

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### Het ontsnappen van tumorcellen aan immuunherkenning door inefficiënte antigeenpresentatie in acute myeloïde leukemie

Acute myeloïde leukemie (AML) is een vorm van beenmergkanker die wordt gekenmerkt door het onvermogen van een bepaald type bloedcellen om uit te rijpen. Dit leidt tot een woekering van kwaadaardige leukemiecellen die de plaats innemen van normale bloedcellen in beenmerg en bloed, waardoor er een tekort aan rode bloedlichaampjes, bloedplaatjes en rijpe witte bloedlichaampjes ontstaat. Hierdoor ontstaan de symptomen van acute leukemie: bloedarmoede, bloedingen en infecties. In AML patiënten verloopt de differentiatiereeks van myeloïde witte bloedlichaampjes abnormaal, terwijl het immuunsysteem niet in staat is om deze leukemiecellen voldoende op te ruimen. Ondanks het gegeven dat behandelingen met chemotherapie ervoor zorgen dat ongeveer 75% van de jongere ( $\leq 60$  jaar) en 50-60% van de oudere ( $> 60$  jaar) patiënten in eerste instantie ziektevrij lijken ('remissie'), krijgt ongeveer 30-50% de ziekte terug ('relapse'). Om dit te beletten wordt er naast verdere chemotherapie, ook vaak immunotherapie in de vorm van stamceltransplantatie gegeven, waarbij stamcellen van een gezonde donor de leukemiecellen in de patiënt vervangen en vervolgens uitgroeien tot een nieuw en gezond immuunsysteem. Dit draagt bij aan een betere prognose waarmee aangetoond wordt dat het immuunsysteem een belangrijke rol speelt in het opruimen van leukemiecellen. Echter ook de toepassing van stamceltransplantatie kan niet altijd relapsen in patiënten voorkomen. Leukemiecellen worden blijkbaar niet altijd door het immuunsysteem herkend waardoor ze aan opruiming ontsnappen.

T cellen worden gezien als de uitvoerende (effector) cellen van het immuunsysteem die centraal staan in de herkenning en opruiming van tumorcellen. CD8<sup>+</sup> T cellen zijn met name cytotoxisch en kunnen tumorcellen doden door het herkennen van tumor-specifieke eiwitten (antigenen) die als peptiden gepresenteerd worden op het celmembraan van een tumorcel door een speciaal type receptoren genaamd HLA klasse I. Voor een efficiënte afweerreactie tegen tumorcellen is echter ook de steun van CD4<sup>+</sup> T cellen nodig die, na herkenning van antigenen op HLA klasse II moleculen, de activering van CD8<sup>+</sup> cytotoxische T cellen volledig maken. Eén van de mechanismen die leukemiecellen gebruiken om aan het immuunsysteem weten te ontsnappen is gelegen in het feit dat de antigeenpresentatie nodig voor herkenning van leukemiecellen ontregeld is. Als gevolg hiervan kunnen T cellen niet voldoende worden geactiveerd om deze tumorcellen te herkennen en te doden. In dit proefschrift hebben we de rol en aanpak van een verstoorde antigeenpresentatie als immunopathologisch mechanisme in AML onderzocht. Het vergaren van meer kennis over dit proces draagt bij aan een beter begrip van het gebrek aan anti-leukemische T cel immuniteit in AML patiënten, om zodoende mogelijk nieuwe immunotherapeutische strategieën te ontdekken die dit kunnen verbeteren.

Antigenen worden normaal gesproken door zogenaamde dendritische cellen (DCs) aan het immuunsysteem gepresenteerd. Om antigeenpresentatie te verbeteren in patiënten, is de toepassing van met (leukemie-geassocieerd) antigeen-beladen DCs als therapeutisch vaccin een interessante optie. Door DCs *ex vivo* (buiten het lichaam) te kweken en vervolgens te activeren en te beladen met leukemie-geassocieerde antigenen zouden er vaccins kunnen worden ontwikkeld die voor langdurige leukemie-specifieke T cel activering zorgen *in vivo* (in het lichaam). In het eerste gedeelte van het proefschrift beschrijven we het perspectief voor



het gebruik van DC vaccins in tumor en AML immunotherapie, waarbij het ontwerpen van strategieën voor optimale DC activatie en belading met leukemisch materiaal van patiënten centraal staan. Een gedetailleerd overzicht van de bevindingen tot nu toe wordt beschreven in **hoofdstuk 2**. Hieruit blijkt dat het DCs gekweekt uit monocytën (moDCs), in tegenstelling tot het kweken van DCs gedifferentieerd uit leukemiecellen, het voordeel heeft dat deze op grote schaal geproduceerd kunnen worden, waardoor er een brede toepasbaarheid bereikt wordt. Door deze moDCs *ex vivo* te activeren en te beladen met leukemie-geassocieerde antigenen kan deze strategie uiteindelijk bij AML patiënten uitgetest worden. In **hoofdstuk 3** hebben we onderzoek gedaan naar welke strategie om antigenen te beladen in combinatie met welke adjuvantia optimaal is voor de functie van moDCs in AML. We vonden dat moDCs beter in staat waren om 'heat-shock'-geïnduceerde apoptotische leukemiecellen op te nemen dan leukemische cellysaten, en dat dit verder gestimuleerd kon worden na het incuberen met de klinisch toepasbare TLR7/8 ligand R848. Ook werd er een verbeterde functie van R848-geactiveerde DCs gezien. Dit geeft aan dat apoptotische leukemiecellen de meest optimale bron vormen voor de belading van moDCs in AML. De TLR liganden moeten verder uitgetest worden om efficiënte activatie en maturatie te behouden voor deze DCs.

Het tweede en grootste gedeelte van dit proefschrift is gewijd aan de functie en regulatie van antigeenpresentatie door myeloïde leukemiecellen. De reden tot deze focus is ontstaan naar aanleiding van een eerdere studie waarbij we een lichaamseigen peptide genaamd 'class II-associated invariant chain peptide' oftewel 'CLIP', verhoogd tot expressie gebracht vonden op leukemiecellen bij diagnose. Dit bleek negatief geassocieerd te zijn met de overlevingsduur van AML patiënten. Om deze bevinding te bevestigen, hebben we het aantal patiënten in ons cohort bijna twee keer vergroot en opnieuw gekeken naar de invloed van CLIP expressie op de prognose (**hoofdstuk 4**). Ook in dit grotere cohort was een hoge expressie van CLIP op leukemiecellen sterk voorspellend voor een kortere overlevingsduur, zowel voor de totale als voor de cytogenetisch intermediaire risico groep van patiënten.

CLIP is een peptide dat voortkomt uit het eiwit invariante keten (Ii) en beiden hebben een belangrijke rol in HLA klasse II antigeenpresentatie door normale APCs. Ii is nodig om nieuw gemaakte HLA klasse II moleculen te transporteren van het endoplasmatisch reticulum (ER) naar gespecialiseerde endosomale compartimenten (MIICs). In deze compartimenten wordt Ii door peptidasen afgebroken tot CLIP, dat gebonden blijft aan de antigeen-bindende HLA-groeve. Vervolgens wordt CLIP uitgewisseld voor een antigeenpeptide, waarna het antigeen-beladen HLA klasse II complex wordt gepresenteerd op het celmembraan aan naïeve CD4<sup>+</sup> T cellen. Dit wetende, zou de prognostische waarde van CLIP in AML dus kunnen betekenen dat HLA klasse II antigeenpresentatie op leukemiecellen is verstoord en zich uit door een verhoogde CLIP expressie, hetgeen uiteindelijk de activatie van CD4<sup>+</sup> T cellen beïnvloed. Dit hebben we getest in **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5** door gebruik te maken van respectievelijk leukemische cellijnen en primaire leukemiecellen van AML patiënten. Door het uitschakelen van Ii expressie in CLIP<sup>+</sup> leukemische cellijnen door middel van transductie met specifieke Ii siRNA retrovirussen, konden we leukemiecellen van gelijke origine met een verlaagde CLIP expressie genereren. Vervolgexperimenten lieten zien dat allogene CD4<sup>+</sup> T cellen afkomstig van gezonde donoren een sterker prolifererend vermogen hadden in kweek met deze CLIP<sup>+</sup> leukemiecellen dan in kweek met CLIP<sup>+</sup> leukemiecellen van dezelfde cellijn. Verder bewijs voor deze functionele rol van CLIP in AML kwam voort uit langdurige autologe celkweken van CD4<sup>+</sup>



T cellen met CLIP<sup>+</sup> of CLIP<sup>-</sup> leukemiecellen verkregen uit dezelfde AML patiënten. We vonden een toename in zowel hoeveelheid als activatie van CD4<sup>+</sup> T cellen na stimulaties met CLIP<sup>+</sup> leukemiecellen, hetgeen niet gezien werd voor CD4<sup>+</sup> T cellen na eenzelfde aantal stimulaties met CLIP<sup>-</sup> leukemiecellen. CD4<sup>+</sup> T cellen gestimuleerd met CLIP<sup>+</sup> leukemiecellen lieten ook zowel een sterkere differentiatie richting T helper 1 en effector memory cellen als antigeen- en leukemie-specifieke reactiviteit zien dan CD4<sup>+</sup> T cellen gestimuleerd met CLIP<sup>-</sup> leukemiecellen.

In een vorige studie hebben we ook gezien dat bij AML patiënten die binnen 2 jaar een relapse krijgen, CLIP expressie op leukemiecellen tijdens diagnose significant verhoogd is in vergelijking tot patiënten die gedurende deze periode of langer in complete remissie blijven. Deze associatie van CLIP met het voorkomen van een relapse hebben we verder onder de loep genomen in samenhang met minimale restziekte ('MRD') in behandelde AML patiënten. Nadat patiënten chemotherapie hebben ondergaan en een remissie hebben bereikt, kunnen enkele leukemiecellen die de behandeling hebben overleefd uitgroeien tot een relapse. Deze kleine aantallen restcellen kunnen gedetecteerd worden middels een leukemie-geassocieerd fenotype oftewel 'LAP'. De aanwezigheid van CLIP op deze restcellen na behandeling en de invloed daarvan op het ontstaan van een relapse hebben we onderzocht in **hoofdstuk 6**. In deze studie bleek dat bij AML patiënten die een relapse kregen, CLIP op LAP<sup>+</sup> blasten meer tot expressie kwam dan bij AML patiënten zonder een relapse. Naast de associatie met het wel of niet krijgen van een relapse, bleek ook dat een hoge CLIP expressie op LAP<sup>+</sup> blasten van patiënten die beschouwd werden als MRD<sup>-</sup> voorspellend te zijn voor een kortere relapse-vrije overleving. Dit laat zien dat CLIP mogelijk een functionele rol speelt bij de ontsnapping van leukemische restcellen aan T cel herkenning, leidend tot een relapse van AML.

Opvallend was onze bevinding in **hoofdstuk 5** dat CLIP<sup>-</sup> primaire leukemiecellen beter in staat waren om autologe CD4<sup>+</sup> T cellen met antigeen-specifieke reactiviteit te activeren dan CLIP<sup>+</sup> primaire leukemiecellen. Gezonde monocyten van dezelfde AML patiënt konden CLIP<sup>-</sup> gestimuleerde CD4<sup>+</sup> T cellen niet reactiveren. Dit wekte de suggestie dat de afwezigheid van CLIP gerelateerd was aan het vermogen van leukemiecellen om endogene (van binnen uit), potentieel leukemie-geassocieerde, antigenen te verwerken en vervolgens te presenteren op HLA klasse II moleculen. Volgens de klassieke HLA klasse II antigeenpresentatie route wordt de uitwisseling van CLIP voor antigene peptiden in de klasse II bindingsgroeve gereguleerd door HLA-DM (*stimulerend*) en HLA-DO (*remmend*) in MIICs. In een eerder stadium vonden we een correlatie tussen CLIP expressie en de ratio van HLA-DO en HLA-DM expressie op leukemiecellen van AML patiënten. Associatie van Ii met HLA klasse II voorkomt normaliter dat endogene peptiden kunnen binden in het ER. In CLIP<sup>-</sup> leukemiecellen zou een andere mogelijkheid kunnen zijn dat antigeenbelading van nieuw gevormde HLA klasse II moleculen al plaatsvindt in het ER. Een aanwijzing hiervoor beschrijven we in **hoofdstuk 7**. Hier is de relatie onderzocht tussen de expressie van HLA klasse II in CLIP<sup>-</sup> leukemische cellijnen en de functie van Ii en twee eiwitcomplexen die essentieel zijn voor endogene antigeenbelading van HLA klasse I moleculen in het ER, genaamd het proteasoom en 'transporter associated with antigen processing' ('TAP'). Na remming van expressie of functie van deze regulerende eiwitten, vonden we een Ii-onafhankelijke, maar proteasoom- en TAP-afhankelijke route van HLA-DR presentatie in CLIP<sup>-</sup> leukemiecellen. Dit werd niet gezien in CLIP<sup>+</sup> leukemiecellen en zou kunnen inhouden dat er een negatieve correlatie bestaat voor deze cellen tussen CLIP expressie en endogene antigeenbelading van HLA klasse II moleculen in het ER.



In **hoofdstuk 8** deden we de opmerkelijke bevinding dat CLIP ook tot expressie komt op leukemiecellen van patiënten met een AML subtype genaamd acute promyelocyten leukemie (APL). APL wordt naast een translocatie tussen chromosoom 15 en 17 gekenmerkt door de afwezigheid van HLA-DR op het celmembraan. CLIP werd niet gevonden op leukemiecellen van niet-APL patiënten met HLA-DR<sup>+</sup> AML en fungeerde daarmee als sterk discriminerende marker voor APL. Hiermee identificeren we, voor zover we weten, voor het eerst een marker die positief is op leukemiecellen van APL patiënten, en die tevens via flowcytometrie geschikt is om APL als specifiek genetische subgroep te onderscheiden van overige typen HLA-DR<sup>+</sup> AML. Uit verdere flowcytometrische metingen bleek dat gezonde promyelocyten geen CLIP tot expressie brachten en dat ook andere subvormen van HLA klasse II, HLA-DP en HLA-DQ, afwezig waren op CLIP<sup>+</sup> leukemiecellen van APL patiënten. Om deze APL-gerelateerde en HLA klasse II-onafhankelijke CLIP presentatie te kunnen verklaren, hebben we tenslotte in **hoofdstuk 9** de betrokkenheid van CLIP expressie met HLA klasse I antigeenpresentatie in leukemiecellen bekeken. Behalve complexvorming van Ii met HLA klasse I moleculen in leukemische cellijnen en primaire leukemiecellen van patiënten, vonden we vijf Ii-afkomstige peptiden in HLA klasse I-specifieke peptide eluaten. Hiervan bevonden zich er twee in de CLIP regio van het Ii eiwit. Deze CLIP peptiden hadden een sterke bindingscapaciteit voor meerdere HLA klasse I allelen, waarvan de antigeenbindingsgroeven een compleet andere structuur bevatten (HLA-A2, -B7, -A3 en -B40). Hieruit blijkt dat, in overeenstemming met de binding aan HLA klasse II, CLIP aan verschillende HLA klasse I moleculen kan binden, met als mogelijke consequentie dat de aanwezigheid van CLIP op leukemiecellen ook een uiting kan zijn van een verstoorde HLA klasse I antigeenpresentatie.

De resultaten in het huidige proefschrift laten zien dat antigeenpresentatie door zowel DCs als leukemiecellen in acht moet worden genomen voor het verbeteren van immunotherapie in AML. Door gebruik te maken van heat shock-geïnduceerde apoptotische leukemiecellen als bron voor belading van DCs *ex vivo* gekweekt uit monocyten, en het verder uittesten van adjuvanten op de functie van deze DCs, zou een eerste stap gezet kunnen worden richting de ontwikkeling van een effectief leukemiegericht vaccin. Daarnaast geven onze bevindingen aan dat een inefficiënte antigeenpresentatie door leukemiecellen de functie van T cellen en waarschijnlijk daardoor het klinische beloop van AML patiënten negatief beïnvloedt. Het is dus niet alleen een verstoring in het aanzetten van T cellen tot anti-leukemische reactiviteit, maar ook in het T cel herkenningsprofiel van leukemiecellen dat kan leiden tot ontsnapping van leukemie aan het immuunsysteem. Hier zal bij het creëren van immunotherapeutische strategieën in de toekomst rekening mee moeten worden gehouden. Een mogelijkheid om dit aan te pakken is het vinden of ontwikkelen van immunotherapeutica die zich richten op de verbetering van antigeenpresentatie door leukemiecellen *in vivo*, waarbij downmodulatie van CLIP een interessante target is. Een dergelijke rol zal verder versterkt worden mocht CLIP daadwerkelijk het resultaat zijn van een verstoorde HLA klasse I antigeenpresentatie route in leukemiecellen. Hierdoor zal CLIP downmodulatie zorgen voor hogere efficiëntie van zowel HLA klasse I als HLA klasse II antigeenpresentatie. Het mogelijke effect van deze strategie op het ontstaan van autoimmunitet zal echter wel goed getest moeten worden. De opzet en uitwerking van deze en andere gerelateerde immunotherapeutische strategieën tot klinische toepasbaarheid zou versneld kunnen worden door het ontwerpen van een systeem dat het monitoren van antigeenpresentatie door DCs en leukemiecellen voor en na behandeling van AML mogelijk maakt.

