling. Dit kan ertoe leiden dat patiënten vatbaarder worden voor mogelijke infecties en minder goed reageren op immuuntherapie.

Onze bevindingen dat ABC transporters de ontwikkeling van DC (MRP1 en BCRP) en het functioneren van DC (MRP4) kunnen beïnvloeden, suggereren dat verhoging van de expressie van ABC transporters op DC voorlopercellen of DC ertoe zou kunnen leiden dat de cellen beter functioneren en mogelijk beter in staat zouden kunnen zijn om een goede immunrespons in gang te zetten. Om deze hypothesen in de toekomst te kunnen testen, is het nuttig om een manier te vinden waarop de expressie van ABC transporters op DC specifiek gereguleerd zou kunnen worden. Immunologen zijn dan ook voortdurend op zoek naar zogenaamde vectoren met genetische informatie die in het lichaam, gericht naar specifieke cellen gestuurd kunnen worden, om de effectiviteit van het immuunsysteem te bevorderen. In **hoofdstuk 8** was het doel om een geschikte DC-specifieke vector te identificeren die gebruikt zou kunnen worden voor DC-gerichte immuuntherapieën in de huid. Uit deze studie kwam naar voren dat het adenovirus Ad5/3 (een onschuldig verkoudheidsvirus dat genetisch veranderd is zodat het niet meer kan delen), zowel in de humane huid als in celsuspensies gemaakt van lymfeklieren, specifiek en efficiënt mature DC kon infecteren. Na infectie met Ad5/3 functioneerden de humane huid DC nog efficiënt in een T cel stimulatie experiment en dit geeft aan dat Ad5/3 een bruikbare, DC-specifieke vector is voor DC-gerichte immuuntherapeutische doeleinden.

In conclusie

In dit proefschrift met als titel 'de rol van ABC transporters in de ontwikkeling en het functioneren van dendritische cellen' hebben we aangetoond dat verscheidene ABC transporters belangrijk zijn voor een optimale ontwikkeling en voor het functioneren van DC. Tevens hebben we laten zien dat drugs die gebruikt worden tijdens chemotherapie, verschillende effecten kunnen hebben op de ontwikkeling van DC; enerzijds kan een korte toevoeging van een lage hoeveelheid van deze drugs de DC differentiatie bevorderen, anderzijds kan langdurige

aanwezigheid van deze drugs ertoe leiden dat de DC voorlopercellen ongevoelig worden voor differentiatie-inducerende groeifactoren. In **hoofdstuk 9** worden de consequenties en mogelijke implicaties van onze bevindingen voor het immuunsysteem en de behandeling van kanker bediscussieerd. Het stilleggen van de activiteit van ABC transporters tijdens het geven van chemotherapie om drugresistentie tegen te gaan, zou verstrekende, nadelige gevolgen kunnen hebben voor de antitumor immuunrespons. Een dergelijke therapie zou zowel de DC differentiatie kunnen blokkeren (indien MRP1 wordt stilgelegd), als de migratie van DC naar de lymfeklieren (indien MRP4 wordt stilgelegd). Als gevolg hiervan zouden er dus minder mature DC in de lymfeklieren terecht komen en dit kan dan een nadelig effect hebben op de stimulatie van tumor-antigeenspecifieke T cellen. Tevens zou dit kunnen leiden tot verhoogde gevoeligheid van patiënten voor allerlei virale of bacteriële infecties tijdens (en na) de behandeling. De groeiende kennis van de rol van ABC transporters in de ontwikkeling en het functioneren van DC zou dus gebruikt kunnen worden om DC beter te laten functioneren in patiënten. Aan de andere kant zou de mogelijke stimulerende werking van lage doses cytostatica op de ontwikkeling van DC verder onderzocht kunnen worden in patiënten en dit alles zou uiteindelijk kunnen leiden tot nieuwe therapeutische strategieën om de ontwikkeling en het functioneren van DC in de patiënt te bevorderen en daarmee een sterke antitumor respons te induceren.