

---

## Nederlandse samenvatting

Het menselijke lichaam kan zich op vele manieren goed beschermen tegen binnendringende ziekteverwekkers. Hierbij speelt het immuunsysteem een zeer belangrijke rol. Het immuunsysteem in de mens bestaat uit twee nauw met elkaar samenwerkende onderdelen: het aangeboren (innate) en het aangeleerde (adaptieve) immuunsysteem. Het aangeboren afweersysteem bestaat onder andere uit macrofagen en neutrofiële cellen. Deze cellen herkennen algemeen voorkomende patronen op ziekteverwekkers en zullen vervolgens de ziekteverwekker direct bestrijden. Het adaptieve immuunsysteem bestaat uit B en T cellen die zeer specifieke eiwitstructuren herkennen en een 'geheugen' functie hebben. Dendritische cellen (DCs) vormen een belangrijke brug tussen deze twee onderdelen van het immuunsysteem. Deze cellen zijn in staat vrij algemeen voorkomende structuren op ziekteverwekkers te herkennen, waarna ze de ziekteverwekker opnemen. Na opname in de DC wordt de ziekteverwekker afgebroken tot kleine eiwitten, zogenaamde antigenen, welke vervolgens op het oppervlak worden gepresenteerd aan T cellen. Op het moment dat de DC deze antigenen aan de T cel presenteert, wordt de T cel niet alleen geactiveerd maar de DC bepaald ook hoe de T cel zijn werk zal doen. Op deze manier registreren de DCs de zeer specifieke immunrespons uitgevoerd door T cellen. De DC is onder andere gepositioneerd op strategische plekken in het lichaam waar veel contact is met de buitenwereld. Hier vervullen ze een poortwachterfunctie door continu de omgeving af te tasten.

De DCs herkennen ziekteverwekkers met behulp van verschillende moleculen op hun celoppervlak: zogenaamde Toll like receptoren en C-type lectine receptoren. De verschillende Toll like receptoren herkennen vaste patronen op ziekteverwekkers zoals lipopolysaccharide van Gram-negatieve bacteriën. Als een TLR een ligand heeft gebonden leidt dit tot activatie van de DC en zal deze naar een lymfe klier verplaatsen. De C-type lectine receptoren echter herkennen specifieke suikerstructuren op ziekteverwekkers. DCs hebben vele verschillende C-type lectines op hun oppervlak met elk hun eigen suikerherkenningspatroon. De C-type lectines zorgen voor de opname van ziekteverwekkers in de cel, waarna deze worden afgebroken en gepresenteerd aan T cellen. Naast ziekteverwekkers brengen ook lichaamseigen cellen deze suikermoleculen tot expressie. Hiermee zorgen de C-type lectines ervoor dat DCs kunnen communiceren met andere cellen.

DC-SIGN is een van deze C-type lectine receptoren die voorkomen op DCs. DC-SIGN is ontdekt als receptor voor een eiwit dat aan de buitenkant van het AIDS veroorzakende HIV-1 virus zit, het gp120. Door binding van DC-SIGN aan de suikermoleculen op dit HIV-1 eiwit, wordt het virus in de cel opgenomen. Deels zal het virus vervolgens worden afgebroken en gepresenteerd aan T cellen. Maar het virus heeft ook een methode ontwikkeld waardoor het zich in de DC kan verschuilen. Het virus wordt vervolgens door de DC naar de T cel rijke lymfe knopen getransporteerd. Hier wordt het virus door de DC overgegeven aan de T cel, de ideale gastheer cel voor het HIV-1 virus. Op deze manier verhoogt het HIV-1 virus via de binding aan DC-SIGN de infectie van de T cellen.

In de lever komt een receptor voor die heel erg lijkt op DC-SIGN, L-SIGN genaamd. De lever is een belangrijk orgaan, dat een rol speelt bij de zuivering van het bloed dat komt vanaf het maagdarmsstelsel. In de lever bevinden zich verschillende soorten gespecialiseerde cellen die er voor zorgen dat dit zo goed mogelijk gebeurt. De hepatocyten zijn voornamelijk verantwoordelijk voor het omzetten van stoffen. Van veel van de niet hepatocyten wordt gedacht dat ze een immunologische rol spelen. Veel lichaamsvreemde materialen passeren de lever als ze het lichaam via de maag zijn binnen gekomen. Deze lichaamsvreemde materialen zijn over het algemeen niet gevaarlijk en de lever zorgt ervoor dat het lichaam deze stoffen niet aanvalt. In de lever bevinden zich verschillende soorten cellen die hier aan mee werken. Een van deze celtypen is de lever sinusoid endotheel cel (LSEC). Deze LSEC vormen de begrenzing tussen de hepatocyten en het passerende bloed. In tegenstelling tot andere endotheel cellen, zitten deze specifieke endotheel cellen niet vast aan een onderliggende matrix en hebben ze vele 'vensters' die een soort zeefplaten vormen. Hierdoor zijn ze in staat om actief te bepalen welke materialen uit de bloedbaan de hepatocyten bereiken. De LSECs nemen stoffen op die met het bloed vanuit de darmen naar de lever zijn gevoerd. Nadat deze stoffen zijn opgenomen in de cellen worden ze afgebroken en aan T cellen gepresenteerd, net als gebeurt in DCs. Normaal gesproken als een cel een stukje materiaal, een antigeen, aan deze T cellen presenteert, worden de T cellen geactiveerd en aangezet om een immuunreactie uit te voeren. Maar in het geval van deze LSECs blijft deze activatie achterwege en resulteert het presenteren van de antigenen in tolerantie voor deze stoffen. Dit is in vele gevallen gunstig omdat een heftige immuunreactie tegen antigenen afkomstig van voedsel leidt tot voedselallergie. Maar in het geval dat er een ziekteverwekker met het voedsel het lichaam is binnengedrongen is een adequate immuunrespons gewenst.

Op deze LSECs bevindt zich L-SIGN. Deze receptor is familie van DC-SIGN, en herkent, net als DC-SIGN, suikerstructuren die zich bevinden op lichaamseigen en lichaamsvreemde componenten. L-SIGN en DC-SIGN herkennen veel dezelfde suikers, maar er zijn ook verschillen in herkenning. DC-SIGN en L-SIGN kunnen beide hoog mannose bevattende suikers, en bepaalde fucose suikers binden. Er is een bepaalde fucose bevattende suiker die alleen door DC-SIGN, en niet door L-SIGN wordt herkend; Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>). Dit patroon van suikerherkenning bepaalt welke lichaamseigen en -vreemde structuren worden herkend door DC-SIGN en L-SIGN.

In dit proefschrift is de functie binnen het immuunsysteem van zowel DC-SIGN als L-SIGN verder uitgediept. Hiervoor zijn verschillende aspecten onderzocht: de suikerherkenning, interacties met lichaamseigen materialen en interacties met virussen.

Allereerst is de suikerherkenning van L-SIGN is verder in kaart gebracht. Ondanks de grote gelijkenis van de beide receptoren zijn er verschillen in de suikerherkenning. Naast het al eerder beschreven verschil, het gebrek aan herkenning van het zogenaamde Le<sup>x</sup> door L-SIGN, wordt in **hoofdstuk 2** een ander verschil beschreven. Wij hebben aangetoond dat L-SIGN in staat is een siaalzuur bevattende suiker te herkennen, welke niet herkend wordt door DC-SIGN. Deze siaalzuur bevattende suikers komen veel tot expressie op hepatocyten. Deze hepatocyten vormen het grootste deel van de lever en grenzen aan de LSECs die L-

SIGN op hun oppervlak hebben. L-SIGN is inderdaad in staat om aan deze cellen te binden. De specifieke suiker evenals het eiwit waarop deze suiker zit is nog niet gevonden en dit zal verder onderzocht gaan worden. Mogelijkerwijze heeft deze binding een rol in het behouden van de structuur van de lever. Het L-SIGN bevattende endotheel zit namelijk niet zoals conventioneel endotheel vast aan de onderlaag met behulp van een soort matrix maar zit vrij los. Door de binding van L-SIGN aan de hepatocyten zouden de endotheel cellen aan de hepatocyten verankerd kunnen zijn en daarmee de structuur van de lever in stand kunnen houden. Het is inderdaad bewezen dat het verlies van deze sialzuur bevattende suikers van het oppervlak van de hepatocyten tijdens het proces van tumorvorming een verhoogde kans geeft op het vormen van uitzaaiingen.

Naast de interactie met hepatocyten, gaat L-SIGN ook binding aan met monocyten (**hoofdstuk 8**). Monocyten zijn voorlopercellen van macrofagen, een soort alleseters. Monocyten zitten in het bloed en als ze naar weefsels verhuizen veranderen zij in macrofagen. L-SIGN is in staat met deze voorlopercellen een interactie aan te gaan. Met behulp van een muismodel, is deze interactie verder onderzocht. De muis heeft een homologe vorm van L-SIGN in de lever: mSIGNR1. Deze receptor lijkt zowel met betrekking op suikerherkenning alsmede de plekken waar het tot expressie komt in de lever veel op L-SIGN. Dit maakt de muis een belangrijk model om de rol van L-SIGN *in vivo*, dus in een geheel organisme, te kunnen onderzoeken. Met behulp van deze muis en een muis waar mSIGNR1 specifiek is uitgeschakeld is bepaald dat de aanwezigheid van mSIGNR1 in de lever de hoeveelheid macrofagen in de lever verhoogt. Omdat deze macrofagen zijn ontstaan uit monocyten, is het aannemelijk dat mSIGNR1, en ook L-SIGN, een rol speelt bij het rekruteren van monocyten uit het bloed en de verandering van deze cellen in lever macrofagen.

In **hoofdstuk 7** staat de interactie van DC-SIGN en L-SIGN met neutrofielen beschreven. Neutrofielen zijn belangrijke cellen binnen het aangeboren immuunsysteem. Neutrofielen verzamelen zich snel op de plek van een infectie. Doormiddel van twee eiwitten, Mac-1 en CEACAM1, op hun oppervlak sturen zij DCs aan. Na binding van deze eiwitten aan DC-SIGN op de DC, zal de DC zodanig veranderen dat deze een specifieke soort T cel reactie op gang zal brengen. L-SIGN is in staat één van deze twee eiwitten te binden, namelijk Mac-1. CEACAM1 wordt niet herkend door L-SIGN. Tijdens een ontsteking verzamelen neutrofielen zich massaal in de lever, zelfs als de ontsteking zich niet in de lever bevindt. Omdat L-SIGN zich op een strategische plaats in de lever bevindt, is het waarschijnlijk dat L-SIGN een rol speelt bij het vasthouden in de lever van passerende neutrofielen. Neutrofielen kunnen namelijk zo sterk aan L-SIGN binden dat ze niet door de stroming van het bloed mee gevoerd kunnen worden. Vervolgens kunnen de neutrofielen opgeruimd worden door de LSEC of de lever macrofagen. Ook is het mogelijk dat ze het leverweefsel binnendringen nadat ze zijn vastgehouden door L-SIGN op het endotheel.

Het was al bekend dat DC-SIGN in staat is verschil te herkennen tussen eiwitten uit gezond weefsel en tumorweefsel. Wij hebben in **hoofdstuk 2** aangetoond dat L-SIGN ook in staat is dit verschil te herkennen. Een bepaald eiwit op darmcellen, CEA, verandert dusdanig tijdens het proces van tumorvorming in darmweefsel dat het andere suikers tot expressie gaat brengen. Dit leidt tot een betere herkenning door DC-SIGN en dus ook L-SIGN. In het geval

van L-SIGN kan deze verbeterde herkenning leiden tot het vasthouden van de tumorcellen op het moment dat ze uitzaaiingen gaan vormen. Darmtumoren vormen vaak uitzaaiingen in de lever. Dit komt doordat de bloedvatstructuur in de lever erg nauw is waardoor de verplaatsende tumorcellen daar gemakkelijk vast komen te zitten. Maar ook de binding van de tumorcellen aan L-SIGN op het endotheel in de lever sinusoiden kan leiden tot het blijven hangen van de tumorcellen die vervolgens een secundaire tumor kunnen gaan vormen.

Naast interacties met lichaamseigen eiwitten zijn L-SIGN en DC-SIGN ook belangrijke receptoren voor ziekteverwekkers, zoals virussen, bacteriën en parasieten. In de **hoofdstukken 3** tot en met **6** is de interactie van de twee receptoren met virussen onderzocht. In **hoofdstuk 3** en **4** is de interactie van L-SIGN en DC-SIGN met het hepatitis C virus (HCV) onderzocht. Dit virus wordt omgeven door een envelop bestaande uit eiwitten waarop veel hoog-mannose structuren zitten. DC-SIGN en L-SIGN binden aan deze structuren en nemen het virus mee de cel in. Eenmaal in de cel kan het virus worden afgebroken en worden gepresenteerd aan T cellen. Het virus heeft echter ook een methode ontwikkeld waardoor het uit het zicht blijft van het immuunsysteem. Na opname in de cel verstopt het zich in bepaalde compartimenten in de cel waarna het, als de cel een geschikte andere cel tegenkomt, naar deze andere cel overgegeven kan worden. Hierin lijkt het HCV virus veel op het HIV-1 virus.

Wij hebben aangetoond dat in de lever L-SIGN het belangrijkste molecuul is dat aan HCV envelop eiwitten bindt. Het blokkeren van L-SIGN in leverweefsel heeft tot gevolg dat de HCV envelop eiwitten nauwelijks meer aan het leverweefsel binden. Tevens hebben we aangetoond dat L-SIGN op cellijnen HCV envelop eiwitten gecombineerd met antilichamen kan opnemen en presenteren aan T cellen. Op het moment dat L-SIGN in de lever HCV eiwitten presenteert aan T cellen zou dit kunnen leiden tot tolerantie voor het virus, aangezien deze cellen verantwoordelijk zijn voor tolerantie inductie. Inderdaad is het aangetoond dat veel T cellen die specifiek HCV eiwitten herkennen het virus niet effectief aanvallen. Dit betekent dat het HCV virus twee manieren heeft ontwikkeld om via L-SIGN een effectieve immuunrespons te omzeilen: ten eerste door zich te verstoppen in de LSEC en ten tweede door via de LSEC tolerantie op te wekken.

Op DCs is DC-SIGN het belangrijkste molecuul dat de HCV eiwitten herkent. Na opname in de DC blijft een deel van het virus een lange tijd intact. Maar ook in de DC wordt een deel van het virus afgebroken en gepresenteerd aan T cellen. Als de HCV eiwitten op een aluminium drager zitten, een methode die veel in vaccinaties gebruikt wordt, worden de eiwitten effectiever aan T cellen gepresenteerd door DCs. Dit suggereert dat dit een veel belovende methode is om een goed werkend vaccin tegen HCV te ontwikkelen.

In **hoofdstuk 5** en **6** is onderzocht hoe de interactie van het HIV-1 virus met DC-SIGN op DCs kan worden geblokkeerd. Door middel van antilichamen die specifieke delen van het gp120 envelop eiwit van HIV-1 binden te gebruiken en te bepalen in welke mate dit een effect heeft op de binding van DC-SIGN aan het eiwit hebben wij aangetoond dat bepaalde eiwitten beter zijn in het blokkeren van deze interactie dan andere antilichamen. Een verrassend resultaat is dat antilichamen die zijn opgewekt tegen suikerloos gp120 goed zijn in het blokkeren van de interactie van suiker bevattend gp120 met DC-SIGN. Dit betekent

dat de suikers een belemmering vormen voor de antilichaam binding die DC-SIGN binding verhindert. Practisch gezien houdt dit in dat eventuele vaccinatie met gp120 eiwitten beter kan plaatsvinden met suikervrije gp120 dan met suiker bevattend gp120. Tevens hebben we aangetoond dat na binding van DC-SIGN aan gp120, gp120 makkelijker aan CD4 bindt. Het HIV-1 virus gebruikt de interactie tussen gp120 en CD4 op de T cel om de T cel te infecteren. Dit betekent dat HIV-1 door het binden aan DC-SIGN niet alleen door de DC naar T cel rijke gebieden kan worden getransporteerd maar dat het eenmaal daar aangekomen ook makkelijker de T cel binnendringt.

Een andere methode om DC-SIGN gp120 interacties te voorkomen is het blokkeren van DC-SIGN. In **hoofdstuk 6** staat beschreven dat in moedermelk een eiwit zit dat de overdracht van HIV-1 door DCs kan verhinderen. Dit eiwit bevat veel Le<sup>x</sup> suiker structuren waaraan DC-SIGN bindt. Op het moment dat dit eiwit aan DC-SIGN gebonden heeft kan het HIV-1 virus niet meer binden en kan het zich dus niet meer verschuilen in de DC. Dit melk eiwit wordt niet herkend door L-SIGN dus de remmende werking van moeder melk heeft geen effect op HIV-1 dat de lever heeft kunnen bereiken.

In conclusie: DC-SIGN op DCs en L-SIGN op LSECs zijn belangrijk voor de communicatie met andere cellen zoals neutrofielen, monocytten en hepatocyten. De virussen HCV en HIV-1 gebruiken DC-SIGN en L-SIGN in hun eigen voordeel. Maar als de binding van deze virussen verhindert wordt door de functie van DC-SIGN en L-SIGN te remmen zal dit als nadelig effect hebben dat ook de interactie met de lichaamseigen componenten geremd worden. Daarom is verder onderzoek nodig waar het muismodel een goed hulpmiddel zal zijn.