

## VU Research Portal

### **Interplay of the T cell receptor/CD3 complex and the co-stimulatory molecule SLAM in immune responses**

Wang, N.

2008

#### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

#### **citation for published version (APA)**

Wang, N. (2008). *Interplay of the T cell receptor/CD3 complex and the co-stimulatory molecule SLAM in immune responses*.

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

#### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# **Samenvatting**

# **Samenspel tussen het T cel receptor/CD3 complex en de co-stimulator SLAM voor immuunreacties.**

## **Samenvatting**

Het immuunsysteem beschermt ons tegen de buitenwereld. Het bestaat uit een complexe samenhang van cellen en eiwitten die gezamenlijk het lichaam beschermen tegen lichaamsvreemde dreigingen. Twee belangrijke en sterk verweven onderdelen van het immuunsysteem worden gevormd door de zogenaamde aangeboren en adaptieve immuunrespons. Binnen de adaptieve immuunrespons vormen T cellen een belangrijke functie. Deze cellen herkennen specifieke antigenen wanneer die door MHC moleculen op antigeen presenterende cellen (APC) worden aangeboden. De specificiteit van T cellen wordt bepaald door hun T cel receptor (TCR), die bestaat uit verschillende onderdelen: de variabele TCR- $\alpha$  en - $\beta$  (of TCR- $\gamma$  en - $\delta$ ) ketens die het antigeen herkennen, en de constante niet-covalent gebonden signaleiwitten CD3- $\gamma\epsilon$ , CD3- $\delta\epsilon$  en CD3- $\zeta\zeta$ . Al deze TCR onderdelen worden gecodeerd door verschillende genen en worden op specifieke wijze geassembleerd.

De ontwikkeling van T cellen kan worden opgedeeld in stadia die herkend worden door de opeenvolgende expressie van een aantal oppervlakte-eiwitten: CD25, CD44, TCR, CD4 en CD8. Zij markeren allereerst de dubbel negatieve (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) stadia DN1 tot DN4, gevolgd door een dubbel positief (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) stadium, om tenslotte te eindigen als danwel CD4 of CD8 enkel positieve T cellen die vervolgens uit de thymus het lichaam ingaan. Een eigenschap van de constante TCR onderdelen CD3- $\gamma\epsilon$ , CD3- $\delta\epsilon$  en CD3- $\zeta\zeta$  is dat zij alle een of meerdere copieën van een geconserveerd aminozuur

motief in zich dragen dat immuunreceptor tyrosine-gebaseerd activatie motief (ITAM) wordt genoemd. In dit ITAM motief worden twee tyrosine aminozuren omringd door semi-geconserveerde aminozuren die 6-8 posities van elkaar verwijderd zijn (YxxLx6-8L). Wanneer de TCR wordt gestimuleerd leidt dat tot fosforylering van deze tyrosine residuen in het ITAM motief, wat vervolgens een cascade van signalen in de T cel teweegbrengt. CD3- $\gamma$ , - $\delta$  and - $\epsilon$  hebben ieder een ITAM motief, terwijl de CD3- $\zeta$  homodimeer 6 van de 10 ITAMs in het hele TCR/CD3 complex heeft. Hierom wordt CD3- $\zeta$  als het belangrijkste signalerende onderdeel van het TCR/CD3 complex beschouwd.

Met deze kennis zijn we begonnen om de eigenschappen van de verschillende CD3 componenten in vivo te ontrafelen. Hiertoe hebben we muizen gemaakt die de CD3 componenten missen en transgene muizen waarin de muizen CD3 eiwitten zijn vervangen door de betreffende humane CD3 ketens. Omdat de CD3- $\gamma$  en CD3- $\delta$  genen op slechts 1.4Kb van elkaar liggen in het muizengenoom konden we beide genen samen verwijderen met slechts één gen deletie construct (**Hoofdstuk 2**). De afwezigheid van zowel CD3- $\gamma$  als CD3- $\delta$  leidde tot ingrijpende defecten in T cel ontwikkeling. The thymus van deze muizen bevat slechts 2-5% van het aantal cellen dat wordt gevonden in normale muizen, en TCR- $\alpha\beta$  T cellen kunnen zich niet verder ontwikkelen dan het DN3 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) stadium waar ook RAG-deficiente muizen niet voorbij komen. Ondanks de normale ontwikkeling en herschikking van de TCR- $\beta$ , - $\gamma$  and - $\delta$  loci kan het pre-TCR en  $\gamma\delta$  TCR complex niet aan de oppervlakte van thymocyten komen vanwege het ontbreken van CD3- $\gamma\delta$  in deze cellen. In tegenstelling tot muizen die alleen CD3- $\gamma$  of CD3- $\delta$  missen hebben onze CD3- $\gamma\delta$  deficiente muizen geen enkele TCR- $\gamma\delta$  T cellen. Het lijkt er dus op dat CD3- $\gamma$  en CD3- $\delta$  essentiële functies hebben voor zowel TCR- $\alpha\beta$  als TCR- $\gamma\delta$  T cel ontwikkeling die slechts gedeeltelijk door elkaar gecompenseerd kunnen worden.

Er lijkt een verschil te bestaan tussen mens en muis in de biologische functie van CD3- $\gamma$  voor T cel ontwikkeling: CD3- $\gamma$  deficiente muizen hebben een ander fenotype dan mensen die een mutatie in dit gen dragen. In de muis wordt een vroege blokkade in T cel ontwikkeling gevonden terwijl mensen slechts een milde lymfopenie voor  $\alpha\beta$  T cellen

hebben. Dit suggereert dat in het menselijke TCR/CD3 complex er uitwisselbare functies bestaan voor CD3- $\gamma$  en - $\delta$ . Om deze hypothese te testen hebben we in **Hoofdstuk 3** onze CD3- $\gamma\delta$  muizen gekruisd met muizen die een humaan CD3- $\delta$  transgen hebben. Deze  $\gamma\delta \times h\delta Tg$  muizen hebben verassenderwijs hetzelfde fenotype als patienten met een mutatie in CD3- $\gamma$ . De expressie van humaan CD3- $\delta$  is in staat om pre-TCR gedreven ontwikkeling van het DN naar het CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP stadium te bewerkstelligen. Edoch is de  $\alpha\beta TCR$  gedreven positieve en negatieve selectie minder efficiënt in deze  $\gamma\delta \times h\delta Tg$  muizen dan in normale muizen. Dit hebben we verder uitgewerkt in studies die de TCR-geïnitieerde signalen in thymocyten van  $\gamma\delta \times h\delta Tg$  muizen onderzocht. Verder is duidelijk geworden dat humaan CD3- $\delta$  een unieke rol vervult want zowel de ontwikkeling als functie van CD3- $\gamma\delta$  deficiënte T cellen kon niet worden hersteld wanneer deze een muis CD3- $\gamma$  transgen in zich droegen. Wij concluderen uit deze studies dat CD3- $\gamma$  en CD3- $\delta$  verschillende rollen vervullen in mens en muis voor de pre-TCR en TCR functie gedurende T cel ontwikkeling.

Het CD3- $\epsilon$  eiwit is ook essentieel voor T cel ontwikkeling want deletie van dit gen leidt tot een blokkade in T cel ontwikkeling in het DN3 stadium. Daar deze blokkade plaatsvindt voordat de TCR- $\beta$  geselecteerd is zijn thymocyten in de CD3- $\epsilon$  deficiënte muis niet in staat een pre-TCR aan hun oppervlakte te brengen. Omdat CD3- $\epsilon$  zich associeert met CD3- $\gamma$  en - $\delta$  is het niet onverwacht dat de afwezigheid van CD3- $\epsilon$  de expressie van het gehele TCR complex verhindert. Maar onze CD3- $\epsilon$  muis heeft ook een complexe incomplete expressie van CD3- $\gamma$  en - $\delta$ , wat analyse van de specifieke rol voor CD3- $\epsilon$  compliceert (**Hoofdstuk 4 en 5**). Deze onverwachte veranderingen in CD3- $\gamma$  en - $\delta$  wekken de vraag op of ze een gevolg zijn van het gebrek aan CD3- $\epsilon$  of een neveneffect van de insertie van de PKG-*Neo* cassette in een locus die de expressie van CD3- $\gamma$  en - $\delta$  reguleert. Om dit uit te zoeken hebben we het volle humane CD3- $\epsilon$  transgen in de CD3- $\epsilon$  deficiënte muis ingebracht. De reconstitutie van CD3- $\epsilon$  deficiënte muizen met het humane transgen (CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup>  $\times$  hTg $\epsilon$ ) kon expressie van CD3- $\gamma$  en - $\delta$  niet herstellen (**Hoofdstuk 5**). De thymocyten in deze CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup>  $\times$  hTg $\epsilon$  muis lijken erg op thymocyten in de CD3- $\epsilon$  deficiënte muis. Een verschil tussen deze twee muis lijnen is dat in CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup>  $\times$

hTgε muizen er een kleine groep prothymocyten, die CD3-γ en -δ tot expressie brengen, in staat bleek het eerste stadium (van CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> naar CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) te passeren naar het CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP en het SP stadium, en uiteindelijk zelfs een significante populatie volwassen T cellen in de periferie kon genereren. Deze resultaten leidden ons tot de conclusie dat CD3-ε de expressie van CD3-γ en -δ niet reguleert en het gebrek van deze eiwitten in de CD3-ε deficiënte muis een bijwerking van de PKC-*Neo* cassette is.

Het is een feit dat CD3-γ, -δ, -ε, en -ζ ketens, de invariable onderdelen van de pre-TCR-αβ en TCR, essentieel zijn voor de assemblage van het TCR/CD3 complex maar hoe de signalen van deze vier ketens precies geïntegreerd worden en de ontwikkeling van T cellen beïnvloedt moet verder worden uitgezocht. Omdat de insertie van de PGK-*Neo* cassette in de CD3-ε deficiënte muis tot complete suppressie van CD3-δ en lage expressie van CD3-γ leidde is het niet verrassend dat na kruising van de CD3-ε en -ζ deficiënte muizen alle vier de CD3 ketens niet tot expressie kwamen (**Hoofdstuk 4**). De thymus ontwikkeling in deze, de facto CD3-γδεζ deficiënte muis kwam tot stilstand in het CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>DN stadium vergelijkbaar met de RAG deficiënte muis. Omdat in dit stadium TCR-β genen-herschikking kan plaatsvinden wilden we dit proces onderzoeken in onze CD3-γδεζ deficiënte muizen. Met behulp van een DNA-PCR methode toonden we aan dat de afwezigheid van de CD3 ketens een meetbaar effect had op de Dβ naar Jβ en de Vβ naar DβJβ herschikking. Deze studies laten zien dat het CD3 complex vereist is voor de thymocyt ontwikkeling van DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) naar DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) maar niet vereist voor het stadium tot aan DN2.

De immunrespons door T cellen worden geïnitieerd wanneer hen immunogene peptiden, gebonden aan MHC, worden gepresenteerd door professionele antigeen presenterende cellen (APC). Het MHC molecuul moet hiervoor in contact komen met de TCR. Dit contact (signaal 1) leidt tot T cel activatie via een stapswijze initiatie van intracellulaire signaaleiwitten. Naast signaal 1 via de TCR is voor activatie een tweede signaal nodig dat wordt gegeven door een co-stimulator molecuul. Signaal 1 geeft de activatie specificiteit maar is niet afdoende voor volledige T cel activatie, en een co-stimulator signaal is

nodig om T cellen compleet en duurzaam te activeren. Dit co-stimulatorische signaal is niet antigeen-specifiek en kan door verschillende signaalmoleculen op de APC worden gegeven. Er is een grote verscheidenheid aan signaalmoleculen die verschillende maar ook gemeenschappelijke eigenschappen bezitten. Het ontrafelen van de precieze functies van deze moleculen vormt een grote uitdaging. Er zijn drie families van co-stimulatorische eiwitten: de B7:CD28 superfamilie, de TNF:TNFR familieleden zonder doodsdomein, en de CD2 superfamilie. Verder hebben sommige integrines ook co-stimulatorische eigenschappen

De co-stimulatorische receptoren van de SLAM familie behoren tot de CD2 groep van de Ig superfamilie, en hebben een functie in de synapse die T cellen en APC kunnen vormen. Negen familieleden van SLAM zijn geïdentificeerd op hematopoïetische cellen: SLAM, CD48, CD229, CD244, CD84, Ly108/NTB-A, CD319, SLAMF8 en SLAMF9. Het cytoplasmatische deel van 6 van deze receptoren bevatten een zogenaamd 'intracellulair tyrosine-based switch motief' (ITSM), welk een hoge affiniteit heeft voor de signaal eiwitten SLAM-associated protein (SAP) en EWS/FLI activated transcript-2 (EAT2) die elk een enkel SH2 domein hebben. Het besef dat SLAM een co-stimulatorisch eiwit was kwam aanvankelijk uit observaties dat SLAM T cellen kon activeren en zich associeerde met SAP. SAP/EAT2 afhankelijke en onafhankelijke werving van intracellulaire moleculen leidt tot remmende en activerende signalen zodra deze familie van receptoren wordt geactiveerd. Vervolgens bepaalt de integratie van verschillende signaal netwerken welke effector functies worden uitgevoerd, wat afhankelijk is van het celtype en hun stadium van activatie. In dit proefschrift hebben we ons toegelegd op het bestuderen van SLAM, de prototypische receptor van deze familie

De genen voor de SLAM familie liggen zowel in mens als muis op chromosoom 1, en zeven genen van deze familie liggen binnen een 400Kb gebied. In **Hoofdstuk 6** beschrijven we de SLAM genen in mens en muis, die beide uit zeven exons bestaan uitgespreid over ongeveer 32Kb. In de muis komt SLAM tot expressie in thymocyten en zowel geheugen CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> T cellen. T helper 1 (Th1) cellen brengen veel SLAM tot expressie en Th2 cellen slechts weinig, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP thymocyten veel en SP thymocyten weinig. SLAM wordt in muizen, net als in humane, T cellen snel opgereguleerd wanneer deze cellen geactiveerd worden.

SLAM bindt zichzelf, een zogenaamde homotypische binding, en is zoals vermeld een co-stimulatorische receptor. Vroege studies lieten zien dat een anti-SLAM antilichaam humane T cellen kon aanzetten tot IFN $\gamma$  productie en Th2 cellen naar een Th0/Th1 fenotype kon terugbrengen. Anti-SLAM had geen effect op Th2 cytokine productie, wat tezamen een rol suggereerde voor Th1 differentiatie. Omdat SAP met hoge affiniteit bindt aan de eerste gefosforyleerde of ongefosforyleerde ITSM van het cytoplasmatische deel van SLAM lijkt SAP een rol te spelen in de signalerende rol van SLAM. Echter, SAP deficiënte muizen hebben een defect in Th2 cytokine productie en dit lijkt aan te geven dat SLAM mogelijk een positief signaal geeft voor Th2 differentiatie in plaats van Th1 differentiatie. Hiermee in overeenstemming vonden wij dat T cellen van SLAM deficiënte muizen nauwelijks tot geen Th2 cytokinen (IL-4 en IL-13) kunnen produceren wanneer de TCR wordt geactiveerd (**Hoofdstuk 7**). Deze deficiëntie in IL-4 productie kon worden bevestigd met antigeen-specifieke TCR transgene T cellen, APC en het betreffende peptide. En in tegenstelling tot anti-SLAM antilichamen die IFN $\gamma$  induceerden konden SLAM deficiënte Th1 cellen nagenoeg evenveel IFN $\gamma$  produceren als normale T cellen. Deze bevindingen, het feit dat SAP het eiwit FynT naar SLAM recruteert en de wetenschap dat mutaties in SLAM, SAP en FynT alle leiden tot defectieve Th2 cytokine productie onderbouwen onze stelling dat signalen via SLAM/SAP/FynT essentieel zijn voor Th2 differentiatie.

Daar SLAM op vele verschillende cellen van het hematopoietische systeem tot expressie komt lijkt het aannemelijk dat SLAM ook een rol speelt op andere cellen dan T cellen. Hiermee in overeenstemming vonden wij een vermindering in de productie van IL-12, TNF $\alpha$  en NO door SLAM deficiënte macrofagen wanneer zij met LPS werden gestimuleerd (**Hoofdstuk 7**). Om te bevestigen dat de afwezigheid van SLAM ook een rol speelde in T cell differentiatie en macrofaag activatie in vivo hebben we SLAM deficiënte muizen geïnfecteerd met de parasiet *Leishmania major* (*L.major*). Deze infectie wordt algemeen geaccepteerd als een goed model voor Th1 en Th2 differentiatie en voor het functioneren van macrofagen. We vergeleken *L.major* infectie in SLAM deficiënte muizen van de C57BL/6 en BALB/C lijnen. SLAM<sup>-/-</sup> C57BL/6 muizen waren ontvankelijk voor *L.major* infectie in tegenstelling tot normale C57BL/6 muizen die de infectie eenvoudig klaren. Deze ontvankelijkheid werd aangetoond door verhoogde



parasieten titers in de SLAM deficiënte muizen in vergelijking met de normale muizen. Dit was in overeenstemming met het eerder vermelde defect in IL-12, TNF $\alpha$  en NO productie in SLAM deficiënte macrofagen.

Th2 cytokinen zoals IL-4, IL-5, IL-9 en IL-13 spelen een belangrijke rol in de productie van IgE en dragen bij aan allergische eosinofiele ontstekingen en veranderingen in de luchtwegen. Omdat SLAM deficiënte CD4<sup>+</sup> T cellen mogelijk een defect in Th2 differentiatie dragen hebben we de rol van SLAM in een luchtweg allergie model bestudeerd (**Hoofdstuk 8**). SLAM deficiënte muizen van de BALB/c lijn werden gesensitizeerd en vervolgens herhaaldelijk blootgesteld aan ovalbumine (OVA) via een vernevelaar. Na drie blootstellingen aan OVA werd de luchtweg reactiviteit en ontsteking gemeten. Wij vonden dat SLAM deficiënte muizen significant minder luchtweg reactiviteit hadden dan gewone BALB/c muizen, en dat zowel Th1 als Th2 cytokinen verminderd waren. Deze resultaten toonden aan dat SLAM betrokken is bij antigeen-gedreven luchtweg reactiviteit en ontsteking.

De bevindingen in dit proefschrift hebben bijgedragen aan een beter begrip van de rol die verschillende CD3 onderdelen spelen bij vroege T cel ontwikkeling en de essentiële rol die SLAM speelt in de activatie van T cellen en macrofagen. Wij hopen dat ons werk zal bijdragen aan de ontwikkeling van therapieën voor ziekten die geassocieerd zijn met SAP/EAT2 afhankelijk en onafhankelijke SLAM signaaltransductie, zoals bijvoorbeeld de immuundeficiëntie XLP, mazelen infectie en lupus.