



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Tuning the show

*Genetic engineering to unravel antigen presentation by the human leukocyte antigen class I*  
de Waard, A.A.

**Publication date**  
2021

[Link to publication](#)

### Citation for published version (APA):

de Waard, A. A. (2021). *Tuning the show: Genetic engineering to unravel antigen presentation by the human leukocyte antigen class I*. [Thesis, externally prepared, Universiteit van Amsterdam].

### General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Presentatie van peptiden door het Humaan Leukocyt Antigeen klasse I (HLA-I) is cruciaal voor de CD8<sup>+</sup> T cel respons bij kanker en infectie. Iedere CD8<sup>+</sup> T cel heeft een unieke receptor, genaamd de T cel receptor. Deze receptor herkent een specifiek peptide in combinatie met een HLA-I molecuul dat op alle lichaamscellen gepresenteerd wordt. Door negatieve selectie van CD8<sup>+</sup> T cellen specifiek voor lichaamseigen peptiden, herkennen de meeste CD8<sup>+</sup> T cellen enkel lichaamsvreemde peptiden in combinatie met een HLA-I molecuul. Cellen met DNA-mutaties of lichaamsvreemd DNA, zoals tumorcellen of geïnfecteerde cellen, kunnen lichaamsvreemde peptiden maken en aan CD8<sup>+</sup> T cellen presenteren met HLA-I. Na herkenning kan de CD8<sup>+</sup> T cel zijn cytotoxische functie gebruiken om het target te doden.

Tijdens de evolutie zijn HLA-I genen gedupliceerd en vaak gemuteerd. Als gevolg daarvan heeft ieder individu 3 klassieke maternale en 3 klassieke paternale HLA-I genen: HLA-A, HLA-B en HLA-C. Deze zijn allen bijzonder polymorf in de populatie. Door de polymorfe residuen, die zich met name in de peptide bindingsgroeve bevinden, presenteert elk HLA-I allel een uniek peptide repertoire aan CD8<sup>+</sup> T cellen. Het voordeel van dit systeem is dat peptiden afkomstig van pathogenen die niet gepresenteerd kunnen worden door de HLA-I allelen in het ene individu, misschien wel gepresenteerd kunnen worden door HLA-I allelen in een ander individu. Hiermee wordt de vatbaarheid van de hele populatie voor hetzelfde pathogeen voorkomen.

HLA-I moleculen worden gesynthetiseerd, gevouwen en geladen met peptide in het endoplasmatisch reticulum (ER). Tijdens de synthese wordt een glycaan aan de asparagine op positie 86 bevestigd door het oligosaccharide transferase-complex en meteen getrimd door de opeenvolgende handelingen van glucosidase I en  $\alpha$ -glucosidase II. Hierdoor kunnen de chaperonne eiwitten calnexin (CNX) en calreticulin (CALR) opeenvolgend binden. Na associatie van beta-2-microglobuline (B2M) met HLA-I, wordt het geheel gerekruteerd in het peptide-lading complex (PLC). Dit complex bestaat daarnaast nog uit tapasin, ERp57 en de transporter betrokken bij antigeen verwerking (TAP, bestaande uit TAP1 en TAP2). Peptiden die in het cytosol door het proteasoom worden gegenereerd worden door TAP het ER in geloodst en mogelijk getrimd door de ER aminopeptidasen (ERAP1 en ERAP2). Peptiden die voldoen aan de criteria voor binding aan een beschikbaar HLA-I molecuul worden dan geladen op het HLA-I molecuul. Hierna wordt de peptide/HLA-I/B2M trimeer losgelaten uit het PLC en naar het celmembraan geloodst, waar het gepresenteerd wordt aan CD8<sup>+</sup> T cellen.

Tumorcellen met ontregelde antigeenpresentatie machinerie profiteren van minder CD8<sup>+</sup> T cel gemedieerde immunologische druk en kunnen ongevoelig zijn voor immunotherapeutische strategieën die erop gericht zijn om tumor-specifieke CD8<sup>+</sup>

T cellen te (re)activeren. Kennis over functionele HLA-I antigeenpresentatie is onmisbaar om afwijking van een immuunrespons door tumoren te begrijpen en aan te pakken. Identificatie van de gevolgen van zulke ontregeling voor HLA-I antigeenpresentatie kan bijdragen aan het ontwerp van nieuwe therapieën die zich richten op het herstellen van HLA-I functie of op specifieke (peptide/)HLA-I antigenen die niet worden aangedaan door de ontregeling. Met de komst van nieuwe technieken voor genetische manipulatie, zoals CRISPR/Cas9, kunnen belangrijke vragen in het veld van HLA-I antigeenpresentatie worden beantwoord. In dit proefschrift gebruiken we verschillende technieken voor genetische manipulatie om de huidige kennis van bekende factoren die bijdragen aan HLA-I antigeenpresentatie te verbeteren en nieuwe factoren te identificeren die functionele HLA-I antigeenpresentatie mogelijk maken.

In **Hoofdstuk 2** presenteren we een nieuw panel van HLA-I antigeenpresentatie machinerie knock-out cellen, genaamd PAKC, dat nieuwe studies naar HLA-I antigeenpresentatie mogelijk maakt. Dit panel bestaat uit 10 cellijnen uit dezelfde genetische achtergrond. Elke cellijn is genetisch knock-out voor een ander gen betrokken bij de HLA-I antigeenpresentatie route. We hebben de knock-out van de verschillende genen gevalideerd op zowel genetisch als eiwit niveau en gekarakteriseerd voor hun HLA-I oppervlakte expressie. Daarnaast laten we zien hoe de cellijnen kunnen bijdragen aan nieuwe studies naar het functionele samenspel tussen de antigeenpresentatie machinerie en hun rol in HLA-I antigeenpresentatie.

Een nieuw onderzoek waarin deze cellijnen worden toegepast wordt gepresenteerd in **Hoofdstuk 3**. Peptiden die onafhankelijk van TAP worden gepresenteerd, worden momenteel onderzocht als nieuwe immunotherapeutische targets voor TAP-deficiënte tumoren. Door gebruik te maken van de wild type en TAP1 knock-out cellijnen van het panel zoals beschreven in Hoofdstuk 2, identificeren we een peptide dat onafhankelijk van TAP gepresenteerd wordt op TAP-negatieve en TAP-positieve cellen. Onze data geeft aan dat verschillende, maar niet alle gezonde celtypen genoeg antigeen presenteren om een T cel respons te induceren van T cellen die specifiek zijn voor dit TAP-onafhankelijke peptide. Afhankelijk van de immunotherapeutische strategie kan het aanvallen van peptiden die gepresenteerd worden onafhankelijk van de TAP-status van een cel leiden tot T cel reactiviteit tegen gezonde cellen, of tot inefficiënte therapie door de negatieve selectie van zelf-reactieve T cellen. Deze data demonstrenen de noodzaak van het uitgebreid testen van een breed panel van gezonde celtypen om klinisch relevante TAP-onafhankelijke peptiden te definiëren die geschikt zijn als target voor immunotherapie.

Een ander onderzoek dat gebruik maakt van verschillende cellijnen uit PAKC wordt beschreven in **Hoofdstuk 4**. Aangezien HLA-I heel polymorf is, kan de afhankelijkheid van de verschillende HLA-I allelen voor de peptide lading-machinerie verschillen. Dit is al beschreven voor tapasin en TAP, maar door de oppervlakte expressie

van 10 verschillende HLA-I allelen in de cellijnen deficiënt voor een van de PLC componenten uit Hoofdstuk 2 te bestuderen, laten we zien dat HLA-I allelen een duidelijk verschillende afhankelijkheid voor elke component in het PLC hebben. Deze data rechtvaardigen vervolgonderzoek naar de eigenschappen van HLA-I allelen en de individuele bijdragen van de PLC componenten aan HLA-I antigeenpresentatie.

Als inleiding naar Hoofdstuk 6, waar de rol van glycosphingolipiden (GSLs) wordt bediscussieerd in de context van antigeenpresentatie, bespreken we de kennis over GSLs in het immuunsysteem in **Hoofdstuk 5**. Eerst vatten we de huidige kennis samen over het GSL-repertoire dat tot expressie komt op de belangrijkste immuuncel subtypen in verschillende differentiatiestadia. Deze samenvatting wordt gevolgd door een bespreking van de functies die toe worden geschreven aan de GSLs binnen en buiten het immuunsysteem. Ten slotte vormen we hypothesen over mogelijke andere functies van GSLs op immuuncellen.

In **Hoofdstuk 6** identificeren we vervolgens een nieuwe rol in het immuunsysteem voor een specifiek type GSLs, namelijk neolacto-series GSLs (nsGSLs). Gebruikmakend van een genoom-brede mutagenese screening, ontdekten we dat HLA-I op het oppervlak van cellen zonder de ER- en Golgi gelokaliseerde intramembraan protease SPPL3 minder toegankelijk was voor antilichamen dan op cellen die SPPL3 wel tot expressie brachten. We vinden dat de activiteit van het sleutelenzym in de nsGSL synthese, namelijk de glycosyltransferase B3GNT5, hoger is in de afwezigheid van SPPL3. Gesialyleerde nsGSLs zijn in staat om antilichaambinding aan HLA-I te belemmeren, maar nog belangrijker, ze verminderen ook de T cel respons. Dus verhoogde expressie van gesialyleerde nsGSL synthese door tumorcellen is mogelijk een mechanisme om T cel gemedieerde immuniteit te ontwijken. In gliomen correleert de verminderde expressie van SPPL3 en verhoogde expressie van B3GNT5 met een lagere algehele overleving van de patiënt. Dit suggereert dat een verhoging in nsGSL expressie inderdaad voordelig is voor de tumor. Voorbehandeling van nsGSL-rijke tumorcellen met FDA-goedgekeurde GSL-syntheseremmers resulteerde in een verhoogde T cel respons tegen de tumorcellen, wat laat zien dat GSL-syntheseremmers dus een mogelijke therapie vormen voor patiënten met nsGSL-rijke tumoren.

De belangrijkste resultaten en overwegingen in dit proefschrift worden verder bediscussieerd in **Hoofdstuk 7**. Er is nog steeds een groot onontgonnen terrein op het gebied van HLA-I antigen presentatie waarvoor we denken dat PAKC een geschikt model is om het onderzoek te versnellen. Dit kan bijvoorbeeld door het bestuderen van de oppervlakte expressie en het peptiderepertoire van diverse HLA-I allelen in de verschillende cellijnen. We bediscussiëren de mogelijke lagen van regulatie van SPPL3 activiteit en het mechanisme waarop nsGSLs de toegankelijkheid van membraanreceptoren veranderen. Daarnaast hypothetiseren we over de mogelijke biologische functies van nsGSLs als modulators van membraanreceptorfuncties.

Het onderzoek dat gepresenteerd wordt in dit proefschrift vergroot de kennis van de bekende factoren in HLA-I antigeenpresentatie en onthult nieuwe lagen van regulatie die bijdragen aan functionele HLA-I antigeenpresentatie.