



Samenvatting

Nederlandse samenvatting ...en wat dit nu allemaal betekent –voor de leek

Kanker is wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak. Hoewel er veel vooruitgang is geboekt in chirurgische technieken, radiotherapie en chemotherapie, blijkt een groot aantal patiënten dat aanvankelijk genezen leek uiteindelijk toch metastasen te ontwikkelen en te sterven aan deze ziekte. Daarom is er behoefte aan nieuwe behandelingsstrategieën om kankercellen te elimineren. Eén van de meest veelbelovende innovatieve methodes is immunotherapie. In de afgelopen jaren hebben nieuwe ontwikkelingen geresulteerd in verschillende klinisch toepasbare immunotherapeutische benaderingen. Vooral checkpointremmers (tegen CTLA4 en PD-1) die tumor gemedieerde onderdrukking van anti-tumor T cellen opheffen, hebben in een deel van de behandelde patiënten geleid tot langdurige klinische responsen. Aangezien een deel van de patiënten dergelijke responsen niet vertoont en dit samen lijkt te hangen met een verlaagde immunocompetentie, blijft het van groot belang om de door kanker veroorzaakte onderdrukking van het immuunsysteem te breken en zo een minimaal benodigd niveau van functionele anti-tumor immuniteit te bereiken. Dendritische cellen (DC) zijn de belangrijkste initiators van de adaptieve afweerrespons. DC hebben een uitstekend vermogen om antigenen te vangen, te verwerken en te presenteren aan naïeve (d.w.z. nog niet eerder door antigen geactiveerde) T cellen. Ze hebben ook het vermogen om de aard van de T cel respons te reguleren door co-stimulerende signalen. Deze signalen zijn verantwoordelijk voor het bepalen of een T cel na interacties met antigen-presenterende cellen zoals DC geactiveerd of getolereerd raakt. Deze unieke eigenschappen van DC maakt gerichte manipulatie van DC *in vivo* een aantrekkelijke therapeutische aanpak voor het induceren en het verbeteren van de afweerrespons tegen kanker. Het in dit proefschrift (getiteld: Targeting van huid geassocieerde DC subsets en het induceren van resistentie tegen kanker gerelateerde onderdrukking van het immuunsysteem) beschreven onderzoek was daar op gericht en viel in drie hoofdlijnen uiteen: 1) het bestuderen van de effecten van tumorfactoren op humane DC rijping en migratie uit de huid; 2) het karakteriseren van DC subsets in huid en daarop drainerende lymfeklieren en het richten van een adenoviraal vaccin op deze specifieke subsets; 3) de identificatie van moleculaire signaleringspaden in DC waarop suppressieve cytokines aangrijpen en het bestuderen van mogelijkheden deze te manipuleren om remming van DC rijping en activering te voorkomen of te bestrijden. Gezamenlijk moeten deze lijnen van onderzoek leiden tot nieuwe DC-gerichte vaccinatiestrategieën in de huid, die tumor geïnduceerde immuunsuppressie kunnen doorbreken en een effectieve anti-tumor T cel respons kunnen opstarten.

1. Tumor gerelateerde DC onderdrukking in de huid

Van alle bekende immuunsuppressieve cytokines is IL-10 de enige waarvan bekend is dat het de rijping (of maturatie) van DC blokkeert. In hoofdstuk 2 en 6 hebben we onderzoek gedaan naar de invloed van IL-10 op de rijping van dermale DC (DDC) in de huid en op monocyot afgeleide DC (MoDC). In hoofdstuk 2 hebben we verschillende DDC subsets gekarakteriseerd die uit de huid waren gemigreerd onder invloed van verschillende kanker gerelateerde immuunsuppressieve cytokines. De karakterisatie werd gedaan op basis van

fenotype, migratie en T cel stimulerende capaciteit. Onze groep heeft eerder het fenotype en het T cel stimulerend vermogen van DDC beschreven die waren geconditioneerd met IL-10. In de studie beschreven in hoofdstuk hebben we de verschillen tussen DDC subsets uitgebreider onderzocht. Zo hebben we de samenstelling van de DDC populaties geanalyseerd die uit *ex vivo* gekweekte humane huidbiopten waren gemigreerd na stimulatie met verschillende kanker gerelateerde cytokines. Daarnaast bestudeerden we hun vermogen om CD4⁺ en CD8⁺ T cellen te stimuleren met respectievelijk “helper” (Th) en “killer” functies. Onze bevindingen tonen aan dat IL-10 het enige cytokine is met het vermogen om de DC migratie uit de huid te beïnvloeden. Dit resulteerde in migratie van DC subsets die duidelijk een negatieve invloed hadden op de inductie van zowel functionele CD4⁺ Th cellen als CD8⁺ T cellen. DC populaties die binnen 48 uur migreerden uit gezonde huidbiopten geconditioneerd met IL-10 leken fenotypisch sterk op DC populaties die in het zelfde tijdsbestek uit biopten migreerden afkomstig van huid dat borsttumoren overspant, d.w.z. relatief kleine aantallen rijpe CD1a⁺ DC en grote aantallen onrijpe CD14⁺ cellen. Deze onrijpe DC hadden macrofaag eigenschappen en bleken slechte activators en aanjagers van Th1 cellen vanuit naïeve, niet eerder geactiveerde T cellen. Conditionering met IL-10 verhoogde de B7-H1/PD-L1 expressie niveaus op alle uit de huid gemigreerde DDC subsets en leidde tot een hoge IL-10 secretie na CD40L-gemedieerde stimulatie. Het kweken van deze CD14⁺ DDC met CD4⁺CD25⁻ T cellen resulteerde in voornamelijk Th2 cellen en de inductie van IL-10 transcriptie. Daarnaast bleken deze DC gemigreerd uit IL-10 geconditioneerde huidexplanten niet het vermogen te hebben om primaire CD8⁺ effector T cellen te stimuleren, maar wel om CD25⁻ Th cellen te converteren naar CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Tregs en deze potentieel suppressieve Tregs verder te expanderen. Het is duidelijk dat de negatieve invloed op effector T cellen van de IL-10/tumor gemoduleerde migratoire huid DC subsets nadelig is voor DC gerichte tumor vaccinatie strategieën in de huid. DC gerichte tumorvaccins moeten daarom componenten bevatten die de tumor gerelateerde DC onderdrukking overkomen en daarnaast zorgen voor migratie van rijpe Langerhans cellen (LC) en DDC subsets die de capaciteit hebben om antitumor effector T cellen te induceren zonder verhoogde Th2 en Treg inductie.

Vaccins gebaseerd op autologe tumorcellen bieden een breed scala aan relevante tumor antigenen en unieke neo-epitopen van individuele tumoren. Helaas belemmeren tumor afgeleide suppressieve factoren in situ rijping van DC en zo een effectieve antitumor immuniteit. Aangezien intradermale injectie een goede manier is om tumorvaccins toe te dienen hebben we in hoofdstuk 3 onderzocht wat de invloed is van primaire coloncarcinoom gesecreteerde factoren op de rijping en migratie van DC uit menselijke huid. Verrassend genoeg bleken door primaire coloncarcinoom gesecreteerde factoren de fenotypische rijping van uit huid gemigreerde DC te verhogen wat resulteerde in een verhoogd T cel stimulerend vermogen. Bij *in vitro* uit monocyten gekweekte DC (MoDC) werd een soortgelijke stimulatie van rijping gevonden wat werd gemedieerd door cyclooxygenase (COX)-gereguleerde prostaglandines. De toename van rijpe huid DC bleek echter volledig prostaglandine onafhankelijk. Het conditioneren van huid DC met colontumor factoren leidde tot een verlaagde IL-12p70 secretie

en in een verhoogd Th17/Th22 transcriptie profiel bij T cel stimulatie. Het intracellulaire cytokine expressie profiel in T cellen na polyclonale stimulatie door de geconditioneerde uit de huid gemigreerde DC toonde aan de Th cel differentiatie niet noemenswaardig werd beïnvloed door de colontumorfactoren. Vergelijkende analyse van het DC fenotype en transcriptie-profielen van gestimuleerde Th cellen suggereert dat de waargenomen effecten op de rijping van huid DC mogelijk werden veroorzaakt door van de tumor afkomstig GM-CSF. In conclusie, deze studie heeft aangetoond dat oplosbare factoren afkomstig van op colontumorcel gebaseerde vaccins geen negatieve effecten hebben op de DC migratie en rijping in humane huid, maar juist DC rijping induceren en de priming van een poly-functioneel Th cel respons niet in de weg staan. Dit is goed nieuws voor de toepasbaarheid van cellulaire kankervaccins in de huid. Verder onderzoek zal uit moeten wijzen welke adjuvantia hierbij ingezet kunnen worden om uiteindelijk optimale activering van een effectieve anti-tumor afweerrespons te bewerkstelligen.

2. Op DC subset gerichte therapieën in de huid en huid-drainerende lymfeklieren

In vivo targeting van huid DC subsets met tumor antigenen is een aantrekkelijke en veelvuldig bestudeerde methode. Helaas is er tot dusver weinig onderzoek gedaan in humane modellen die representatief zijn voor de complexe 3D weefselstructuur van de huid. Intradermale injectie van eiwitten kan leiden tot targeting van zowel DDC als migrerende epidermale LC. De grootte van de vaccindrager (zoals virussen, liposomen of nanopartikels) is bepalend of het wordt opgenomen door LC of DDC in de huid of door antigeen presenterende cellen in drainerende lymfeklieren. Uiteindelijk zal T cel activering plaatsvinden in de drainerende lymfeklieren, mogelijk in een samenspel tussen uit huid gemigreerde DC subsets en in de lymfeklier residentie DC subsets. Om de werkzaamheid van op DC gerichte vaccins te verhogen, is er een dringende behoefte aan fenotypische en functionele karakterisering van humane DC subsets in op huid drainerende lymfeklieren. We hebben daarom een uitgebreide vergelijkende fenotypische analyse uitgevoerd van conventionele CD11c⁺ myeloïde DC subsets uit humane donor huid versus de CD11c⁺ myeloïde DC subsets in de huid drainerende lymfeklieren. Zo hebben wij als eerste twee CD1a⁺ van huid afgeleide, migratoire subsets (LC en DDC) en twee CD1a⁻ in lymfeklier residerende subsets (de één CD14⁺ en de ander CD14⁻) geïdentificeerd en beschreven (hoofdstuk 4). Onze bevindingen toonden met name een hoge capaciteit voor T cel stimulatie aan van de in lymfeklier residerende DC subsets, ondanks hun relatief onrijpe fenotype.

Door DC *in vivo* een gen tot expressie te laten brengen dat codeert voor een tumor antigeen kan een anti-tumor afweerrespons gestart worden. Het vinden van de optimale vector om DC selectief *in vivo* te beladen met genen is erg belangrijk voor het ontwikkelen van dergelijke op DC gerichte genetische vaccinatie strategieën. In hoofdstuk 5 hebben we een panel van subgroep C/B en chimere fiber gemodificeerde adenovirussen (Ad) getest op hun vermogen om humane DC te transduceren. Voor dit onderzoek hebben we gebruik gemaakt van *in vitro* gegenereerde LC en van *ex vivo* DC uit humane huid melanoom drainerende lymfeklieren. Van de geteste virussen bleek het C/B chimere Ad5/3 virus het meest efficiënt in het transduceren van *in vitro* gegenereerde LC. Eerder was beschreven dat Ad5/3 bond aan moleculen behorend tot de

B7 familie van co-stimulators, namelijk CD80 en CD86. Wij konden dit in huid DC bevestigen en toonden hoge transductie efficiëntie aan van rijpe CD1a⁺ DC subsets in de huid en daarop drainerende klieren. De infectie door binding aan CD80/CD86 had geen nadelige effecten op de daaropvolgende T cel stimulatie. Daarnaast vermindert het gebruik van dit op DC gerichte virus de kans op ongewenste neveneffecten zoals het induceren van immuun tolerantie door de infectie van niet professionele antigen presenterende cellen. Hieruit concluderen wij dat Ad5/3 in combinatie met DC activerende adjuvantia een veelbelovende vaccinatie methode is.

3. Interferentie in intracellulaire signaleringspaden om tumor-gerelateerde onderdrukking van DC te blokkeren

In hoofdstuk 6 hebben we de T cel activerende capaciteiten vergeleken van twee DC populaties die ontstaan bij cytokine geïnduceerde MoDC rijping in aanwezigheid van IL-10 (IL-10-mDC), namelijk CD14⁺ en CD14⁻ IL-10-mDC. CD14⁺BDCA3(CD141/thrombomodulin)⁺ DC die ontstaan tijdens *in vitro* maturatie van MoDC lijken een fysiologisch relevante subset aangezien ze fenotypisch (en functioneel) zeer vergelijkbaar zijn met de CD14⁺ DC die voornamelijk migreren uit IL-10 geconditioneerde huid, met DC in melanoom tumoren en met DC die migreren uit borsttumor overliggende huid (zie hoofdstuk 2). Vergeleken met normaal gerijpte DC secreteren zowel CD14⁺ en CD14⁻ IL-10-mDC verlaagde niveaus van IL-6 en IL-12p70; dit is een kenmerk dat ze delen met M2 macrofagen. IL-10 geïnduceerde CD14⁺ mDC worden fenotypisch gekenmerkt door een laag rijpingsniveau maar ook door een hoge expressie van BDCA3 en DC-SIGN en lijken als zodanig sterk op CD14⁺ infiltrerende cellen in melanoom tumoren. Vergeleken met normale mDC hebben CD14⁺ DC een hoog expressieniveau van B7-H1/PD-L1, induceren preferentieel Th2 cellen, en vertonen een lagere capaciteit om tumor antigeen specifieke CD8⁺ T cel te induceren. Daarnaast veroorzaken ze proliferatieve T cel anergie. In tegenstelling tot de CD14⁺ tegenhangers behouden CD14⁻ monocyt-afgeleide DC wel hun allogene Th inductie capaciteit maar lijken een functioneel anerge staat te induceren gezien het ontbreken van effector cytokine secretie. Dit kan mogelijk samenhangen met bijzonder lage CD40 expressie op de CD14⁻ mDC. Zowel CD14⁺ als CD14⁻ IL-10-mDC vertonen een relatief lage inductie efficiëntie van MART-1_{26-35L} specifieke CD8⁺ T cellen -met bovendien een lage aviditeit. Hieruit blijkt dat beide IL10-mDC subsets niet bijdragen aan een effectieve antitumor immuniteit. Deze conclusie wordt verder ondersteund door het feit dat beide subsets verhoogde expressie laten zien van mRNA transcripten coderend voor IDO, STAT3, TGFβ, VEGFA, IL-4RA en IL-6R welke zijn gerelateerd aan immuunsuppressie, angiogenese en/of tumorinvasie. STAT3 mRNA interferentie kan de ontwikkeling van het IL-10 geïnduceerde CD14⁺ DC fenotype blokkeren. Dit maakt STAT3 interferentie een potentieel goede toevoeging aan immuuntherapeutische tumor interventies gericht op DC.

Verder ingrijpen op de intracellulaire signaleringspaden downstream van de IL-10 receptor zou DC ontwikkeling en activering onder tumor condities kunnen verbeteren en zo de werkzaamheid van op DC gerichte vaccins verbeteren. Voor de studie beschreven in hoofdstuk 7 hebben we experimentele functionele screens uitgevoerd met arrays bestaande uit meer dan 1000 humane kinase peptide substraten om de belangrijkste moleculaire signaleringspaden in kaart

te brengen die betrokken zijn bij DC ontwikkeling en remming door IL-10. Uit de veranderingen van het zogenaamde kinoom profiel blijkt glycogeen synthase kinase-3 β (GSK3 β) centraal te staan bij zowel DC ontwikkeling als DC onderdrukking. GSK3 β inhibitie blokkeert humane DC differentiatie van zowel CD34⁺ precursors als monocytten. Dit resulteert in het behoud van de expressie van CD14 samen met verlaagde niveaus van IL-12p70 secretie en een verminderde capaciteit voor T cel inductie.

Adenovirale transductie van MoDC met een constitutief actieve vorm van GSK3 β induceerde een weerstand tegen de suppressieve effecten van IL-10 en voorkwam trans-differentiatie naar CD14⁺ mDC tijdens MoDC maturatie in aanwezigheid van IL-10. Handhaving van een constante GSK3 β activiteit kan dus een middel zijn om de werkzaamheid van DC gerichte vaccins te versterken. Op basis van deze bevindingen en die van hoofdstukken 5 en 6 stellen wij voor dat DC gerichte Ad vectoren genen zouden moeten bevatten die coderen voor tumor antigenen en immuunstimulatorische factoren, maar ook voor shRNA gericht tegen STAT3 en/of voor constitutief actief GSK3 β . Dit alles zorgt voor een krachtig tumorvaccin dat selectief kan binden aan DC en deze gelijktijdig activeert en resistent maakt tegen tumor geïnduceerde immuunsuppressie.

Wat dit nu allemaal betekent –voor de leek.

Aangezien bestaande methodes om kanker te bestrijden (chirurgische technieken, radiotherapie en chemotherapie) niet altijd voldoende effectief zijn, wordt er veel onderzoek gedaan naar mogelijkheden om het humane immuunsysteem zodanig te activeren dat de eigen afweercellen kankercellen kunnen elimineren. Belangrijke afweercellen die daarbij zouden kunnen helpen zijn de dendritische cellen (DC). DC zijn gespecialiseerd in het herkennen van lichaamsvreemde eiwitten en het presenteren hiervan aan andere afweercellen (zogenaamde killer T cellen) die vervolgens cellen die de desbetreffende eiwitten bevatten kunnen herkennen, binden en doden. Zo kunnen tumorvaccins ontworpen worden die gericht van kanker afgeleide eiwitten afgeven aan DC in de huid. Beladen en geactiveerde DC kunnen dan van de huid naar de lymfeklieren migreren om daar anti-kanker T cellen te activeren. Helaas scheiden kankercellen vaak stoffen af die de ontwikkeling en de werking van de DC onderdrukken met als gevolg het uitblijven van een effectieve afweer tegen kanker. In mijn onderzoek, dat beschreven is in dit proefschrift, heb ik de effecten van deze afweeronderdrukkende, ofwel immuunsuppressieve, stoffen op DC bestudeerd, alsmede wat voor invloed op deze wijze geconditioneerde DC vervolgens hebben op andere afweercellen. Daarnaast heb ik bestudeerd wat er op moleculair niveau binnen de DC gebeurt wanneer immuunsuppressieve eiwitten aan DC binden en deze conditioneren. Zo heb ik verschillende DC subsets geanalyseerd die door kanker afgeleide immuunsuppressieve stoffen ontstaan en aangetoond dat zij niet killer T cellen stimuleren maar eerder T cellen activeren die op hun beurt weer de afweer zouden kunnen onderdrukken. Bovendien heb ik een paar belangrijke moleculaire schakels binnen in de DC beschreven die van invloed zijn op de verstoorde ontwikkeling van de DC in aanwezigheid van immuunsuppressieve factoren. Dit biedt de mogelijkheid een therapie te ontwikkelen die er op gericht is DC bestand

te maken tegen de afweeroonderdrukkende werking van tumoren. Zo kunnen we DC gericht manipuleren zodat ze zelfs onder immuunsuppressieve omstandigheden toch kankereiwitten kunnen presenteren en anti-tumor killer T cellen activeren. Een goede methode om dit te bereiken maakt gebruik van moleculair aangepaste virussen. In dit proefschrift beschrijven we een klinisch veilig toepasbaar verkoudheidsvirus dat hiervoor een mogelijke kandidaat is, aangezien het heel specifiek aan DC bindt en deze infecteert om zo modulerende genen selectief af te leveren. Al deze resultaten dragen bij tot een beter begrip van de mechanismen die leiden tot verstoorde DC ontwikkeling en functionaliteit in patiënten met kanker. Bovendien bieden ze aanknopingspunten om hier therapeutisch op in te grijpen en de werkzaamheid van tumorvaccins en andere vormen van immuuntherapie te verbeteren. Zo zijn we weer een stap dichterbij het effectief inzetten van DC in de strijd tegen kanker.