

## Glycaan-lectine duet, nieuwe strategieën voor DC-targeting

Ons lichaam wordt constant bedreigd door pathogenen zoals bacteriëen, virussen, schimmels e.d. Om ons tegen deze bedreigingen te beschermen, heeft ons lichaam het immuunsysteem, oftewel het afweersysteem ontwikkeld. In het immuunsysteem spelen diverse cellen, zoals monocytten, macrofagen, basofielen, neutrofielen T- en B-lymfocyten, NK cellen en dendritische cellen een beschermende rol op verschillende niveaus van protectie ook wel genaamd de *innate immunity* (eerstegraads verdediging) en de *adaptive immunity* (verfijnd afweerreactie welke leidt tot memory respons). Het immuunsysteem is zo opgebouwd dat het niet alleen immuniteit tegen pathogenen geeft, maar het induceert ook tolerantie tegen lichaamseigen eiwitten of substanties (antigenen).

In het immuunsysteem speelt er een speciale groep witte bloed cellen genaamd dendritische cellen (DCs) een zeer belangrijke en uitzonderlijke rol. Dendritische cellen (DCs) zijn gespecialiseerde antigeen presenterende cellen d.w.z. dat ze in staat zijn allerlei lichaamseigen en lichaamsvreemde antigenen op te nemen, af te breken en in kleine stukjes te tonen aan T cellen. DCs komen voor in alle weefsels die in contact staan met de buitenwereld, zoals de huid en de slijmvliezen. Daar sporen ze de indringers op door hun lange dendriten. Tijdens infectie nemen DCs antigenen op en migreren ze naar lymfeklieren om daar de antigenen aan naïeve T cellen te presenteren. Hierdoor worden de T cellen geactiveerd en differentiëren ze vervolgens in effector cellen en kunnen dan doelgericht de pathogenen op de plek van infectie uitschakelen.

Ieder levend organisme is bedekt met een dichte en complexe laag van glycanen, suikerstructuren. Glycanen zijn erg belangrijk voor ontwikkeling, groei, en goed functioneren of overleven van de organisme. Iedere cel heeft een andere set van glycanen op zijn celoppervlak. Deze verschillende sets van glycanen worden gecreeërd door een proces genaamd glycosylering, waarbij de cellen lange glycaanstructuren maken. Cellen kunnen deze lange glycaanstructuren koppelen aan eiwitten die tot expressie worden gebracht op cellen. Verandering in glycaan opmaak van de cel kan ontstaan tijdens activatie van een cel, verandering in de lokale omgeving tijdens stress of tijdens pathogen interactie. Zo hebben tumor cellen een andere glycaan opmaak dan gezonde cellen. Ook pathogenen hebben een andere glycaan opmaak, deze gebruiken ze bijvoorbeeld om bij cellen binnen te komen die ze vervolgens infecteren. Daarnaast kunnen pathogenen hun glycaan opmaak ook gebruiken als mechanisme om het immuunsysteem te ontsnappen.

DCs brengen verschillende glycaan bindende receptoren, zoals C-type lectine receptoren (CLRs) tot expressie. CLRs kunnen verdeeld worden in verschillende groepen op basis van hun structuur b.v. CLR Mannose receptor behoort tot groep I en CLR DC-SIGN en MGL behoren tot groep II. Deze glycaan bindende receptoren kunnen onderscheid maken tussen lichaamseigen en niet-lichaamseigen geglycosyleerde antigenen. CLRs binden geglycosyleerde antigenen en internaliseren (opnemen), prepareren (afbreken) en presenteren (aanbieden) ze aan naïeve T cellen via MHC klasse I of II moleculen. DCs presenteren intracellulaire antigenen, zoals

virale antigenen of lichaamseigen antigenen op MHC klasse I moleculen aan CD8<sup>+</sup> T cellen. De antigenen van extracellulaire bacteriën, schimmels e.d. worden gepresenteerd op MHC klasse II moleculen aan CD4<sup>+</sup> T cellen. Echter, DCs kunnen ook extracellulaire antigenen presenteren aan MHC klasse I moleculen. Dit proces staat ook bekend als *cross-presentatie*. Vanwege het feit dat CLR's verschillende geglycosyleerde antigenen herkennen, kunnen DCs, afhankelijk van het karakter van de antigenen, verschillende immunoreacties geven zoals immuniteit tegen pathogene antigenen en tolerantie tegen lichaamseigen antigenen.

In dit proefschrift hebben we onderzocht hoe specifieke glycanen gebruikt kunnen worden om verschillende CLR's, die tot expressie worden gebracht op dendritische cellen (DCs) in de muis, te targeten om antigeen presentatie te verbeteren en T cel immunresponse te induceren. Targeting van CLR's op DCs met specifieke glycanen verhoogt antigeen presentatie via MHC klasse I en klasse II, wat leidt tot inductie van CD8<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup> T cel door middel van cross-presentatie. Kennis over deze processen zullen inzicht geven voor de ontwikkeling van geraffineerde vaccinatie-strategieën om deze vervolgens te kunnen realiseren.

De glycanen specificiteit van humane DCs is goed gekarakteriseerd, maar nog weinig is er bekend over de glycanen bindingspecificiteit van muizen DCs. Om deze reden hebben we uitgebreid onderzoek verricht naar de profielen van glycaanbinding van beenmerg-afgeleide DCs (BM-DCs) uit muizen. Dit resulteerde in een brede karakterisatie van glycaanbinding profiel van muizen DCs. Muizen DCs tonen hoge bindingsaffiniteit voor gesulfateerde-, sialylated-, gegalactosyleerde-, *N*-acetylgalactosamines (GalNAc) en *N*-acetylglucoamines (GlcNAc). Verrassend genoeg blijkt dat Lewis antigenen, die fucose bevatten, zeer zwak aan muizen DCs binden. In tegenstelling tot muizen DCs hebben humane monocyt-afgeleide DCs een sterke affiniteit voor fucose en Lewis antigenen.

Tijdens de glycaan profilering van muizen DC, hebben we potentiële glyco-liganden voor de Mannose Receptor (MR) en MGL gevonden, deze zouden gebruikt kunnen worden om antigenen aan te passen voor DC targeting doeleinden. Op basis van deze resultaten hebben we glyco-conjugaten gemaakt door extra glycanen zoals Sulfo-Lewis A, GlcNAc, GalNAc, Lewis X en Lewis B aan model antigen Ovalbumine (OVA; kippen eiwit) aan te hangen. Met de neo-glycoconjugaten konden we CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cel responsen uit lezen. De neo-glycoconjugaten werden gebruikt als een hulpmiddel om het effect van glycanen op antigen opname door DCs, verwerking en presentatie van de antigenen op steady-state T cellen, te bestuderen.

Een van de redenen dat muis DCs geringe bindingscapaciteit hebben om Lewis antigenen te binden, is de afwezigheid van de CLR DC-SIGN. We gebruikten daarom de DCs uit humane DC-SIGN transgene muizen (hSIGN) dat op de humane DC lijken, en onderzochten de mogelijkheden van deze muizen om de DC-SIGN reacties *in vivo* te vertalen. We observeerden dat Lewis glycanen sterk interactie aangaan met DCs uit hSIGN muizen in vergelijking met C57BL/6 muizen die een gebrek hebben aan DC-SIGN (Hoofdstuk 2). Bovendien, targeten van DC-SIGN met de neo-glycoconjugaat OVA-Lewis X en OVA-Lewis B resulteerde in een verbeterde MHC klasse II gemiddelde antigeen presentatie op specifieke CD4<sup>+</sup> T cellen. Opvallend is dat de opname van de neo-glycoconjugaat door DC-SIGN ook resulteerde in

cross-presentatie van de CD8<sup>+</sup> T cellen. De verbeterde presentatie was te wijten aan de glycaan aanpassing van het OVA eiwit, wat niet gepaard ging met een DC rijping.

Tot nu toe is de MR onderzocht voor een verbeterde antigeen-opname met behulp van specifieke antilichamen of glycanen mannan/mannose welke de MR bindt. Echter mannan/mannose bindt niet alleen aan MR maar kan ook DC-SIGN binden. In dit proefschrift hebben we ook onderzocht hoe ander MR-specifieke glycanen gesulfateerde Lewis A en GlcNAc, geconjugeerd aan OVA, MR targeten. OVA is vanzich zelf *N*-geglycosyleerd, en bevat hoge mannoses en kan daardoor MR binden. OVA-sulfo Lewis A en OVA-GlcNAc leiden tot een matig verhoogde inductie van MHC klasse II gemedieerde-proliferatie van OVA-specifieke CD4<sup>+</sup> T cellen in vergelijking tot OVA. Niettemin, neo-glycoconjugaten zorgde voor een 10 maal sterkere cross-presentatie aan CD8<sup>+</sup> T-cellen in een TLR-onafhankelijke wijze, vergeleken met niet-gemodificeerde OVA (hoofdstuk 3). Verrassend, de neo-glycoconjugaten resulteerde in differentiatie van naïeve CD4<sup>+</sup> T-cellen in IFN- $\gamma$  producerende Th1-cellen, echter, de glycanen inducerde geen proliferatie van CD4<sup>+</sup> T-cellen. Dit suggereert dat een andere signalering kan worden veroorzaakt doordat deze glycanen mogelijk aan een andere plek op de MR binden.

De resultaten van de glycaan bindingspecificiteit van MGL1 en MGL2 zijn gepresenteerd in hoofdstuk 4. We hebben gevonden dat MGL1 specifiek was voor Lewis X en Lewis A en MGL2 (vergelijkbaar met de humane MGL) bindt aan GalNAc, in tegenstelling tot humane MGL, dat ook galactose, TF-antigeen en Core2 O-glycanen bindt. Daarnaast hebben we ook gevonden dat MGL2 ook bindt aan tumor geassocieerde glycanen, zoals GalNAc en dus een interactie met tumorcellen kan aangaan. Targeting van MGL2 met de tumor-geassocieerde glycaan GalNAc, resulteerde in een verbeterde cross-presentatie op CD8<sup>+</sup> T cellen en inductie van Th1 reacties (hoofdstuk 5). De crosspresentatie was onafhankelijk van TLR stimuli.

Ook hebben we aangetoond dat de interactie van Lewis X-geconjugeerd antigeen met MGL1 een verhoogde opname van de neoglycoconjugaat en routing naar endosomen liet zien, vergeleken met niet-gemodificeerde antigeen (hoofdstuk 6). Een verhoogde opname door BM-DCs en milt DCs resulteerde verder in een verhoogde crosspresentatie op CD8<sup>+</sup> T-cellen *in vitro*. Deze verbeterde cross-presentatie was onafhankelijk van TLR signalering en strikt verbonden aan de glycaan. In tegenstelling, CD4<sup>+</sup> T cel proliferatie werd niet geïnduceerd door de opname van Lewis X conjugaat, het schoof eerder de naïeve CD4 T-cel richting het Th1 cel profiel. Daarnaast werd versterkt cross-presentatie van neoglycoconjugaat waargenomen *in vivo* door inductie van IFN- $\gamma$  producerende CD8<sup>+</sup> T cellen.

Tot slot, de bevindingen zoals beschreven in dit proefschrift, geven inzicht in de gevolgen van glycaan gemedieerde interactie met verschillende CLRs die tot expressie komen op DCs. Interactie van CLR specifieke glycanen kunnen immuunresponsen moduleren door het induceren van zowel effector CD4<sup>+</sup> of CD8<sup>+</sup> T cellen. Glycan-CLR interacties, zoals eerder beschreven is voor DC-SIGN, induceren niet alleen CD4<sup>+</sup> T cel responsen, maar ook cross-priming van CD8<sup>+</sup> T cellen die verder kan worden benut om de anti-tumor-strategieën te ontwerpen. Door een combinatie van glycanen te gebruiken die binden aan verschillende locaties op MR, hebben we aangetoond dat combinaties van glycanen een synergetisch effect op antigeen presentatie

en inductie van T cellen tot stand kunnen brengen. Verschillende CLR kunnen dezelfde specificiteit hebben voor soortgelijke glycanen, echter de interactie van een glycaan met een bepaalde CLR kan leiden tot uiteenlopende immuunresponsen. Dit kan verklaard worden door verschillende mechanismen, zoals variatie in CLR expressie op verschillende DC subsets, verschil in aminozuursequenties in de cytoplasmatische staart van CLR die van belang zijn voor de internalisatie van antigeen en intracellulaire signalering. Dit in zijn geheel kan een bijdrage leveren aan de verscheidenheid van immunologische uitkomsten (CD4, CD8 en Th differentiatie). Soortgelijke pathogenen, lichaamseigen-antigenen of tumor antigenen die een of verschillende type glycanen tot expressie brengen kunnen immuunresponsen induceren, afhankelijk van de interactie die ze aangaan met een of meerdere CLR's. Deze kennis kan worden gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe immuun-therapieën b.v tegen infectieziekten en kanker.