



***Enkel-keten antilichamen tegen
actinebindende eiwitten als tool voor
het bestuderen en reguleren van de
immuunrespons in dendritische cellen***

Nincy DEBEUF

Verhandeling ingediend tot
het verkrijgen van de graad van
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. *Jan Gettemans*
Vakgroep *Biochemie (GE07)*

Academiejaar 2013-2014



FACULTEIT GENEESKUNDE EN
GEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN

***Enkel-keten antilichamen tegen
actinebindende eiwitten als tool voor
het bestuderen en reguleren van de
immuunrespons in dendritische cellen***

Nincy DEBEUF

Verhandeling ingediend tot
het verkrijgen van de graad van
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. *Jan Gettemans*
Vakgroep *Biochemie (GE07)*

Academiejaar 2013-2014

“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.”

Datum

(handtekening student)

(handtekening promotor)

(Naam student)

(Naam promotor)

Voorwoord

Tijdens het schrijven van deze masterproef werd ik mij ervan bewust dat ik vijf jaar geleden de juiste keuze heb gemaakt om Biomedische Wetenschappen te studeren. Bovendien ben ik overtuigd om verder wetenschappelijk onderzoek te doen. Dit positief gevoel bij mijn masterproef was echter niet mogelijk geweest zonder de steun van een aantal mensen die ik bij deze wil bedanken.

Ongetwijfeld gaat mijn grootste dank uit naar mijn begeleidster, Isabel Van Audenhove. Ik kon mij geen betere begeleidster dromen. Het was een plezier om met u samen te werken, na te denken en te discussiëren. Ik zal nog vaak terugdenken aan hoe we uitgeput terugkwamen van een Neon[®] transfectie of aan toen u mijn glimlach kwam opzoeken na uren microscopie. Verder antwoordde u steeds snel, duidelijk en geduldig op mijn ontelbare vragen, waardoor ik ontzettend veel heb bijgeleerd.

Uiteraard bedank ik ook mijn promotor, Prof. Dr. Jan Gettemans. Dankzij u kreeg ik de kans om in een bijzonder fijne onderzoeksgroep te werken op een heel interessant onderwerp. Toen u in 3^{de} Bachelor les gaf over nanobodies was ik enorm geboeid en het was dan ook boeiend om nanobodies in praktijk te gebruiken.

Bedankt ook aan de anderen van de onderzoeksgroep voor de aangename sfeer die jullie creëerden, met speciale dank aan Ciska voor uw technische hulp. De vrijwillige bloeddonoren onder jullie bedank ik bovendien voor jullie prachtige dendritische cellen.

Dank u wel aan mijn ouders, die mij steunden in de vorm van bemoedigende woorden, humor, vitamientjes en eveneens dendritische cellen.

Ten slotte bedank ik iedereen die interesse toonde voor mijn onderzoek en aan wie ik in gewone mensentaal mocht uitleggen waarop ik werkte.

Hartelijk dank!

Nincy

Inhoudstafel

Lijst van gebruikte afkortingen.....	
Samenvatting / summary	1
1. Inleiding	2
1.1 Enkel-keten antilichamen en nanobodies	2
1.1.1 Conventionele antilichamen.....	2
1.1.2 Zware-keten antilichamen en nanobodies.....	3
1.1.2.1 Structuur en eigenschappen.....	3
1.1.2.2 Aanmaak antigeenspecifieke nanobodies.....	5
1.1.2.3 Biotechnologische toepassingen van nanobodies.....	5
1.1.2.4 Nanobodies in diagnostiek en therapie.....	6
1.2 Dendritische cellen (DCs).....	7
1.2.1 De brug tussen aangeboren en adaptieve immuniteit.....	7
1.2.1.1 Dendritische cel maturatie.....	7
1.2.1.2 Antigenpresentatie.....	7
1.2.1.3 Rol in centrale en perifere tolerantie.....	8
1.2.2 Morfologische veranderingen tijdens maturatie.....	9
1.2.3 Plasticiteit van DCs: verschillende fenotypes en subsets.....	9
1.2.4 Dendritische cellen in ziekteprocessen.....	9
1.2.5 DC-gebaseerde therapeutische vaccins.....	10
1.3 Podosomen.....	10
1.3.1 Structuur van podosomen.....	10
1.3.2 Regulatie van podosomen.....	12
1.3.3 Podosomen versus invadopodia.....	12
1.3.4 Podosomen in dendritische cellen.....	12
1.3.5 Podosomen <i>in vivo</i>	13
1.4 Fascine.....	13
1.4.1 Structuur van fascine.....	13
1.4.2 Regulatie van fascine.....	14
1.4.3 Rol van fascine in migratie en invasie.....	14
1.4.4 Fascine in dendritische cellen.....	15
1.5 Cortactine en zijn homoloog HS1.....	15

1.5.1	Structuur van cortactine.....	15
1.5.2	Regulatie van cortactine.....	16
1.5.3	Rol van cortactine in migratie en invasie.....	16
1.5.4	Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1).....	17
1.5.5	Cortactine en HS1 in dendritische cellen.....	18
1.6	Doelstelling van deze masterproef.....	18
2.	Materiaal en methoden.....	19
2.1	Antilichamen en reagentia.....	19
2.2	DNA constructen.....	19
2.3	Cultivatie dendritische cellen	20
2.4	Fasecontrastmicroscopie.....	20
2.5	Transfectie.....	20
2.6	Coating van coverslips.....	21
2.7	Immuunkleuring en fluorescentiemicroscopie.....	21
2.8	Cel morfologische analyses	22
2.9	Pull-down assays.....	22
2.10	SDS-PAGE en Western blotting.....	23
2.11	Weergave van resultaten.....	23
2.12	Statistische analyses.....	23
3.	Resultaten.....	24
3.1	Differentiatie tot dendritische cellen.....	24
3.1.1	Morfologie van gecultiveerde DCs.....	24
3.1.2	Opbrengst van DC differentiatie.....	25
3.1.3	Fascin-, cortactine- en HS1-expressie nemen toe tijdens differentiatie.....	25
3.1.4	Colocalisatie van cortactine en HS1 in DCs.....	27
3.2	Maturatie van DCs.....	27
3.2.1	Fascin-expressie stijgt bij maturatie.....	27
3.2.2	Efficiëntie van DC maturatie.....	27
3.2.3	Podosoomverlies tijdens maturatie.....	28
3.2.4	Mature DCs zijn minder gepolariseerd.....	29
3.2.5	Minder matrixdegradatie door mature DCs.....	30
3.3	Karakterisatie-experimenten van nanobodies.....	31
3.3.1	Algemene kenmerken.....	31
3.3.2	Pull-down experimenten.....	32

3.3.3 Intracellulaire delokalisatie-experimenten.....	32
3.4 Functionele experimenten met nanobodies.....	34
3.4.1 Effect op filopodia-aantal en -lengte.....	34
3.4.2 Effect op podosoomaantal en -densiteit.....	36
3.4.3 Effect op polarisatie.....	39
3.4.4 Effect op matrixdegradatie.....	40
3.5 Samenvattende tabel.....	40
4. Bespreking.....	41
4.1 DCs als gastheer van de nanobodies.....	41
4.2 Karakterisatie-experimenten van nanobodies.....	42
4.3 Functionele experimenten met nanobodies.....	42
4.3.1 Minder en kortere filopodia met FASNb5 en CORNb2.....	43
4.3.2 Podosoomdaling met FASNb5.....	44
4.3.3 Podosoomdaling met CORNb2.....	44
4.3.4 FASNb2 en CORNb2 beïnvloeden DC spreiding.....	45
4.3.5 FASNb5 en CORNb2 inhiberen DC polarisatie.....	45
4.3.6 Effecten van nanobodies op matrixdegradatie?.....	46
4.4 Besluit.....	46
Addendum.....	
A. Lentivirale transductie.....	
A.1 Lentivirus productie.....	
A.2 Virale titerbepaling.....	
A.3 Transductie.....	
B. JetPRIME® (Polyplus transfection) transfectie.....	
C. JetPEI® (Polyplus transfection) transfectie.....	

Lijst van gebruikte afkortingen

Arp2/3	Actin-related protein 2/3 complex ¹
CDR	Complementary determining region
CH	Constant domein van de zware polypeptideketen van een antilichaam
CL	Constant domein van de lichte polypeptideketen van een antilichaam
DC	Dendritische cel
ECM	Extracellulaire matrix
Fab	Antigeenbindend fragment van een antilichaam
Fc	Constant fragment van een antilichaam
GFP	Groen fluorescerend eiwit
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HcAb	Zware-keten antilichaam
HI-FBS	Hitte-geïnactiveerd foetaal kalfserum
HRP	Horseradish peroxidase
HS1	Hematopoietic lineage cell-specific protein 1
IgG	Immunoglobuline G
IgNAR	Immunoglobuline nieuwe antigeen receptor
IL	Interleukine
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix metalloprotease
NPF	Nucleatie-bevorderende factor
NTA	N-terminal acidic domein van cortactine
PBMC	Perifere mononucleaire bloedcel
PKC	Proteïne kinase C
SD	Standaarddeviatie
SH	Src homology domain
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
VH	Variabel domein van de zware polypeptideketen van een antilichaam
VHH	Nanobody, variabel domein van een zware-keten antilichaam
VL	Variabel domein van de lichte polypeptideketen van een antilichaam

¹ Engelse termen waarvan de Nederlandse vertaling niet gebruikelijk is, werden in het Engels behouden.

WAS	Wiskott-Aldrich syndroom
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WIP	WASP-interacting protein

Samenvatting / Summary

Naast conventionele antilichamen bevatten *Camelidae* eveneens enkel-keten antilichamen (HcAbs), waarvan het antigeenbindend fragment een nanobody wordt genoemd. Dankzij hun enkel-domein structuur, hoge specificiteit, affiniteit en stabiliteit zijn nanobodies in staat structurele eiwitten te moduleren. In deze masterproef werden nanobodies aangewend tegen de actinebindende eiwitten fascine en cortactine om specifieke functies in dendritische cellen (DCs) te bestuderen. Verstoring van de actinebundelende activiteit van fascine met FASNb5 resulteerde in een gereduceerde filopodialengte en minder filopodia en podosomen. Echter, podosoomdaling werd ook bij mature DCs gezien, die gekenmerkt worden door een verhoogde fascine-expressie. Voor CORNb2, het nanobody dat specifiek het SH3 domein van cortactine bindt, was de podosoomdaling het meest uitgesproken, al was er ook een afname van filopodia-aantal en -lengte. FASNb5- en CORNb2-expresserende DCs waren bijgevolg minder gepolariseerd, wat doet vermoeden dat hun directionele migratie is aangetast, een eigenschap die net cruciaal is voor geactiveerde DCs. Samengevat illustreert deze masterproef het belang van fascine actinebundeling en het cortactine SH3 domein in filopodia en podosomen van DCs en toont bovendien aan dat nanobodies in staat zijn deze functies te moduleren.

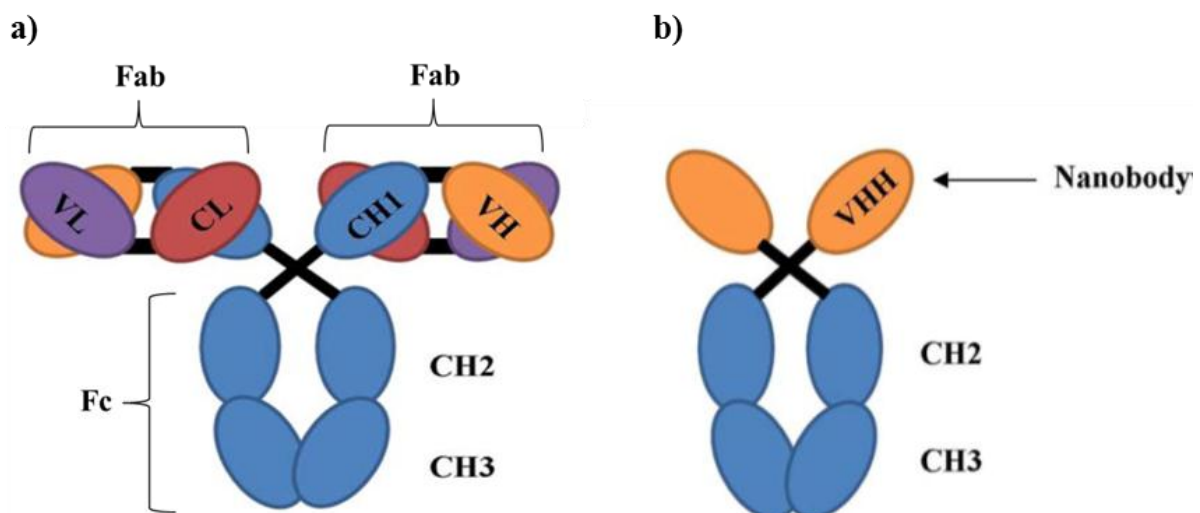
Besides conventional antibodies, species of the *Camelidae* family have single-chain antibodies (HcAbs), of which the antigen binding fragment is called a nanobody. Because of their single-domain structure, high specificity, affinity and stability, nanobodies are able to modulate structural proteins. In this master dissertation, nanobodies were used against two actin binding proteins, fascin and cortactin, in order to study their specific functions in dendritic cells (DCs). FASNb5 that disrupts fascin F-actin bundling, resulted in less podosomes and filopodia, the latter were also smaller. Remarkably, mature DCs, characterized by elevated fascin expression, also have less podosomes. Expression of CORNb2, that binds the cortactin SH3 domain, reduced even more the number of podosomes and to a lesser extent the number and length of filopodia. As a result, FASNb5- and CORNb2-expressing DCs were less polarised, which suggests disruption of directional migration, a characteristic of activated DCs. In conclusion, this master dissertation emphasises the role of actin bundling by fascin and the SH3 domain of cortactin in filopodia and podosomes of DCs. Moreover, this demonstrates that nanobodies are able to modulate these specific functions.

1. Inleiding

1.1 Enkel-keten antilichamen en nanobodies

1.1.1 Conventionele antilichamen

Een antilichaam is de oplosbare vorm van een antigeenspecifieke B-cel receptor en wordt gesecreteerd door plasmacellen als verdediging tegen pathogenen [1]. Antilichamen kunnen worden verdeeld in vijf isotypes die verschillen in aantal constante domeinen en glycosyleringsgraad. Immunoglobuline G (IgG) antilichamen (150 kDa), het meest abundante isotype, zijn Y-vormige structuren opgebouwd uit twee identieke zware (H) en lichte (L) polypeptideketens (**Figuur 1a**), met elkaar verbonden door covalente disulfidebruggen en niet-covalente bindingen. Op basis van calpain-verbinding worden in een antilichaam een constant fragment (Fc) en twee identieke antigeenbindende fragmenten (Fabs) onderscheiden. Het Fc fragment van een IgG antilichaam is opgebouwd uit het CH2 en CH3 domein van de zware ketens, die instaan voor effectorfuncties binnen het immuunsysteem. De Fc regio is met de Fab fragmenten verbonden via een scharnierregio die ervoor zorgt dat de twee identieke Fab fragmenten onafhankelijk van elkaar kunnen bewegen. Een Fab regio bestaat uit twee constante (CH1 en CL) en twee variabele domeinen (VH en VL). De specificiteit en affiniteit van een antilichaam worden grotendeels bepaald door de 'complementary determining regions' (CDRs) van de variabele domeinen (**Figuur 2**). CDRs zijn de meest variabele gebieden binnen de Fab regio waarvan de in de secundaire structuur gevormde lussen complementair zijn met een antigeen [2].



Figuur 1. Schematische voorstelling van een conventioneel IgG antilichaam (a) en een zware-keten antilichaam (b). a) Conventionele antilichamen zijn opgebouwd uit een constant fragment (Fc) dat het tweede (CH2) en derde (CH3) constant domein van de twee zware ketens bevat, en twee antigeenbindende fragmenten (Fabs). Fabs bevatten het eerste constant domein (CH1) en het variabel domein van de zware keten (VH), evenals het constant (CL) en variabel domein (VL) van de lichte keten. b) Zware-keten antilichamen bevatten enkel zware ketens die zijn opgebouwd uit twee constante domeinen (CH2 en CH3) en een antigeenbindend fragment of nanobody (VHH) (Aangepast uit [3]).

De antilichaam technologie kende een sterke groei sinds Köhler en Milstein in 1975 de hybridoma technologie beschreven [4]. Deze techniek laat toe op grote schaal monoklonale antilichamen *in vitro* te produceren en bestaat eruit B-lymfocyten van een geïmmuniseerd dier te fusioneren met een muis myelomacel. De bekomen hybridoma's kunnen in cultuur gebracht worden en zullen antigeenspecifieke antilichamen produceren. Het feit dat deze antilichamen bij de mens een anti-muis immuunrespons induceerden, leidde tot de productie van chimere en gehumaniseerde antilichamen en zelfs tot transgene muizen die volledig humane antilichamen produceren [5].

Conventionele antilichamen hebben evenwel ook hun nadelen. Zo is er een hoge productiekost en kan het Fc fragment leiden tot (ongewenste) immunologische effectorfuncties [5]. Dit leidde tot de ontwikkeling van antilichaam fragmenten, zoals het Fab fragment, het enkel-keten variabel fragment (VH+VL) en VH en VL afzonderlijk. Echter, er blijven tekortkomingen bestaan met betrekking tot stabiliteit, protease resistentie, oplosbaarheid en expressieniveau, welke onder andere te wijten zijn aan de vereiste interacties tussen de lichte en zware ketens [6]. De ontdekking dat *Camelidae* antilichamen bevatten met enkel zware ketens, omzeilde dit probleem en gaf aanleiding tot de zogenaamde nanobodies.

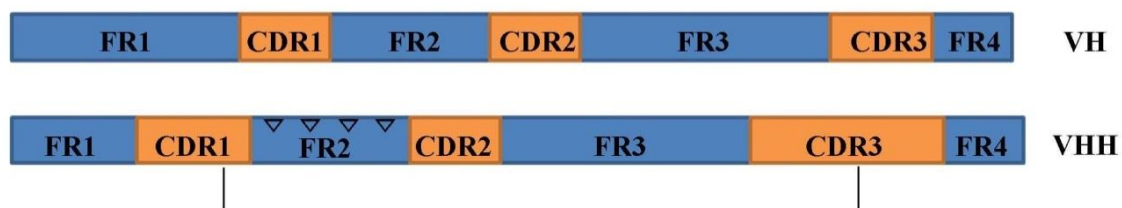
1.1.2 Zware-keten antilichamen en nanobodies

1.1.2.1 Structuur en eigenschappen

Hamers-Casterman *et al.* beschreven in 1993 voor het eerst dat dromedarissen niet enkel conventionele, maar ook zware-keten antilichamen (HcAbs) bevatten die de lichte ketens missen [7]. HcAbs worden ook teruggevonden in andere leden van de *Camelidae* familie (kamelen, alpaca's, lama's), evenals in sommige bakerhaaien waar ze immunoglobuline nieuwe antigeen receptoren (IgNARs) worden genoemd. Het Fc fragment van een HcAb is sterk vergelijkbaar met de Fc regio in conventionele antilichamen. Daarentegen mist het antigeenbindend fragment een lichte keten en een CH1 domein, waardoor de antigeen

bindingsplaats gevormd wordt door een enkel variabel domein, een nanobody of VHH (**Figuur 1b**) [8].

Kenmerkend voor nanobodies is het feit dat de CDR3 regio lange, convexe extensies kan vormen waardoor ze cryptische structuren kunnen herkennen die ontoegankelijk zijn voor conventionele antilichamen. Deze hebben namelijk een eerder vlakke of concave antigeen bindingsplaats [9]. Daarnaast zijn hydrofiele aminozuursubstituties in ‘framework’ regio 2 verantwoordelijk voor de hoge stabiliteit en oplosbaarheid van nanobodies (**Figuur 2**). In conventionele antilichamen zorgen hydrofobe interacties hier voor de binding van de lichte aan de zware keten [8].



Figuur 2. Organisatie van een VH en VHH domein. VH en VHH domeinen bevatten vier ‘framework’ regio’s (FR1-4) en drie ‘complementary determining regions’ (CDR1-3). VHHs hebben een grotere CDR1 en CDR3 regio, dragen aminozuursubstituties (weergegeven met ∇) in FR2 en bevatten vaak een extra disulfidebrug tussen CDR1 en CDR3 [3].

Ondanks deze verschillen zijn de framework regio’s van VHHs meer dan 80% homogool met die van humane antilichamen. Bovendien kunnen ze mits enkele aminozuursubstituties gehumaniseerd worden tot 95-99% homologie [10]. Deze lage immunogeniciteit maakt nanobodies aantrekkelijk als therapeutica.

Door hun enkel-domein structuur vertonen nanobodies een hoge affiniteit die niet kan bekomen worden door een afzonderlijk conventioneel VH of VL fragment. De kleine afmetingen (15 kDa-eiwitten met een diameter van 2.8 nm) zorgen er ook voor dat nanobodies gemakkelijk weefsels kunnen penetreren [10,11]. Hoewel de reducerende omgeving van het cytoplasma disulfidebruggen kan verbreken, zijn nanobodies toch in staat hun bindingsactiviteit te behouden [3]. Daarnaast zijn nanobodies uitermate stabiel bij hoge temperatuur, extreme pH en in aanwezigheid van een detergent, een denaturerend agens en proteasen, wat het nanobody zou toelaten de passage door de maag te overleven [8].

De enkel-domein opbouw van nanobodies en hun hydrofiliciteit maken goedkope productie in bacteriën en gisten mogelijk. Ook kunnen nanobodies eenvoudig gekoppeld worden als bivalente en bispecifieke constructen die respectievelijk twee dezelfde en twee verschillende antigenen herkennen. Van klinisch belang hierbij is de koppeling met een nanobody dat

albumine herkent, waardoor de halfwaardetijd van het therapeutisch nanobody wordt verlengd [9].

1.1.2.2 Aanmaak antigeenspecifieke nanobodies

Nanobody-productie start met de immunisatie van *Camelidae* met het antigeen van interesse. Vervolgens wordt RNA, geëxtraheerd uit bloed lymfocyten, gebruikt voor cDNA synthese met een oligo(dT)primer. De verkregen nanobody-coderende DNA-moleculen worden in een faagmide vector gekloneerd, waarna de recombinante faagpartikels de nanobodies op hun oppervlak tot expressie brengen. Dit laat toe de antigeenspecifieke nanobodies te selecteren via binding aan geïmmobiliseerd antigeen. Deze selectiemethode, ook wel panning genoemd, wordt enkele malen herhaald. Het cDNA van de geselecteerde faagmiden kan vervolgens in een nieuwe expressievector worden gebracht voor productie [3].

1.1.2.3 Biotechnologische toepassingen van nanobodies

Nanobodies werden reeds succesvol gebruikt in affiniteitschromatografie [12] en X-straal kristallografie [13] en bieden verder potentieel om specifieke eiwit-eiwit interacties te bestuderen in combinatie met massaspectrometrie [3].

Via een eukaryote expressievector kunnen nanobodies intracellulair (als intrabodies) tot expressie gebracht worden. Indien nanobodies gekoppeld worden aan fluorescente eiwitten zoals groen fluorescerend eiwit (GFP) (een chromobody) kunnen ze antigenen tot op subcellulair niveau traceren [9]. Intrabodies zijn in staat biologische processen te moduleren of inhiberen. Bijvoorbeeld tegen actineregulerende eiwitten (L-plastine, CapG en gelsoline) zijn nanobodies geïdentificeerd die kankercel motiliteit, invasie en metastase kunnen inhiberen door het moduleren van de actinebindende of -bundelende eigenschappen [14,15,3]. Ook in immuuncellen kunnen nanobodies een effect hebben op immuunsynapsvorming, T-cel proliferatie en podosoomassemblage [16,17].

RNA interferentie (RNAi) is een andere methode om intracellulair eiwitfuncties uit te schakelen. Echter, RNAi veroorzaakt soms aspecifieke effecten en schakelt bovendien alle eiwitfuncties uit, terwijl nanobodies specifiek bepaalde eiwitfuncties of -domeinen kunnen blokkeren [18].

1.1.2.4 Nanobodies in diagnostiek en therapie

De mogelijkheid om nanobodies te modificeren zonder verlies van hun biologische activiteit en goede weefselpenetratie, leidde tot heel wat medische toepassingen. Nanobodies kunnen gelabeld worden met technetium-99m als diagnostische tool, waardoor bijvoorbeeld atherosclerotische plaques in muizen konden worden gevisualiseerd [19]. In de diagnostiek van prostaatkanker kunnen nanobodies gebruikt worden die de verschillende isovormen van prostaatspecifiek antigeen onderscheiden om zo te achterhalen in welk stadium de prostaatkanker zich bevindt [20].

In therapie bieden nanobodies veel mogelijkheden vermits ze in staat zijn moleculaire interacties te blokkeren. Een nanobody dat epidermale groeifactor verhindert te binden met zijn receptor, bleek succesvol voor de behandeling van solide tumoren in een xenograft muismodel [21]. Nanobodies zijn ook therapeutisch werkzaam door de fusie met enzymen. Het targetten van carcino-embryonaal antigeen met een specifiek nanobody gekoppeld aan β -lactamase (in staat om een geïnjecteerde niet-toxische prodrug om te zetten in een cytotoxische drug) bleek een succesvolle behandeling voor solide muistumoren [11].

Het feit dat nanobodies niet spontaan door de plasmamembraan gaan, is een beperking om nanobodies tegen intracellulaire eiwitten als therapeutica te gebruiken. Echter, Li *et al.* (2012) toonden aan dat kationische nanobodies astrocyten konden binnendringen [22]. Ook werd reeds succesvol gebruik gemaakt van het type III secretie systeem dat sommige enteropathogene *Escherichia coli* stammen bevatten. Deze zijn in staat om door middel van 'een moleculaire naald' effectormoleculen in de doelwitcel te injecteren, waardoor bijvoorbeeld CapG nanobodies geïnjecteerd konden worden in het cytoplasma van humane borstkankercellen [15].

Tot op vandaag zijn er nog geen geneesmiddelen op de markt gebaseerd op nanobodies, maar de nabije toekomst is veelbelovend. Ablynx (www.Ablynx.com), een onderneming die zich bezighoudt met de ontwikkeling van therapeutische nanobodies, heeft momenteel dertig projecten in de pijplijn en zeven nanobodies in klinische ontwikkeling. Daarvan zitten er drie nanobodies in een fase II klinische studie. Caplacizumab is een nanobody gericht tegen von Willebrand factor en wordt als antitromboticum getest. Ozoralizumab (anti-tumor necrosis factor- α (anti-TNF- α)) en ALX-0061 (anti-interleukine-6 (anti-IL-6)) zijn nanobodies ontwikkeld voor de behandeling van reumatoïde artritis.

1.2 Dendritische cellen (DCs)

1.2.1 De brug tussen aangeboren en adaptieve immuniteit

Dendritische cellen (DCs) zijn niet alleen merkwaardig door hun vertakte en dynamische morfologie, maar tevens omdat ze als professionele antigeenpresenterende cellen als enige in staat zijn om naïeve T-cellen te activeren en zo een adaptieve immunrespons te initiëren. Inderdaad, in de perifere weefsels zullen immature DCs antigenen (micro-organismen, allergenen, tumoreiwitten...) capteren, via fagocytose, macropinocytose en/of receptor-gemedieerde endocytose. Samen met inflammatoire cytokines (TNF- α , IL-1) of pathogeen-afgeleide moleculen zoals lipopolysaccharide (LPS) induceert deze antigeencaptatie een maturatie programma in de DC, via activatie van de transcriptiefactor nuclear factor- κ B [1].

1.2.1.1 Dendritische cel maturatie

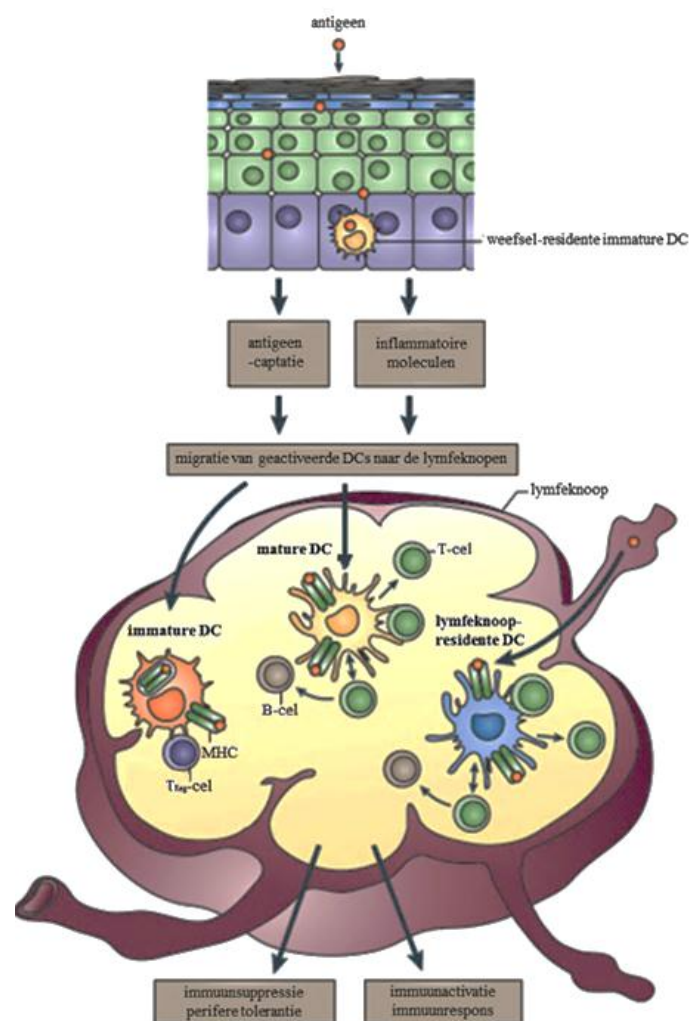
Maturatie is een continu proces dat gepaard gaat met veranderingen in morfologie, een afname in antigeencapterende activiteit, verhoogde expressie van oppervlakte major histocompatibility complex (MHC) moleculen klasse II en costimulatorische moleculen (CD40, CD80/86), expressie van chemokine receptoren (vb. CCR7) en het secreteren van verscheidene cytokines (vb. IL-12) die T-cel differentiatie controleren. Deze maturatie induceert de migratie van de DCs naar de lymfoïde organen waar ze antigeenspecifieke naïeve en effector lymfocyten activeren (**Figuur 3**). Antigenen kunnen via de lymfe ook direct lymfeknoop-residente DCs bereiken die het peptide vervolgens presenteren aan naïeve CD4⁺ T-cellen, wat resulteert in T-cel activatie, proliferatie en klonale expansie. DCs uit de perifere weefsels zullen het gecapteerde antigeen dan presenteren aan de reeds geactiveerde CD4⁺ T-cellen, wat leidt tot de generatie van effector T-cellen [23].

1.2.1.2 Antigeenpresentatie

Intracellulaire antigenen worden gepresenteerd in de context van MHC klasse I moleculen en worden herkend door cytotoxische T-lymfocyten, net als sommige extracellulaire peptiden (zogenaamde cross-presentatie). Extracellulaire antigenen komen evenwel meestal in endocytotische vesikels terecht, die versmelten met vesikels rijk aan MHC klasse II moleculen, hieraan binden en zo gepresenteerd worden aan T-helper cellen die immunoregulatorische effecten hebben [1].

1.2.1.3 Rol in centrale en perifere tolerantie

DCs spelen ook een rol in centrale en perifere tolerantie. In de thymus presenteren DCs lichaamseigen antigenen aan ontwikkelende T-cellen die bij een hoge affiniteit voor het gepresenteerde antigeen-MHC complex afsterven, een proces dat negatieve selectie wordt genoemd. Echter, niet alle lichaamseigen antigenen worden gepresenteerd in de thymus tijdens T-cel ontwikkeling (vb. hersenen- of pancreasafgeleide peptiden) [24]. In de secundaire lymfoïde organen treedt tolerantie op in steady state, doordat antigeenpresentatie gebeurt in afwezigheid van costimulatoire en/of inflammatoire moleculen. Dit leidt tot T-cel anergie, T-cel deletie of inductie van regulatoire T-cellen (**Figuur 3**) [23].



Figuur 3. De rol van dendritische cellen (DCs) bij de inductie van een immuunrespons. Immature DCs capteren antigenen in de perifere weefsels, wat in aanwezigheid van inflammatoire moleculen een maturatie programma in de DCs induceert. In de lymfeknopen zullen mature DCs het gecapteerde antigeen aan T-cellen presenteren met behulp van major histocompatibility complex (MHC) moleculen en zo het adaptief immuunsysteem activeren. In afwezigheid van inflammatie behouden DCs hun immatuur fenotype en antigeenpresentatie leidt vervolgens tot perifere tolerantie door inductie van regulatoire T-cellen (T_{Reg}) (Aangepast uit [23]).

1.2.2 Morfologische veranderingen tijdens maturatie

Zoals reeds vermeld, gaat DC maturatie gepaard met morfologische veranderingen. Met elektronen- en fasecontrastmicroscopie kon worden waargenomen dat immature DCs zowel dunne als bladvormige uitlopers dragen in alle richtingen van de cel [24]. Immature DCs zijn niet-adherent in cultuur en vormen zwevende klompjes. Echter, in aanwezigheid van een tweedimensionaal substraat gaan ze spontaan adhereren met behulp van podosoomstructuren (zie 1.3). Maturatie-inductie door een inflammatoire stimulus leidt aanvankelijk tot een korte afwezigheid van podosomen en een toename van focale adhesies. Hierdoor worden de geactiveerde DCs geïmmobiliseerd, wat antigeencaptatie bevordert. Na ongeveer een uur worden opnieuw podosomen gevormd aan het celfront, evenals lamellipodia en filopodia. De cel is gepolariseerd. Dit migratorisch fenotype laat DCs *in vivo* toe de weefsels te verlaten. Vier tot acht uur na maturatie-inductie verdwijnen de podosomen opnieuw, wordt de cel rond met meer membranaire plooien en daalt de adhesieve capaciteit finaal [25,26].

1.2.3 Plasticiteit van DCs: verschillende fenotypes en subsets

Plasticiteit is een sleutelwoord als het om DCs gaat aangezien er verschillende subtypes worden onderscheiden waarvan functie en fenotype nog worden beïnvloed door de omgevingsmoleculen waaraan de cel wordt blootgesteld. Zo kunnen er verschillende DC fenotypes ontstaan na maturatie, afhankelijk van de pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen en de cytokines geproduceerd door omgevende immuuncellen, waardoor verschillende T-cel subsets geactiveerd worden [23].

1.2.4 Dendritische cellen in ziekteprocessen

DCs zijn betrokken in tal van ziekteprocessen. Meest voor de hand liggend is de verdedigende rol tegen pathogenen. De immuunrespons van DCs kan evenwel verhinderd of gemoduleerd worden door het infectieus agens. Sommige virussen gebruiken DCs bijvoorbeeld voor hun replicatie en verspreiding [27]. Ook kankercellen kunnen een tumorspecifieke immuunrespons verhinderen door onder andere te interfereren met DC maturatie door secretie van IL-10 [23]. Ten slotte zijn DCs betrokken in auto-immuniteit, allergie en orgaanafstoting bij transplantatie, een gevolg van een onevenwicht tussen immuunactivatie en tolerantie-inductie [27].

1.2.5 DC-gebaseerde therapeutische vaccins

Momenteel gebeurt veel onderzoek naar therapeutische vaccins voor kanker en DCs staan hierin centraal. Het doel van DC-gebaseerde vaccinatie is om tumorspecifieke effector en geheugen T-cellen te induceren die de tumormassa specifiek kunnen reduceren. Sipuleucel-T is momenteel het enige therapeutisch kankervaccin dat goedgekeurd werd door de European Medicines Agency en de US Food and Drug Administration. Het bestaat uit autologe DCs die *ex vivo* worden geactiveerd en die gebruikt worden in de behandeling van prostaatkanker [28]. Andere klinische studies lopen meestal vast in fase I of II, vooral door het gebrek aan goede biomerkers voor klinische effectiviteit [23]. Bovendien is de vraag of dit ooit een therapie voor velen kan worden gezien de hoge kostprijs.

1.3 Podosomen

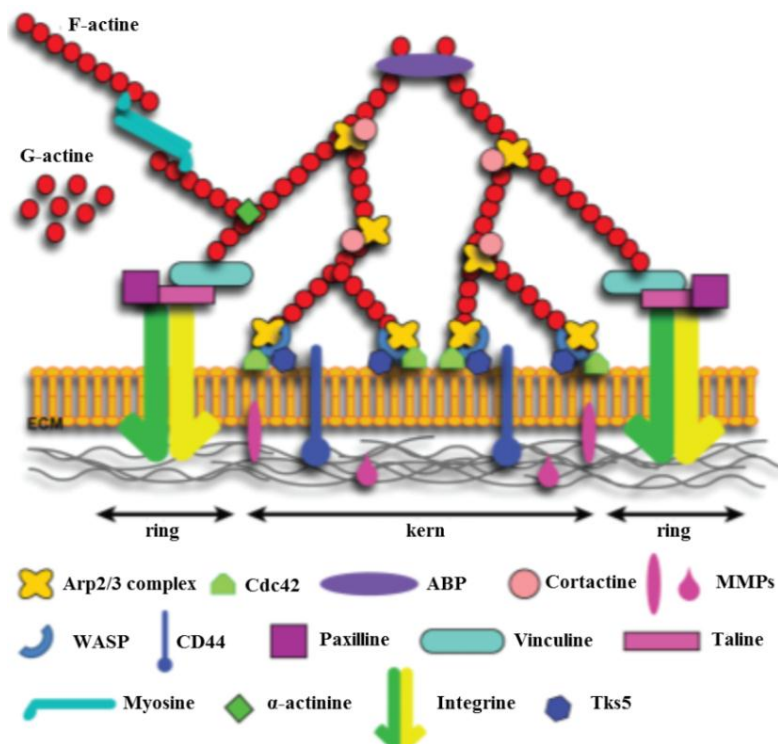
Podosomen zijn op actine gebaseerde uitstulpingen van de plasmamembraan die contact maken met de extracellulaire matrix (ECM) en in staat zijn deze te degraderen. Andere functies van podosomen zijn matrixadhesie, mechanosensing en migratie. Podosomen worden bijgevolg gevonden in beweeglijke myeloïde celtypes zoals macrofagen, monocyten, osteoclasten en immature DCs. Ook endotheelcellen en gladde spiercellen zijn in staat podosomen te vormen en viraal Src-getransformeerde fibroblasten bevatten podosoomachtige structuren. Adhesie wordt toegeschreven aan de ring van integrinen die contact maken met de ECM (**Figuur 4**). Samen met het actomyosine systeem zouden ze ook mechanosensing mogelijk maken. De samenstelling van de ECM is immers in staat de organisatie en levensduur van podosomen te beïnvloeden. Ten slotte wordt gesuggereerd dat podosomen bijdragen tot directionele migratie door het stabiliseren van lamellipodia aan het celfront. Door disassemblage van podosomen aan de achterzijde van een cel en podosoomvorming aan het celfront is er een constante netto beweging van podosoomgroepen. Podosomen kunnen dus zowel de eigenschappen van de ECM voelen, als eraan adhereren en deze degraderen. Het is echter nog niet duidelijk of deze functies steeds met elkaar gekoppeld zijn [29, 30].

1.3.1 Structuur van podosomen

Podosomen bestaan uit een actinekern met actineregulerende eiwitten, omringd door een karakteristieke ringstructuur rijk aan integrinen en verschillende signaal- en adaptoreiwitten (**Figuur 4**). Essentieel voor de vorming van de podosoomkern is het Actin-related protein 2/3

(Arp2/3) complex, een complex van zeven subeenheden dat de vorming van vertakte actinefilamenten induceert. Activatie van het Arp2/3 complex en bijgevolg podosoomvorming is afhankelijk van Wiskott-Aldrich syndroom (WASP) eiwitten en WASP-regulatoren, zoals WASP-interacting protein (WIP) en cortactine. Cortactine zal bovendien de vertakte actinefilamenten stabiliseren [30].

Naast het vertakte actinenetwerk komen ook parallelle actinebundels voor in podosomen, welke de stuwende kracht zouden vormen tegen de basale membraan en ECM. Fascine en T/L-plastine zijn de voornaamste actinebundelende eiwitten in podosomen [30]. Bovendien is de podosoomkern omgeven door een ring van onvertakte actinefilamenten die geassocieerd zijn met myosine II [29].



Figuur 4. Schematische weergave van een podosoom. Actine-geassocieerde eiwitten zoals het Actin-related protein 2/3 (Arp2/3) complex, Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) en cortactine bevinden zich in de kern van podosomen. Cdc42 en Tks5 maken deel uit van de signaalcascade dat het Arp2/3 complex activeert. Ook actinebundelende eiwitten (ABP) zoals fascine bevinden zich in de podosoomkern. De ringstructuur wordt gevormd door integrinen die via adaptoreiwitten (taline, vinculine, paxilline) geassocieerd zijn met het actine cytoskelet. De transmembranaire receptor CD44 is ook betrokken in adhesie en signalering. De radiale ring van actinefilamenten geassocieerd met myosine en α -actinine is belangrijk voor de dynamiek van podosomen. Degradatie van de extracellulaire matrix gebeurt door matrix metalloproteasen (MMPs) (Aangepast uit [30]).

Essentieel in de podosoomring zijn de celttype-specifieke integrinen met als meest prominente β -subeenheden β_1 , β_2 en β_3 , waarvan β_2 specifiek is voor leukocyten. De integrinen worden

aan het actine cytoskelet verbonden door middel van adaptoreiwitten zoals vinculine, taline en paxilline. Ook andere transmembraanreceptoren, zoals CD44, kunnen bijdragen tot podosoom functies [30].

Verder zijn heel wat proteasen geassocieerd met podosomen, waarvan de matrix metalloproteasen (MMPs) het best gekarakteriseerd zijn. Naast gesecreteerd MMP-2 en MMP-9 zou vooral het transmembranaire metalloprotease MT1-MMP als 'master switch' fungeren van de proteolytische regulatie [30].

1.3.2 Regulatie van podosomen

De regulatie van podosoomassemblage en -dynamiek is celttype-specifiek. Voor sommige cellen, waaronder DCs, is matrixadhesie voldoende voor podosoomvorming, terwijl andere cellen additionele hulp van groeifactoren of cytokines nodig hebben. Intracellulaire signaalmoleculen belangrijk bij podosoomvorming zijn guanine nucleotide exchange factoren, proteïne kinase C (PKC) en Src-kinasen. Deze kunnen secundaire effectoren activeren zoals Tks5 en de Rho-GTPasen RhoA, Rac en Cdc42 die op hun beurt andere podosomeiwitten reguleren [30].

1.3.3 Podosomen versus invadopodia

Aangezien podosomen en invadopodia moleculaire componenten delen en gerelateerde functies hebben, worden ze vaak samen beschreven onder de term invadosomen. Invadopodia zijn typisch voor kankercellen, terwijl podosomen in niet-kankercellen voorkomen. Het zijn echter geen identieke structuren. Met een lengte van 8 μm en een diameter van 5 μm zijn invadopodia groter dan podosomen waarvan de afmetingen 1 op 0.4 μm bedragen. Per cel komen 20 tot 100 podosomen voor, maar slechts 1 tot 10 invadopodia. Podosomen zijn veel dynamischer. Hun levensduur (2-12 minuten) is immers veel korter dan die van invadopodia (> 1 uur). Ten slotte is ECM degradatie door invadopodia veel dieper en gericht dan de oppervlakkige en meer verspreide matrixdegradatie door podosomen [31].

1.3.4 Podosomen in dendritische cellen

Zoals reeds vermeld onder 1.2.2 vormen enkel immature DCs podosomen en verdwijnen ze bij mature DCs. Bijgevolg wordt gesuggereerd dat DCs podosomen gebruiken voor migratie in de extravasculaire weefsels bij hun zoektocht naar antigenen en voor migratie naar de

afferente lymfevaten. Bovendien zouden de voor DCs essentiële β_2 -integrinen in podosomen adhesie aan het lymfatisch endotheel en transmigratie mogelijk maken [25].

1.3.5 Podosomen *in vivo*

Een ziekte die geassocieerd is met het ontbreken van podosomen is Wiskott-Aldrich syndroom (WAS), een zeldzame X-gebonden primaire immuundeficiëntie gekenmerkt door eczeem, trombocytopenie en lymfomen. WAS wordt veroorzaakt door mutaties in het *WASP* gen, dat essentieel is voor podosoomvorming [32].

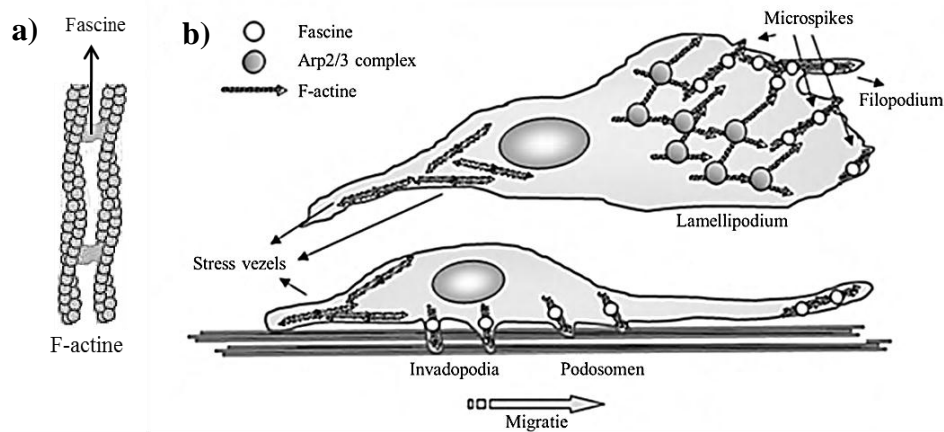
Bijkomende evidentie voor het bestaan van podosomen *in vivo* werd verkregen via elektronenmicroscopie waarmee podosoom rosette structuren gedetecteerd werden in aortaweefsel van een muis [33]. Verder gebruiken lymfocyten podosoomachtige structuren voor transendotheliale diapedese [34] en in osteoclasten zouden podosomen betrokken zijn bij het vormen van een afdichtzone waarbinnen bot wordt afgebroken [35].

1.4 Fascine

1.4.1 Structuur van fascine

Fascine dankt zijn naam aan zijn capaciteit om stabiele en stevige F-actine bundels te vormen (*fasciculus* (Latijn) = bundel) (**Figuur 5a**). Het is een sterk geconserveerd eiwit tijdens evolutie, aangezien homologen teruggevonden worden in stekelhuidigen en *Drosophila* [36]. Zoogdieren bevatten drie isovormen van fascine. Fascine-1 komt in veel celtypes tot expressie, in tegenstelling tot fascine-2 en fascine-3 die specifiek zijn voor respectievelijk retina en testis [37]. Hier zal een bespreking volgen van de structuur, regulatie en functie van fascine-1, kortweg fascine genoemd.

Fascine is een globulair 55 kDa-eiwit dat is opgebouwd uit vier tandem β -trefoil domeinen die samen twee lobben vormen, domein 1-2 en domein 3-4, onder een hoek van 56 graden [38]. Vermits fascine actinefilamenten bundelt als monomeer, zijn meerdere actinebindende domeinen noodzakelijk. Alle vier de β -trefoil domeinen zouden bijdragen tot actinebundeling. Het eerste actinebindend domein bevindt zich in de kloof gevormd door domein 1 en 4. Hier tegenover bevindt zich het tweede actinebindend domein dat gevormd wordt door residu's uit domein 1 en domein 2. Ten slotte werd een derde actinebindend domein geïdentificeerd in domein 3 [39,40].



Figuur 5. Actinebundeling door fascine (a) en fascine lokalisatie in een cel (b). Fascine bundelt F-actine filamenten in filopodia en microspikes, alsook in invadopodia en podosomen (Aangepast uit [41] (a) en [42] (b)).

1.4.2 Regulatie van fascine

Fosforylering van serine 39 door PKC α verstoort de interactie met actine in het eerste actinebindend domein en bijgevolg actinebundeling. De dynamische PKC α /fosfoscine interactie is voornamelijk aanwezig ter hoogte van de plasmamembraan om de balans te reguleren tussen de vorming van protrusies en focale adhesies. PKC α /fosfoscine dynamiek wordt stroomopwaarts gereguleerd door de samenstelling van de ECM (vb. trombospodine en fibronectine), adhesiereceptoren, groeifactoren, cytokines en signalerende eiwitten [37].

Op transcriptioneel niveau wordt fascine geïnduceerd door cAMP respons element bindende eiwitten en aryl hydrocarbon receptoren, zoals werd aangetoond in fibroblast- en carcinomacellen [37]. Ook Smad4 kan de fascine promotor binden en wordt geactiveerd na transforming growth factor- β signalisatie in borstkankercellen [43]. Ten slotte zijn zowel in normale als kankercellen microRNAs geïdentificeerd die fascine transcriptie negatief reguleren [37].

1.4.3 Rol van fascine in migratie en invasie

De actinebundelende activiteit verklaart de essentiële rol van fascine in de assemblage van filopodia, dendrieten² en microspikes (**Figuur 5b**). Filopodia bevinden zich aan het front van migrerende cellen en tasten de omgeving af om de richting van migratie te bepalen [44]. Fascine wordt dan ook geëxprimeerd in tal van migrerende cellen, zoals tijdens

² Het onderscheid tussen filopodia in DCs en dendrieten is niet duidelijk vanuit de literatuur. Hier wordt de term filopodia gebruikt, wat verwijst naar vingervormige cytoplasmatische extensies. Eenmaal aan deze filopodia een DC-specifieke functie (antigeencaptatie of -presentatie) kan worden toegekend, worden ze als dendrieten beschouwd.

embryogenese bij de ontwikkeling van het zenuwstelsel en de mesenchymale weefsels [37]. Fascine wordt ook teruggevonden in podosomen (zie 1.3.1) en invadopodia, waar het bijdraagt tot de stabiliteit van deze structuren [33,45]. Het feit dat fascine zowel migratie structuren (filopodia) als invasieve protrusies (invadopodia) bevordert, verklaart de hoge expressie in invasieve en metastaserende kankercellen. Inderdaad, fascine-expressie is geassocieerd met metastase in colorectale en maagkanker en met een verhoogde mortaliteit in borst-, colorectale en slokdarmkanker [46]. Bovendien draagt fascine bij tot het proces waarbij circulerende tumorcellen de primaire tumor herkoloniseren om zo zijn groei en metastase potentieel nog te bevorderen [47]. Fascine wordt dan ook gezien als een therapeutisch target en als een interessante nieuwe biomarker voor agressieve humane carcinomen, omdat het nauwelijks te detecteren is in normale epitheelcellen.

1.4.4 Fascine in dendritische cellen

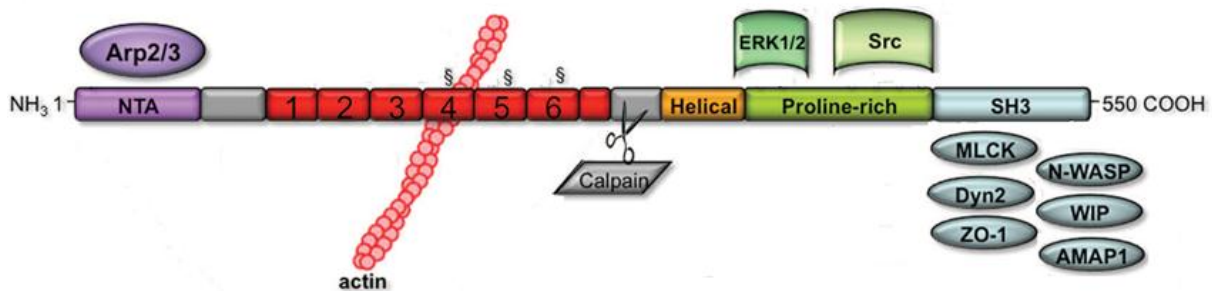
Fascine wordt specifiek geïnduceerd bij DC maturatie. Bij immature DCs en andere bloedcellen zoals monocyt, granulocyten en B- en T- lymfocyten wordt nauwelijks of geen fascine gedetecteerd [48,49]. Met antisense oligonucleotiden werd aangetoond dat fascine nodig is voor de assemblage van dendrieten [50] en voor de antigeenpresenterende activiteit van DCs [51]. Fascine draagt dan ook bij tot de assemblage van de immuunsynaps [52] waar het samen met actine gepolariseerd wordt tijdens DC-T-cel interactie [53]. De knock-out studie van Yamakita *et al.* (2011) toonde een kritische rol aan in de chemotactische migratie van DCs waar fascine de flexibiliteit en rigiditeit van membraanuitstulpingen bevordert. Daarnaast stimuleerde fascine hier de disassemblage van podosomen, terwijl andere studies in gladde spiercellen eerder een podosoomassemblerende rol voor fascine suggereren [54,33]. De sterke selectieve expressie van fascine in mature DCs maakt de fascine promotor aantrekkelijk voor gebruik in genterapie. Een transgen kan onder controle van de fascine promotor selectief tot expressie komen in mature DCs en leiden tot een kwalitatieve cellulaire immuunrespons [55].

1.5 Cortactine en zijn homolog HS1

1.5.1 Structuur van cortactine

Cortactine is een multifunctioneel eiwit als gevolg van zijn modulaire structuur (**Figuur 6**). Het zure N-terminale domein (N-terminal acidic of NTA domein) bindt en activeert het Arp2/3 complex, dat verantwoordelijk is voor de vorming van vertakte actinefilamenten. Het

NTA domein wordt gevolgd door een tandem repeat domein opgebouwd uit 6.5 eenheden, waarvan de vierde instaat voor F-actinebinding. Verder bevat cortactine een calpaine knipplaats, een α -helicaal domein en een prolinerijke regio verrijkt in residu's voor tyrosine en serine fosforylering. C-terminaal is er een Src homology 3 (SH3) domein, een bindingsplaats voor heel wat verschillende eiwitten die zo verankerd worden aan het actine cytoskelet [56].



Figuur 6. Domeinstructuur van cortactine. Eiwitten die associëren met een van de cortactine domeinen worden in dezelfde kleur voorgesteld als het betreffende domein. Slechts enkele interactiepartners zijn weergegeven. § duidt de domeinen aan die ontbreken in hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1). Gebruikte afkortingen: NTA, N-terminal acidic domain; Arp2/3, actin-related protein 2/3 complex; ERK, extracellular signal-regulated kinase; SH3, Src homology 3 domain; MLCK, myosin light chain kinase; Dyn2, dynamin2; ZO-1, zonula occludens-1; N-WASP, neural Wiskott-Aldrich syndrome protein; WIP, WASP-interacting protein (Aangepast uit [41]).

1.5.2 Regulatie van cortactine

Posttranslationale modificaties zijn de voornaamste regulatoren van cortactine activiteit. Vooral de prolinerijke regio is het doelwit van tal van tyrosine en serine/threonine kinasen. Deze gefosforyleerde aminozuren beïnvloeden de associatie van cortactine met de SH3-bindende eiwitten en bepalen bijgevolg het fenotype van de cel [41].

Regulatie op transcriptieel niveau is nog niet volledig opgehelderd, maar transcriptiefactoren die cortactine tot expressie brengen zijn nuclear factor- κ B en gefosforyleerd Stat3 [41].

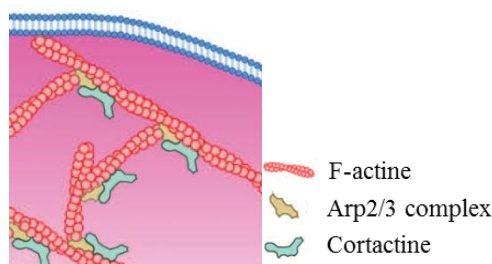
1.5.3 Rol van cortactine in migratie en invasie

Cortactine is een nucleatie-bevorderende factor (NPF) aangezien het de vorming van vertakte actinefilamenten induceert door binding en activatie van het Arp2/3 complex. Leden van de WASP familie zijn nog betere NPFs, maar dienen daarvoor eerst te associëren met een SH3 domein. Via zijn SH3 domein activeert cortactine zowel de WASP eiwitten als hun regulatoren zoals WIP om zo ook indirect bij te dragen tot Arp2/3 complex activatie [56].

Andere bindingspartners van het cortactine SH3 domein dragen bij tot het versterken van cel-cel adhesies (zonula occludens eiwitten), endocytose (dynamin2) en tumorinvasie (GTPasen vb. AMAP1) (**Figuur 6**) [56,57].

Een unieke functie voor cortactine is het stabiliseren van het gevormde vertakte actinenetwerk door een synergie tussen het NTA-domein en het actinebindende tandem repeat domein (**Figuur 7**). Hierdoor wordt cortactine vooral teruggevonden nabij het corticaal actine ter hoogte van de plasmamembraan (vandaar de naam cortactine [58]) en in lamellipodia en celprotrusies, structuren belangrijk voor directionele celmigratie [56].

Daarnaast is er een belangrijke rol van cortactine in podosomen (zie 1.3.1) en invadopodia, waarvan zowel het aantal als de activiteit door cortactine worden gereguleerd. Cortactine is essentieel bij de vorming van invadosomen en bevordert bovendien hun ECM-degraderende functie. Degradatie gebeurt door MMPs die naar de celmembraan gerekruteerd worden door membranaire transporteiwitten waarmee cortactine associeert [41].



Figuur 7. Cortactine stabiliseert vertakte actinefilamenten (Aangepast uit [41]).

Gezien de rol van cortactine in celmigratie en invasie is het niet verwonderlijk dat cortactine tot overexpressie komt in heel wat kankers. Deze overexpressie is meestal het gevolg van genduplicatie, maar ook overexpressie van activerende transcriptiefactoren en hyperfosforylering zijn mogelijk. Cortactine overexpressie is dan ook geassocieerd met tumor agressiviteit, metastase, slechte prognose en verminderde overleving van de patiënt [57].

1.5.4 Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1)

Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) is een homoloog van cortactine dat in hematopoëtische cellen zoals megakaryocyten, osteoclasten en DCs tot expressie komt. HS1 heeft een gelijkaardige structuur als cortactine met dat verschil dat het slechts 3.5 eenheden bevat. Bijgevolg heeft HS1 ook de helicale regio nodig om actine te binden, terwijl het tandem repeat domein in cortactine voldoende is voor actinebinding [59]. Net als cortactine stabiliseert HS1 vertakte actinefilamenten [60], maar er zijn toch enkele functionele verschillen. Zo is HS1 minder efficiënt als NPF [60], kan het migreren naar de nucleus en

heeft het een rol in apoptose. Bovendien kunnen ze verschillende eiwitten binden ondanks 86% homologie van het SH3 domein. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat andere residu's worden gefosforyleerd [61].

1.5.5 Cortactine en HS1 in dendritische cellen

Beenmerg-afgeleide DCs bevatten enkel HS1 [62], terwijl DCs geïsoleerd uit de milt zowel cortactine als HS1 bevatten [63]. Echter, in DCs wordt vooral HS1 bestudeerd. De podosomen van DCs geïsoleerd uit het beenmerg van HS1^{-/-} muizen zijn minder dicht georganiseerd. Bovendien is er een toegenomen dynamiek van lamellipodia, wat samen met het verstoord podosoompatroon de gereduceerde directionele migratie kan verklaren. In tegenstelling tot cortactine is HS1 niet vereist voor de vorming van podosomen en heeft het geen effect op ECM degradatie [62]. HS1 draagt wel bij tot antigeenpresentatie door zijn essentiële rol in receptor-gemedieerde endocytose [64].

De rol van cortactine in DCs werd bestudeerd in WIP^{-/-} DCs geïsoleerd uit de milt na injectie van een mutante vorm van WIP die geen cortactinebindend domein bevat. Bañón-Rodríguez *et al.* (2011) besloten hieruit dat cortactine in DCs bijdraagt tot de stabilisatie en maturatie van podosomen en nodig is voor ECM degradatie [63].

1.6 Doelstelling van deze masterproef

Met behulp van reeds gekarakteriseerde nanobodies tegen fascinine en cortactine gaan we in deze masterproef na wat de specifieke rol is van fascinine actinebundeling en het SH3 domein van cortactine in DCs. Met name onderzoeken we de effecten van deze nanobodies op filopodia- en podosoomvorming, processen die essentieel zijn voor hun beweeglijkheid.

Monocyt-afgeleide DCs uit humaan perifeer bloed worden eerst morfologisch en biochemisch beschreven. Bovendien wordt een grondige vergelijking gemaakt tussen immature en mature DCs, gezien de fascinine toename tijdens maturatie als een vorm van overexpressie kan worden gezien.

Er worden twee nanobodies gebruikt tegen fascinine, FASNb2 en FASNb5, waarvan enkel FASNb5 actinebundeling verstoort en één nanobody tegen cortactine, CORNb2, dat specifiek het cortactine SH3 domein bindt. Aan de hand van pull-down assays en delokalisatiestudies wordt de binding van de nanobodies aan hun doelwit en de specificiteit van CORNb2 nagegaan. In de met nanobody-getransfecteerde DCs wordt vervolgens het migratorisch fenotype bestudeerd, met bijzondere aandacht voor filopodia en podosomen.

2. Materiaal en methoden

2.1 Antilichamen en reagentia

Muis monoklonaal anti-fascine (55K-2) werd besteld bij AbCam (Cambridge, VK). Konijn polykonaal anti-fascine (FSCN1), muis monoklonaal anti-vinculine, konijn polykonaal anti-V5 en DAPI zijn afkomstig van Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, VS). Konijn polykonaal fosfospecifiek (Ser39) anti-fascine is afkomstig van ECM Biosciences (Versailles, KY, VS). Muis monoklonaal anti-cortactine werd besteld bij Millipore (Watford, VK). Konijn polykonaal anti-cortactine (H-222) en konijn monoklonaal anti-HS1 zijn afkomstig van Cell Signaling (Danvers, MA, VS). Alexa Fluor[®] 488/594-gelabelde secundaire geit anti-konijn of anti-muis IgG antilichamen zijn afkomstig van Molecular Probes (Eugene, OR, VS). Horseradish peroxidase (HRP)-geconjugeerde secundaire schaap anti-muis of ezel anti-konijn IgG antilichamen werden besteld bij GE Healthcare (Pittsburgh, PA, VS). Muis monoklonaal anti-V5 en Alexa Fluor[®] 594-gelabeld falloïdine zijn afkomstig van Invitrogen (Merelbeke, België). Verrood (670)-gelabeld falloïdine werd besteld bij Cytoskeleton (Denver, CO, VS).

2.2 DNA constructen

Constructen reeds beschikbaar:

- GFPNb, FASNb2, FASNb5 en CORNb2 in pcDNA3.1 V5 His₆ en MOM V5 pcDNA3.1 His₆ vector.
- GSNNb11 en CORNb2 in pHEN6c V5 His₆ vector
- FASNb5 in pET SUMO V5 vector
- GFPNb en FASNb2 in pHEN6c His₆ STREP vector

DNA plasmiden werden geamplificeerd door elektroporatie in elektrocompetente Top10 cellen, waarna de cellen 1 uur roterend geïncubeerd werden bij 37°C in 250 µl SOC medium (super optimaal medium met katabolietrepressie). De celsuspensie werd vervolgens in 250 ml Luria Bertani medium met ampicilline (50 µg/ml) gebracht en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Voor DNA isolatie werd het protocol gevolgd van de NucleoBond[®] Xtra Midi EF (endotoxine-vrije) kit (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland). De uiteindelijk DNA concentratie werd bepaald met een spectrofotometer (NanoDrop, ThermoScientific, Waltham, MA, VS).

2.3 Cultivatie dendritische cellen

Humaan perifeer bloed werd afgenomen van gezonde vrijwilligers in het bloedafnamecentrum van het UZ Gent na goedkeuring door het lokaal ethisch comité (EC UZG 2013/467) en ondertekening van het informed consent. Perifere mononucleaire bloedcellen (PBMCs) werden geïsoleerd door dichtheidsgradiënt centrifugatie ($320\times g$, 30 minuten, kamertemperatuur) met ficoll (lymphoprepTM, Axis-Shield, Dundee, Schotland), waarna de PBMCs zich in de vlokkige laag bevinden. De PBMCs werden uitgezaaid in serumvrij RPMI 1640 GlutaMAXTM medium en geadhereerd gedurende 45 minuten bij 37°C en 5% CO₂. Door afnemen van het medium werden de lymfocyten verwijderd, aangezien deze in suspensie blijven. De adherente cellen werden gecultiveerd in RPMI met 10% hitte-geïnactiveerd foetaal kalfserum³ (HI-FBS), 100 µg/ml streptomycine en 100 IU/ml penicilline. RPMI, FBS en antibiotica zijn afkomstig van Gibco Life Technologies (Grand Island, NY, VS). Om de monocyten te differentiëren tot DCs werd 20 ng/ml humaan IL-4 en 50 ng/ml humaan GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) (beide afkomstig van Peprotech, Rocky Hill, NJ, VS) aan het medium toegevoegd, wat na drie dagen werd verversd. Zes dagen na PBMC isolatie werden gedifferentieerde immature DCs geïsoleerd via afnemen van het medium. Om DCs te matureren werden ze overnacht geïncubeerd met LPS (0.1 µg/ml of 1 µg/ml, Sigma-Aldrich).

2.4 Fasecontrastmicroscopie

Om DC differentiatie na te gaan werden de in cultuur gebrachte cellen 2 en 6 dagen na isolatie gevisualiseerd met een Olympus IX81 microscoop (Olympus $\times 40$ 0.60 NA LUCPlanFL N objectief; Olympus, Tokyo, Japan) en bijbehorende Cell M software (Olympus).

2.5 Transfectie

DCs werden getransfecteerd met behulp van de Neon[®] transfectie kit (Invitrogen). Deze op elektroporatie-gebaseerde transfectiemethode werd gekozen nadat andere transfectiemethoden en lentivirale transductie onsuccesvol bleken te zijn (zie Addendum). Na het collecteren van de gedifferentieerde DCs werd het benodigde aantal DCs (805 000 cellen/conditie) gewassen in PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺, Gibco) en geresuspendeerd in R buffer (115 µl/conditie). Deze

³ HI-FBS werd 30 minuten verhit bij 56°C om het complementsysteem te inactiveren, waardoor interferentie van het complement in immunologische assays, zoals chemotaxis, wordt vermeden.

celsuspensie werd vervolgens toegevoegd aan 4.025 µg DNA. 100 µl cel-DNA mengsel werd opgezogen met de Neon[®] transfectie pipet, waarna de pipet in de elektroporatietube met 3 ml elektrolytbuffer (E2) werd geplaatst. Transfectie gebeurde met twee pulsen van 1000 Volt en 40 milliseconden. De getransfecteerde cellen werden uitgezaaid op poly-L-lysine-gecoate coverslips (zie 2.6) in 1 ml RPMI met 10% HI-FBS zonder antibioticum. Na drie uur incubatie bij 37°C en 5% CO₂ werd per well 1 ml RPMI met 10% HI-FBS en antibiotica (100 µg/ml streptomycine en 100 IU/ml penicilline) toegevoegd, voorzien van 20 ng/ml IL-4 en 50 ng/ml GM-CSF.

2.6 Coating van coverslips

Aangezien DCs in cultuur weinig adherent zijn, werden de coverslips gecoat met poly-L-lysine (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) door 1 uur incubatie bij 37°C. Om matrixdegradatie te bestuderen werden de cellen uitgezaaid op een rode fluorescente gelatinematrix volgens het bijgeleverde protocol van een commerciële kit (QCM Gelatin Invadopodia Assay, Millipore). Samengevat bestaat het protocol achtereenvolgens uit het coaten met een 1:1 oplossing van poly-L-lysine in MQ gedurende 20 minuten, een 1:15 oplossing van glutaaraldehyde in PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺) gedurende 15 minuten en een 1:4 mengsel van Cy3-gelabeld gelatine:ongelabeld gelatine (beide 4x verdund in PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺)) gedurende 10 minuten. De coverslips werden 30 minuten gedesinfecteerd met 70% ethanol en overnacht bewaard in PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺) bij 4°C. Alvorens het uitzaaien van de cellen werden de coverslips minstens 1 uur geïncubeerd met 1 ml/well RPMI + 10% HI-FBS zonder antibioticum. 700.000 getransfecteerde of 400.000 parentale cellen werden uitgezaaid op de gecoate coverslips en overnacht geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂.

2.7 Immuunkleuring en fluorescentiemicroscopie

DCs werden 25 minuten gefixeerd met 3% paraformaldehyde, gepermeabiliseerd gedurende 5 minuten met 0.2% TRITON X-100 en 20 minuten geïncubeerd met 0.75% glycine. Voor fascine immuunkleuring werden de cellen 5 minuten gefixeerd en gepermeabiliseerd met 100% ijskoude methanol. Coverslips werden minstens 10 minuten geblokkeerd met 1% BSA in PBS (+Ca²⁺/Mg²⁺). Incubatie met het primair antilichaam gebeurde bij 37°C gedurende 1 uur. Het geschikte Alexa fluor[®] 488/594-gelabeld secundair antilichaam, DAPI als kernkleuring (0.4 µg/ml) en 594/670-gelabeld falloïdine werden toegevoegd gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur. De coverslips werden gemonteerd met VectaShield mounting

medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, VS). Beelden werden genomen met een Zeiss Axiovert 200 M Apotoom epifluorescentiemicroscoop uitgerust met een gekoelde CCD AxioCam camera (Zeiss $\times 63$ 1.4 NA olie Plan-Apochromat objectief; Carl Zeiss, Oberkochen, Duitsland) en Axiovision 4.5 software (Zeiss) of een Olympus IX81 FluoView 1000 confocale laser scanning microscoop (Olympus $\times 60$ 1.35 NA olie UplanSApo objectief) met FluoView FV1000 software (Olympus).

2.8 Celmorfologische analyses

Parameters zoals circulariteit, aantal podosomen, podosoom- en celoppervlakte werden op de microscopische opnames manueel geanalyseerd en gekwantificeerd met behulp van ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, VS). Podosomen werden hiervoor gevisualiseerd met een monoklonaal anti-cortactine antilichaam of falloïdine. Filopodia werden gevisualiseerd met falloïdine (of een monoklonaal anti-fascin antilichaam in MOM-GFPNb- en MOM-FASNb5-getransfecteerde DCs). Het aantal filopodia en hun lengte werd gemeten met de Axiovision 4.5 software (Zeiss). Celpolariteit werd visueel beoordeeld als cellen waarin duidelijk een front en achterzijde kan worden onderscheiden en waarbij het front meestal rijk is aan podosomen. Matrixdegraderende capaciteit werd ook visueel geanalyseerd op basis van niet-fluorescente zones in de rode gelatinematrix die met de cel geassocieerd konden worden.

2.9 Pull-down assays

DCs werden gelyseerd met lysisbuffer (0.5% NP40 in PBS ($-Ca^{2+}/Mg^{2+}$), 1mM PMSF, 1mM protease inhibitoren). Na sonicatie (12 pulsen, 40 mA) werd 10 minuten gecentrifugeerd ($20.000\times g$, $4^{\circ}C$). 500-1000 μg lysaat werd minstens 1 uur roterend bij $4^{\circ}C$ geïncubeerd met 10 μg GFPNb-His₆-STREP, FASNb2-His₆-STREP, GSNNb11-V5, SUMO-FASNb5-V5 of CORNb2-V5. Vervolgens werd 25 μl Strep-Tactin (IBA, Göttingen, Duitsland) of anti-V5-agarosebeadoplossing (Sigma-Aldrich) toegevoegd die minstens 1 uur roteerde met de nanobody-antigeen complexen bij $4^{\circ}C$. Na 3 wasstappen ($425\times g$, $4^{\circ}C$, 2 minuten) werden de beads 5 minuten opgekookt in 2.5x Laemmli sample buffer. De eiwitten uit het losgekomen complex werden gescheiden via SDS-PAGE en gedetecteerd via Western blotting (zie 2.10).

2.10 SDS-PAGE en Western blotting

Eiwitconcentraties werden bepaald met de Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, VS), waarna gelijke eiwithoeveelheden gescheiden worden via SDS-PAGE (15% gels, 40 mA, 25 minuten). De gescheiden eiwitten werden overnacht (25 volt) naar een nitrocellulose membraan (Hybond-C-extra, VWR, Radnor, PA, VS) getransfereerd. Incubatie met het primair antilichaam gebeurde overnacht bij 4°C. Het secundaire anti-muis of anti-konijn HRP-geconjugeerd antilichaam werd gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd. Detectie gebeurde via verbeterde chemiluminescentie (ECL, Pierce, Rockford, IL, VS).

2.11 Weergave van resultaten

Individuele percentages en gemiddelden werden weergegeven in een staafdiagram (Excel) waarbij de foutbalken de standaarddeviatie (SD) voorstellen. Gemiddelden en SDs werden enkel berekend indien de data normaal verdeeld waren, zoals werd bepaald met de Shapiro-Wilk toets (SigmaPlot 12, Systat Software Inc, San Jose, CA, VS). Voor ruwe data (aantal filopodia, podosomen, celontrek...) werd een dot density plot (SigmaPlot 12) gebruikt, waarin elk symbool een individuele cel voorstelt. Dit werd gecombineerd met een boxplot (SigmaPlot 12) waarbij de zwarte horizontale lijnen van onder naar boven het 10^{de}, 25^{ste}, 50^{ste} (mediaan), 75^{ste} en 90^{ste} percentiel weergeven. Het gemiddelde werd voorgesteld als een rode lijn.

2.12 Statistische analyses

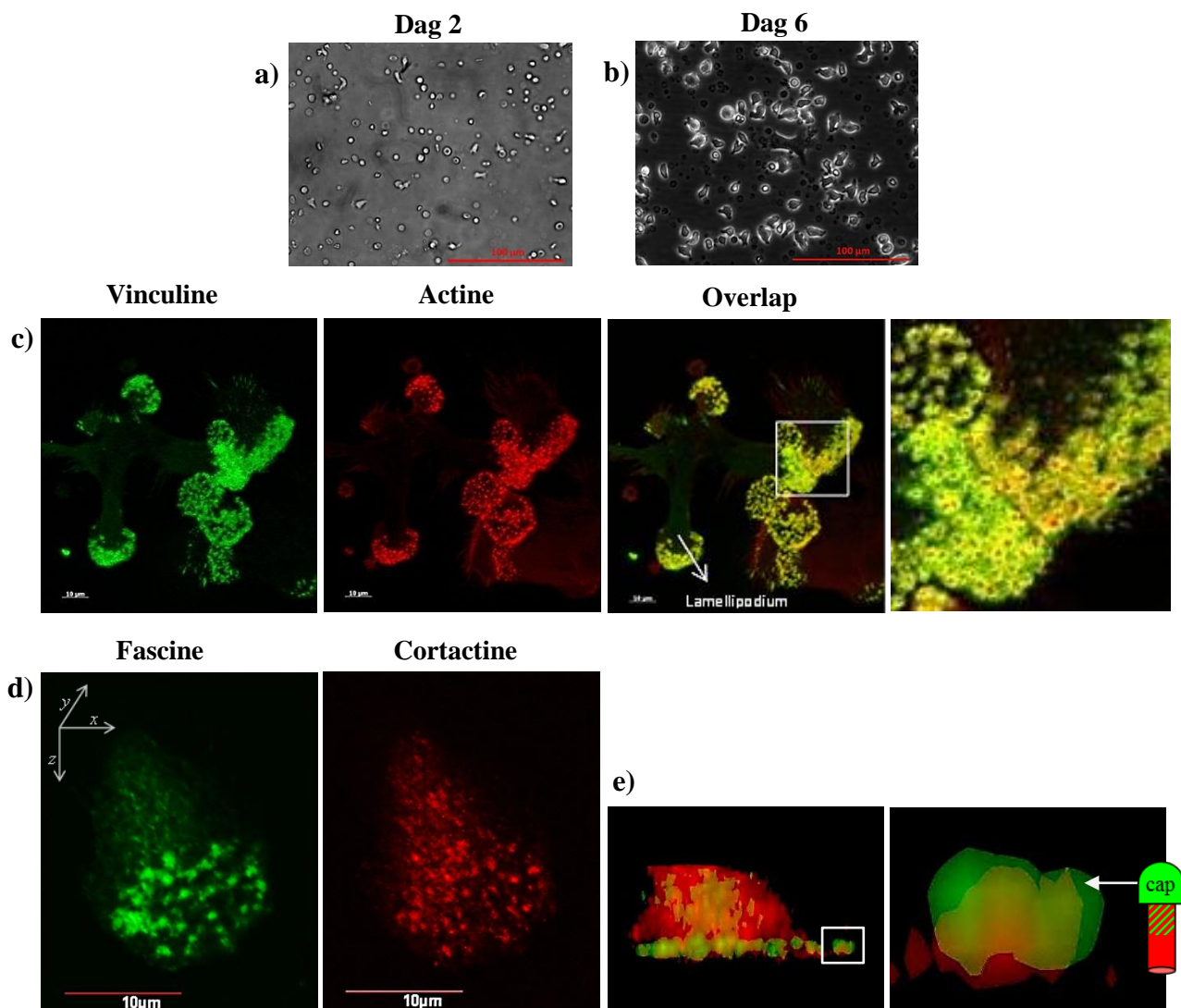
Statistische significanties werden berekend met de ongepaarde *t*-toets of Mann-Whitney *U* toets naargelang de data respectievelijk normaal of niet normaal verdeeld waren (SigmaPlot 12).

3. Resultaten

3.1 Differentiatie tot dendritische cellen

3.1.1 Morfologie van gecultiveerde DCs

Differentiatie tot DCs werd bereikt door de geïsoleerde monocysten in cultuur te brengen in aanwezigheid van GM-CSF en IL-4. Twee dagen na isolatie waren vooral nog adherente cellen zichtbaar via fasecontrastmicroscopie (**Figuur 8a**). Slechts enkele van deze cellen hadden uitlopers, terwijl de meeste een ronde morfologie hadden. Zes dagen na isolatie was er een sterke toename van cellen in suspensie, welke een vertakte, DC-achtige morfologie hadden (**Figuur 8b**). De resterende adherente cellen daarentegen waren vooral rond en kleiner. Bijgevolg verwachtten we gedifferentieerde DCs in het celmedium.

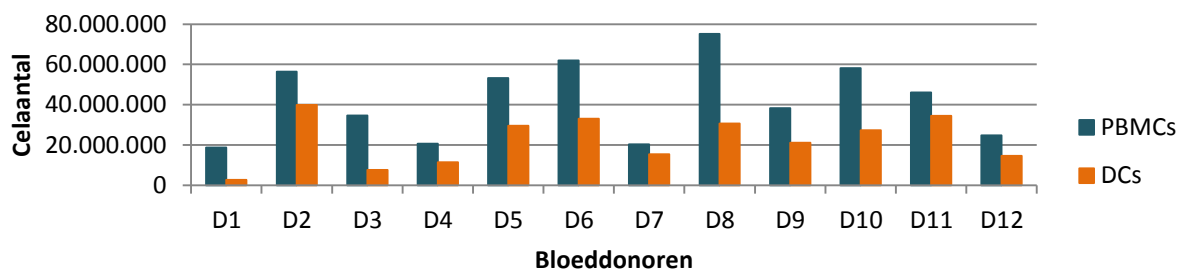


Figuur 8. Morfologie van gedifferentieerde DCs. a/b) Fasecontrastopnames van geïsoleerde monocytten na twee (a) en zes (b) dagen in cultuur met IL-4 en GM-CSF. Schaal = 100 µm. c) Immuunkleuring met een monoklonaal anti-vinculine antilichaam (groen) en falloïdinerood om podosomen te visualiseren. Een typisch lamellipodium (pijl) is aangeduid en een focus op een podosoomregio (kader) wordt rechts weergegeven. Schaal = 10 µm. d) Immuunkleuring met een monoklonaal anti-fascine (groen) en polykloonaal anti-cortactine (rood) antilichaam. Bovenaanzicht van een cel in het xy vlak. Schaal = 10 µm. e) Aanzicht langs de z-as van de cel in d (links). Twee afzonderlijke podosomen en verduidelijking van de ‘cap’structuur (rechts).

De vertakte morfologie van DCs werd ook waargenomen via fluorescentiemicroscopie. Vooral de uitlopers, lamellipodia, zijn rijk aan podosomen, maar ook centraal in de cel kunnen podosomen voorkomen. Podosomen worden typisch gevisualiseerd met falloïdine en een anti-vinculine antilichaam die respectievelijk de actinekeren en ring van integrinen aankleuren (**Figuur 8c**). Ook immuunkleuring met een anti-fascine of anti-cortactine antilichaam geeft de podosomen weer (**Figuur 8d**). Via de combinatie van dwarsdoorsnedes (z-stacks) van het podosoom tot een driedimensionaal beeld zagen we dat fascine zich hoger in het podosoom bevindt dan cortactine in een zogenaamde ‘cap’structuur (**Figuur 8e**).

3.1.2 Opbrengst van DC differentiatie

De opbrengst van DC differentiatie werd berekend als de verhouding van het aantal DCs (in suspensie op dag 6) tot het aantal in cultuur gebrachte PBMCs. Zowel het aantal DCs, PBMCs als hun verhouding verschilde sterk tussen de donoren (**Figuur 9**). De gemiddelde opbrengst van differentiatie op dag 6 was 52 % ($\pm 19\%$ (SD)).

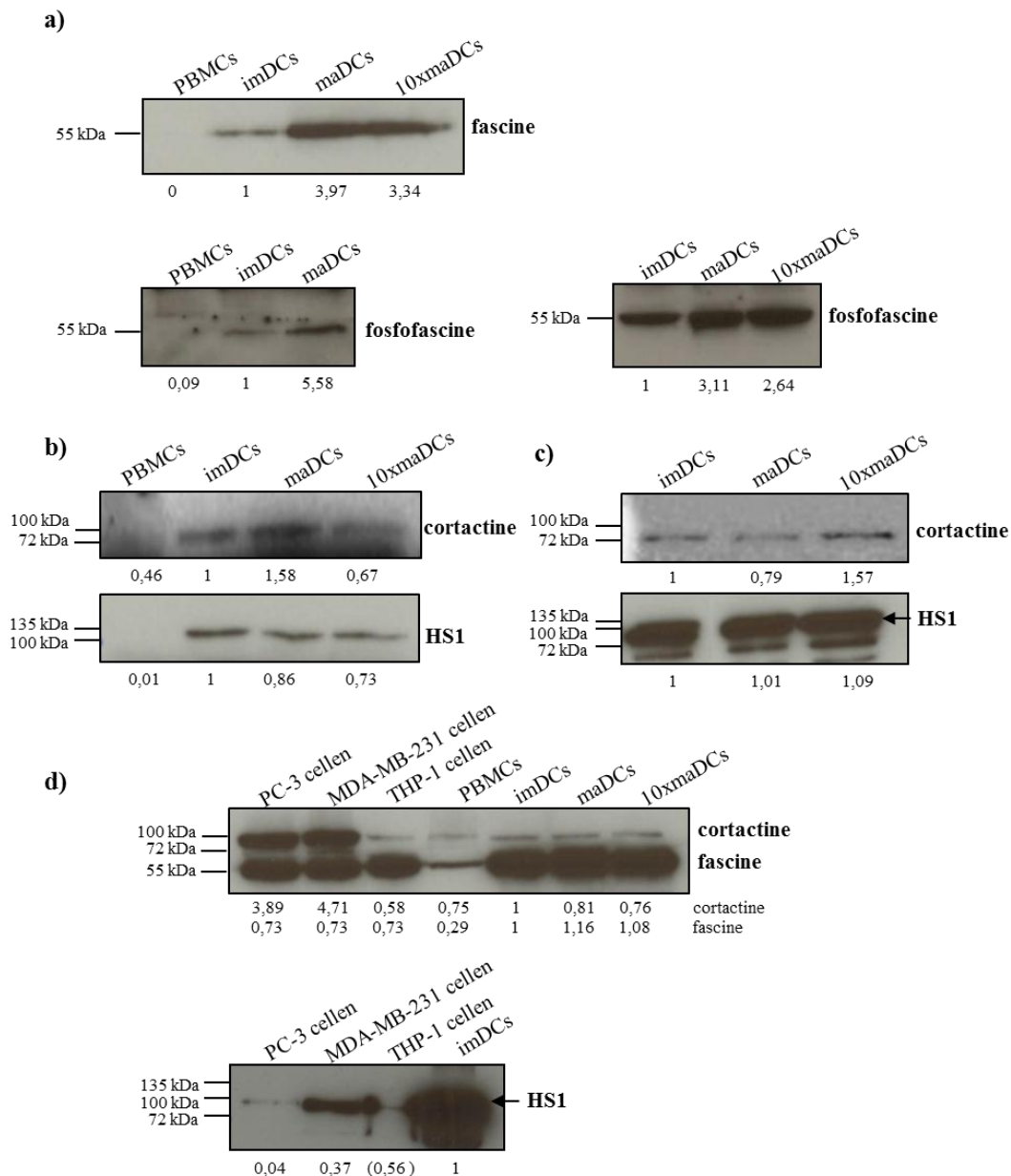


Figuur 9. Opbrengst PBMC isolatie en DC differentiatie. Voor 12 donoren (D1-D12) wordt het aantal geïsoleerde PBMCs en het aantal DCs op dag 6 weergegeven. Bij drie donoren (D13-D15) was er geen inschatting van het aantal PBMCs mogelijk, vermits moeilijk onderscheid te maken was tussen PBMCs en bloedplaatjes.

3.1.3 Fascine-, cortactine- en HS1-expressie nemen toe tijdens differentiatie

Via Western blotting werd een verhoogde expressie van (fosfo)fascine (**Figuur 10a**), cortactine en HS1 (**Figuur 10b**) waargenomen in DCs ten opzichte van PBMCs. Zowel

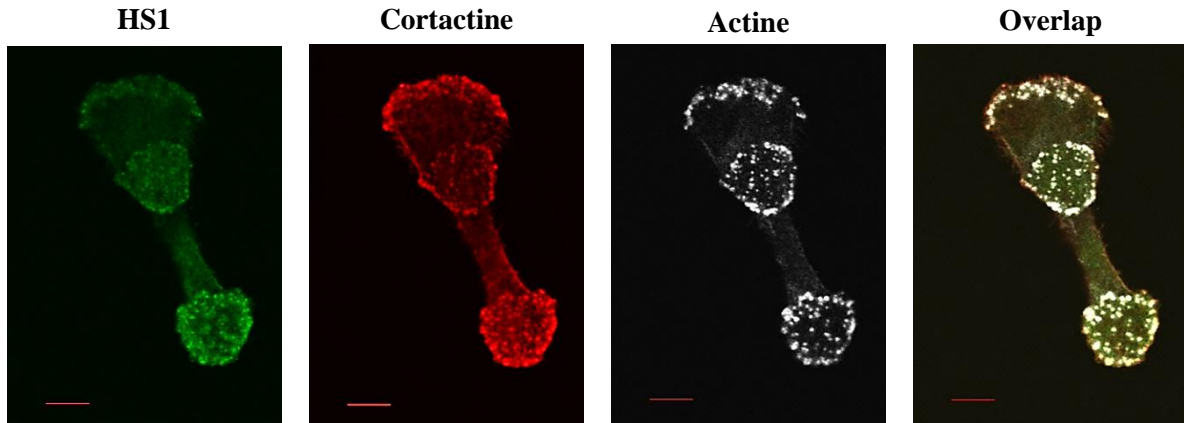
cortactine als zijn homologo HS1 zijn dus aanwezig in humane monocyt-afgeleide DCs, hoewel HS1 in grotere mate (**Figuur 10c**). Inderdaad, cortactine was meer aangerijkt in de humane prostaat- (PC-3) en borstkankercellijn (MDA-MB-231) dan in de humane monocyten cellijn (THP-1) of DCs, terwijl het omgekeerde geldt voor HS1 (**Figuur 10d**). Voor fascine was er weinig expressieverschil tussen deze kankercellen, THP-1 cellen en DCs.



Figuur 10. Vergelijking van fascine-, cortactine- en HS1-expressie tijdens differentiatie en maturatie. Western blot voor (Ser39-gefosforyleerd) fascine (**a**), cortactine en HS1 (**b**) in PBMCs, immature DCs (imDCs) en DCs gematureerd met 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (maDCs) of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (10xmaDCs). **c)** Western blots met dezelfde eiwithoeveelheden van cortactine en HS1 bij eenzelfde belichting tonen een hogere HS1-expressie. **d)** Western blot voor fascine, cortactine en HS1 in een humane prostaatkankercellijn (PC-3), borstkankercellijn (MDA-MB-231), monocyten cellijn (THP-1), PBMCs en DCs. De densiteit van de Western blot signalen werd gekwantificeerd met ImageJ en weergegeven relatief ten opzichte van imDCs.

3.1.4 Colocalisatie van cortactine en HS1 in DCs

We hebben reeds aangetoond dat DCs zowel cortactine als HS1 bevatten. Via immunokleuring werd hun cellulaire lokalisatie bestudeerd en daaruit bleek dat cortactine en HS1 colocaliseren ter hoogte van podosoomstructuren (**Figuur 11**).



Figuur 11. Colocalisatie van HS1 en cortactine. Immunokleuring van een immature DC met monokonaal anti-HS1 (groen) en monokonaal anti-cortactine (rood) toont cortactine-HS1 colocalisatie aan ter hoogte van actine-rijke podosoomstructuren, gevisualiseerd met falloïdine (wit). Schaal = 10 μ m.

3.2 Maturatie van DCs

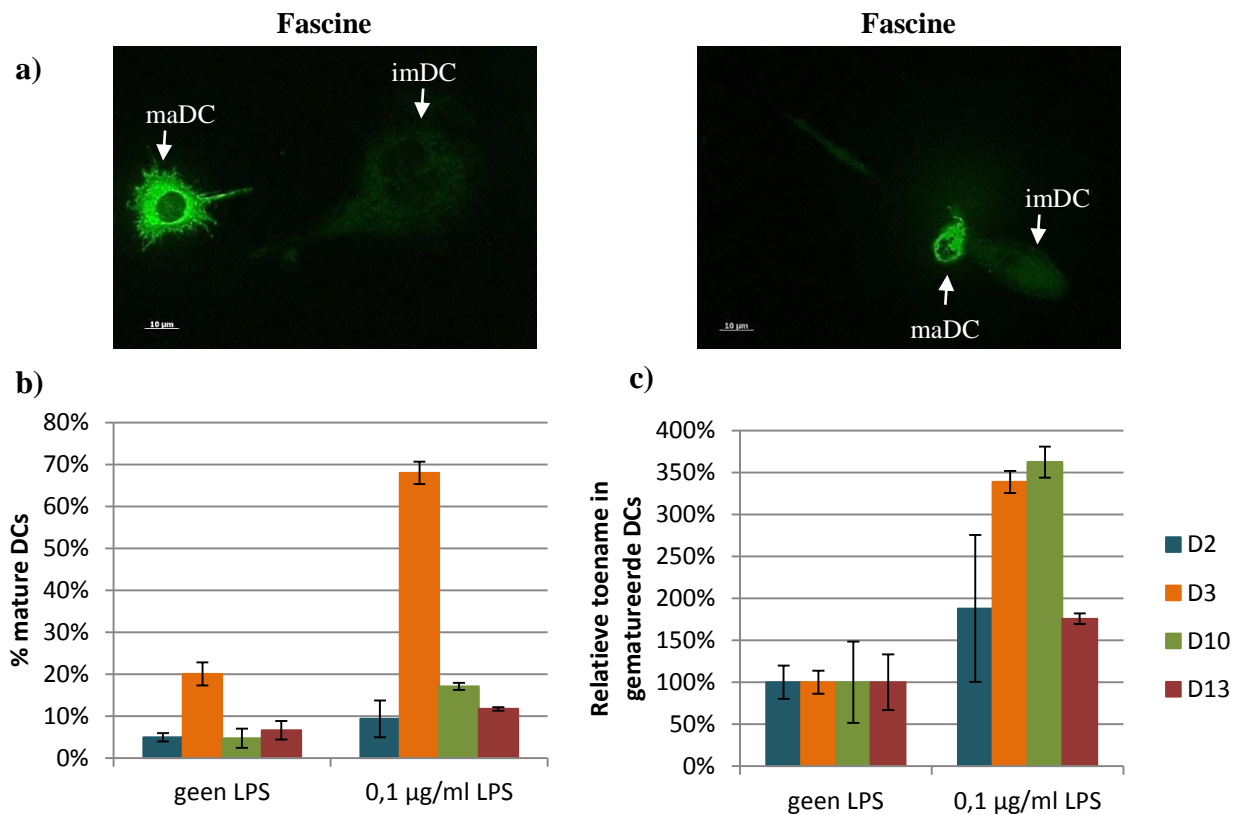
3.2.1 Fascine-expressie stijgt bij maturatie

Mature DCs worden gekenmerkt door hun hoog gehalte aan fascine ten opzichte van immature DCs [48] en dit werd bevestigd via een Western blot experiment (**Figuur 10a**). Met een antilichaam specifiek voor Ser39 fosforylering zagen we ook een toename van gefosforyleerd fascine. Een 10x hogere LPS concentratie leidde niet tot een hogere fascine-expressie. Daarom werd voor alle verdere maturatie-experimenten een concentratie van 0.1 μ g/ml LPS aangehouden. Voor cortactine en HS1 was er geen eenduidige expressieverandering tijdens maturatie te zien (**Figuur 10b-d**).

3.2.2 Efficiëntie van DC maturatie

Om de efficiëntie van DC maturatie door toevoeging van 0.1 μ g/ml LPS na te gaan, werd het percentage mature cellen op de coverslips met LPS vergeleken met het percentage op de coverslips waaraan geen LPS werd toegediend. Gezien de hogere expressie van fascine in mature DCs, werd fascine als merker voor maturatie beschouwd (**Figuur 12a**). Zowel voor

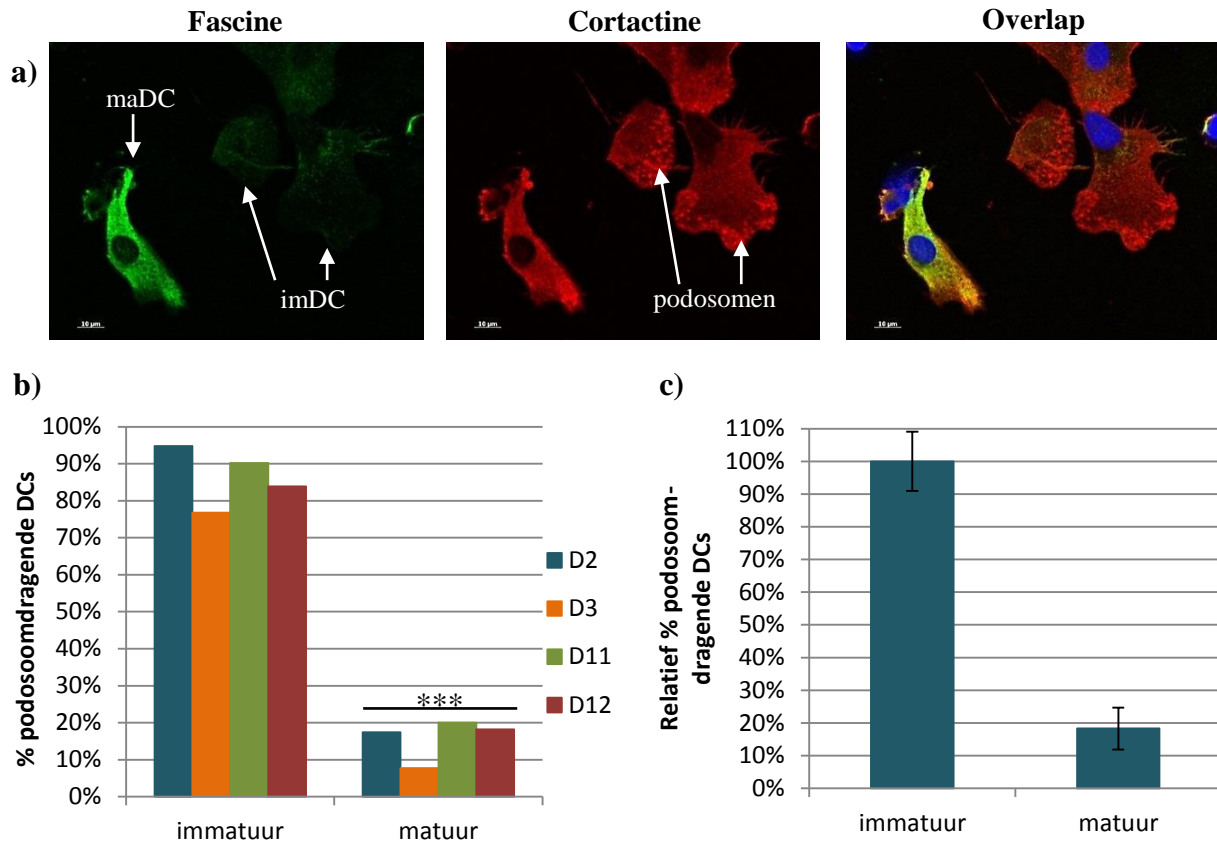
het percentage mature cellen als de relatieve toename in gematureerde cellen, was er een grote variatie tussen DCs van verschillende donoren (**Figuur 12b/c**).



Figuur 12. Efficiëntie van DC maturatie. a) Immuunkleuring met een monokonaal anti-fascinine antilichaam. Op basis van fluorescentie-intensiteit werd het onderscheid gemaakt tussen immature (im) en mature (ma) DCs. Schaal = 10 μm . b) Percentage mature DCs op de coverslips zonder en met LPS bij vier verschillende donoren. Foutbalken geven de SD weer van 3 herhaalde tellingen. $n > 100$. c) Toename in gematureerde DCs ten opzichte van de conditie zonder LPS. Foutbalken geven de SD weer. De nummering van de donoren (D2, D3, D10, D13) komt overeen met de nummering in **Figuur 9**.

3.2.3 Podosoosverlies tijdens maturatie

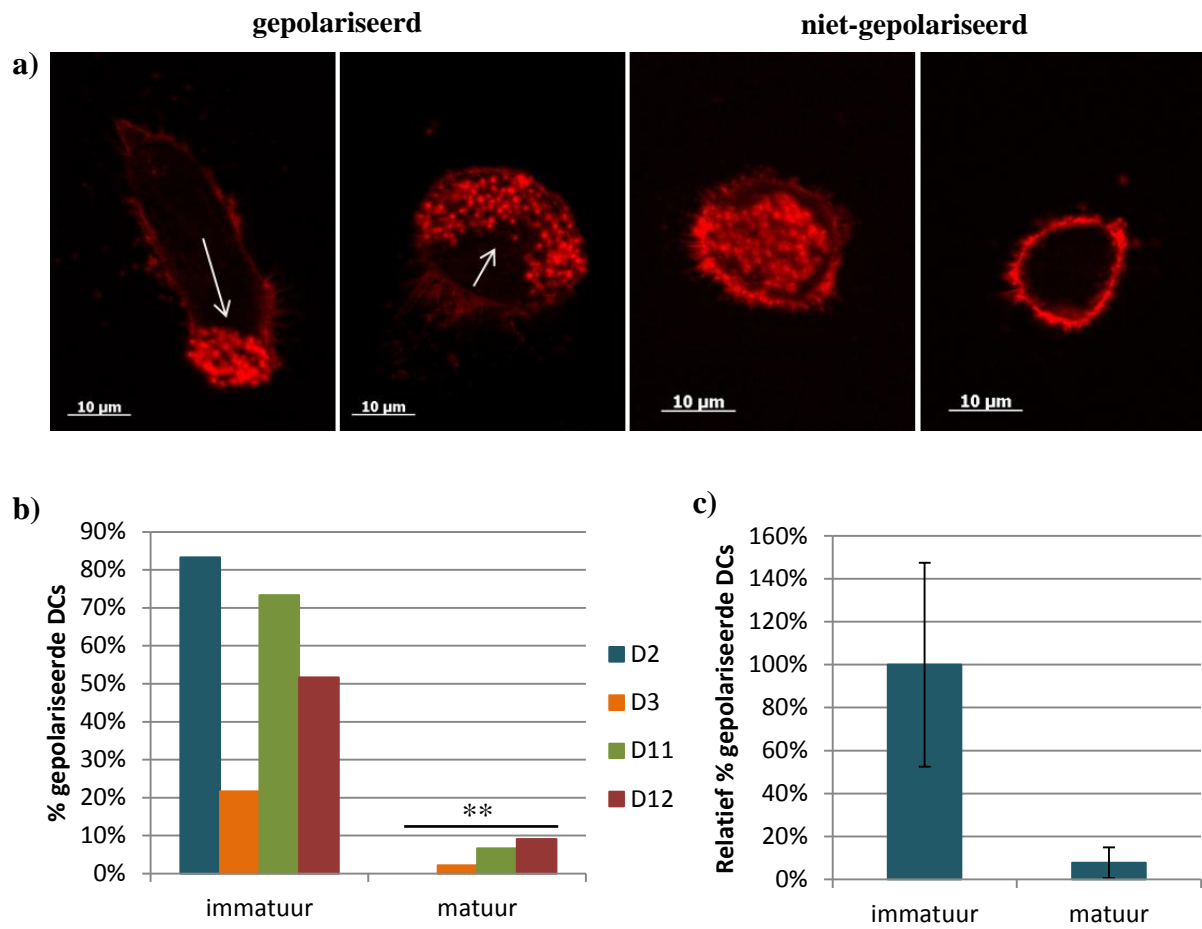
Via immuunkleuring werd waargenomen dat mature DCs vaak kleiner en ronder zijn dan immature DCs en bovendien bevatten ze vaak geen podosomen (**Figuur 13a**). Bijgevolg werd het percentage podosoosdragende immature en mature DCs gekwantificeerd (**Figuur 13b**). Gemiddeld is er een afname van 82% in podosoosdragende cellen tijdens maturatie (**Figuur 13c**).



Figuur 13. Podosoomverlies tijdens maturatie. **a)** Immuunkleuring met een polyklonaal anti-fascin (groen) en monoklonaal anti-cortactine antilichaam (rood). De kernen zijn blauw gekleurd (DAPI). Podosomen zijn vooral aanwezig in immature DCs. Schaal = 10 μ m. **b)** Percentage immature en mature podosoomdragende DCs van vier donoren. De nummering van de donoren (D2, D3, D11, D12) komt overeen met de nummering in Figuur 9. *** $p < 0.001$; ongepaarde t -toets. **c)** Gemiddeld percentage podosoomdragende mature DCs ($n = 192$) relatief ten opzichte van immature DCs ($n = 1049$). Foutbalken geven de SD weer.

3.2.4 Mature DCs zijn minder gepolariseerd

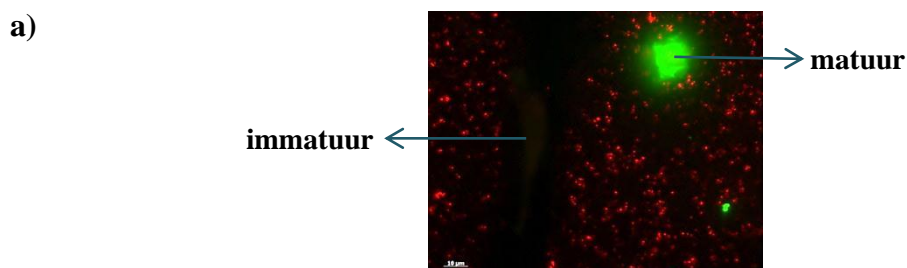
Gepolariseerde cellen worden gedefinieerd als cellen waaraan een bewegingsrichting kan worden toegekend en waarin dus een front met podosomen en achterzijde zonder podosomen onderscheiden kunnen worden. Cellen zonder podosomen of met een homogene verdeling van podosomen werden als niet-gepolariseerd beschouwd. **Figuur 14a** toont voorbeelden van gepolariseerde en niet-gepolariseerde DCs. Het percentage gepolariseerde cellen verschilde sterk tussen DCs van verschillende donoren, maar tijdens maturatie was er steeds een afname in percentage gepolariseerde DCs met een gemiddelde daling van 92% (**Figuur 14b/c**).

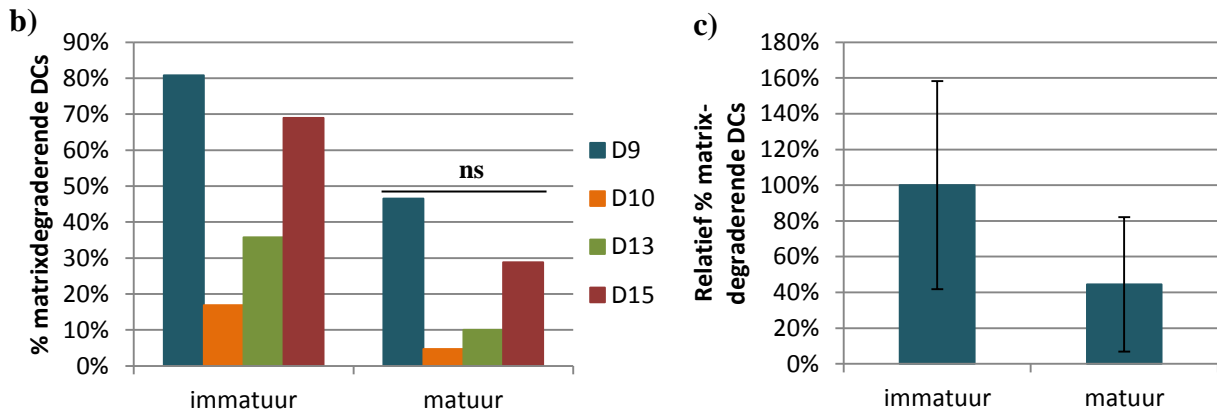


Figuur 14. Afname in polarisatie tijdens maturatie. a) Gepolariseerde en niet-gepolariseerde DCs waarin actine in rood wordt weergegeven (falloidinerood kleuring). Pijlen geven de toegekende migratierichting weer. b) Percentage gepolariseerde immature en mature DCs bij vier donoren. De nummering van de donoren (D2, D3, D11, D12) komt overeen met de nummering in Figuur 9. ** $p < 0.01$; ongepaarde t -toets. c) Gemiddeld percentage gepolariseerde mature DCs ($n = 109$) relatief ten opzichte van immature DCs ($n = 240$). Foutbalken geven de SD weer.

3.2.5 Minder matrixdegradatie door mature DCs

Om na te gaan of het podosoomverlies tijdens maturatie een effect heeft op matrixdegradatie, werden immature en mature DCs uitgezaaid op een rood fluorescent gemerkte gelatinematrix (Figuur 15a). Voor elke donor kon een afname in matrixdegraderende cellen worden waargenomen (Figuur 15b) met een gemiddelde daling van 56%.





Figuur 15. Minder matrixdegradatie door mature DCs. a) Immunkleuring met een monoklonaal anti-fascine antilichaam om het onderscheid te maken tussen immature en mature DCs uitgezaaid op een rode gelatinematrix. Schaal = 10 μ m. b) Percentage matrixdegraderende immature en mature DCs van vier donoren. De nummering van de donoren (D9, D10, D13, D15) komt overeen met de nummering in Figuur 9. ns (niet significant) $p > 0.05$; ongepaarde t -toets. c) Gemiddeld percentage matrixdegraderende mature DCs ($n = 366$) relatief ten opzichte van immature DCs ($n = 601$). Foutbalken geven de SD weer.

3.3 Karakterisatie-experimenten van nanobodies

3.3.1 Algemene kenmerken

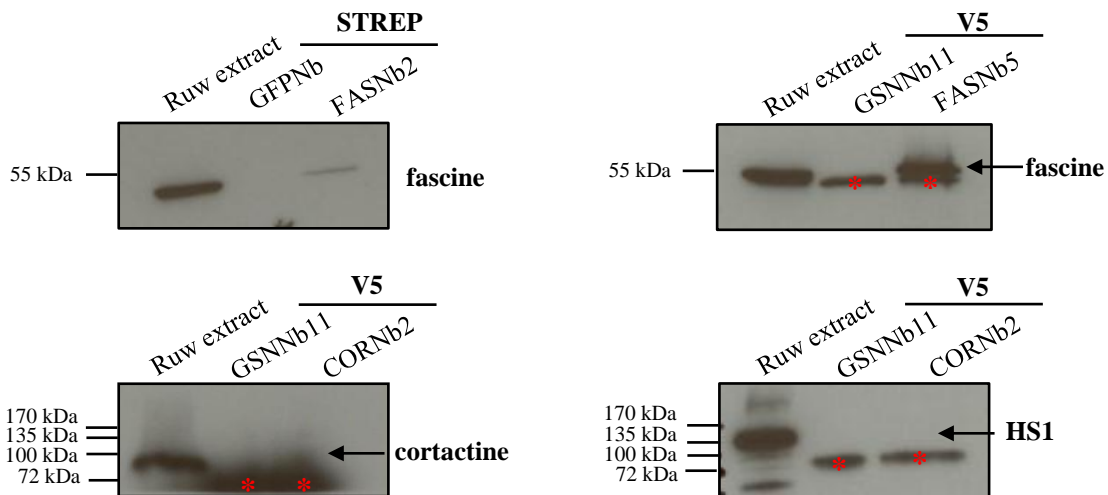
De nanobodies werden verkregen van de Nanobody Service Facility van het Vlaams Instituut voor Biotechnologie waar ze aangemaakt en geïsoleerd werden zoals beschreven in de inleiding (zie 1.1.2.2). Uit zeven nanobodies tegen fascine werden FASNb2 en FASNb5 geselecteerd op basis van hun nanomolaire affiniteit. Via co-immunoprecipitatie werd aangetoond dat beide in staat zijn endogeen fascine te binden [65]. Zowel FASNb2 als FASNb5 binden het vierde β -trefoil domein van fascine, zoals blijkt uit de co-kristalstructuur [Van Audenhove, niet gepubliceerd], maar enkel FASNb5 is in staat de actinebundelende activiteit van fascine te verstoren [65].

Net als de fascine nanobodies werd een cortactine nanobody (CORNb2) geselecteerd dat endogeen cortactine bindt en een nanomolaire affiniteit heeft voor het SH3 domein. Pull-downs met recombinante eiwitten toonden aan dat enkel cortactine en niet HS1 door CORNb2 wordt gebonden [65], wat intracellulair werd bevestigd door co-immunoprecipitatie van endogeen cortactine (en geen HS1) in THP-1 cellen [Van Audenhove, niet gepubliceerd]. In MDA-MB-231 cellen verstoort CORNb2 selectief het rekruteren van WIP naar de plasmamembraan [65]. De nanobodies werden in DCs tot expressie gebracht via Neon[®] transfectie. De transfectie-opbrengst was lager dan 1%, maar stelde ons toch in staat

kwantificaties op getransfecteerde cellen te doen. Dit is in tegenstelling tot lentivirale transductie die niet tot nanobody-expresserende DCs leidde.

3.3.2 Pull-down experimenten

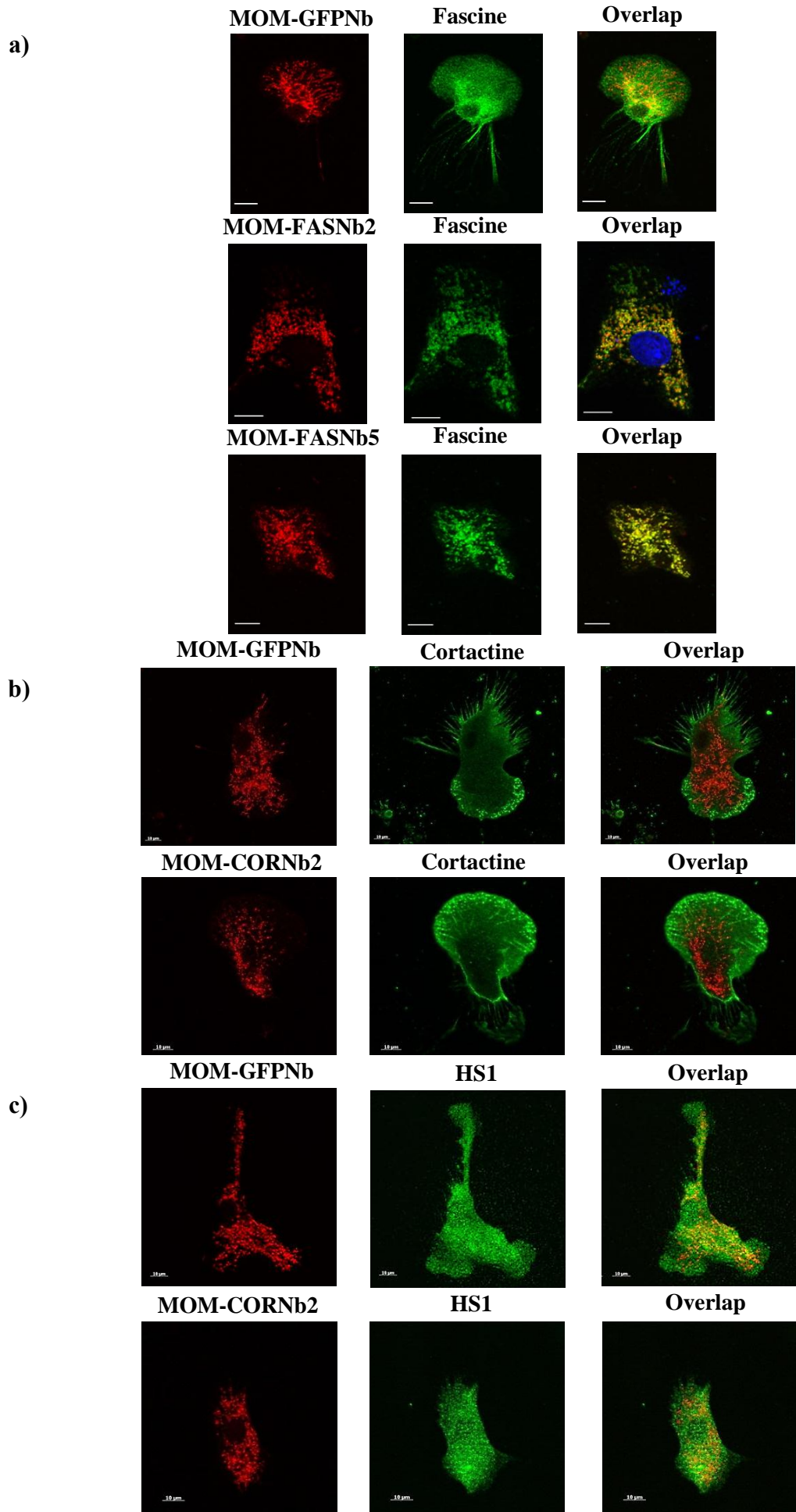
Om aan te tonen dat de nanobodies ook fascine en cortactine van DCs binden, werden pull-down experimenten uitgevoerd (**Figuur 16**). GFPNb of GSNNb11 (een nanobody dat de N-terminale helft van gelsoline bindt), werd daarbij als negatieve controle gebruikt. Zowel FASNb2 als FASNb5 hadden duidelijk fascine gebonden. Voor CORNb2 daarentegen kon er geen signaal van cortactine worden waargenomen. Er was ook geen specifieke binding met HS1.



Figuur 16. Pull-down van endogeen fascine en cortactine met recombinante nanobodies. DC lysaten werden geïncubeerd met GFPNb-His₆-STREP, FASNb2-His₆-STREP, GSNNb11-V5, SUMO-FASNb5-V5 of CORNb2-V5. Naargelang de tag (STREP of V5) werden Strep-Tactin of anti-V5-agarosebeads toegevoegd. De blots werden gekleurd voor fascine, cortactine of HS1. Bij pull-down met anti-V5-agarosebeads is de zware keten van het anti-V5 antilichaam zichtbaar, aangeduid met *.

3.3.3 Intracellulaire delocalisatie-experimenten

Een andere manier om interactie van het nanobody met fascine of cortactine aan te tonen gebeurde met nanobodies voorzien van een MOM-tag, die het intrabody naar de buitenste mitochondriaal membraan delocaliseert. Bij intracellulaire interactie kunnen bindingspartners van het nanobody bijgevolg mee gedelocaliseerd worden. Zowel met FASNb2 als FASNb5 werd duidelijke delocalisatie van fascine waargenomen (**Figuur 17a**). Met CORNb2 daarentegen was er geen delocalisatie van cortactine (**Figuur 17b**). Zoals verwacht leidde CORNb2 ook niet tot delocalisatie van HS1 (**Figuur 17c**).

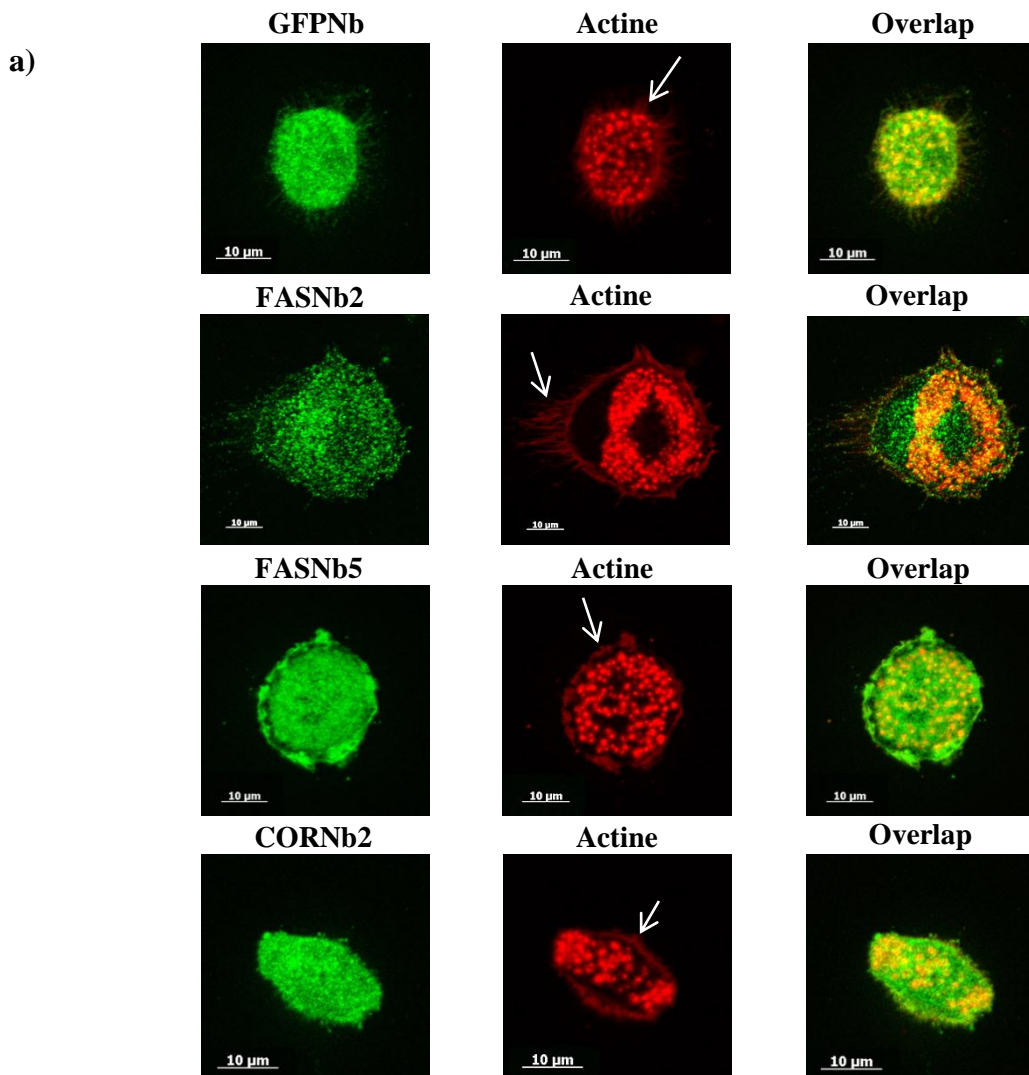


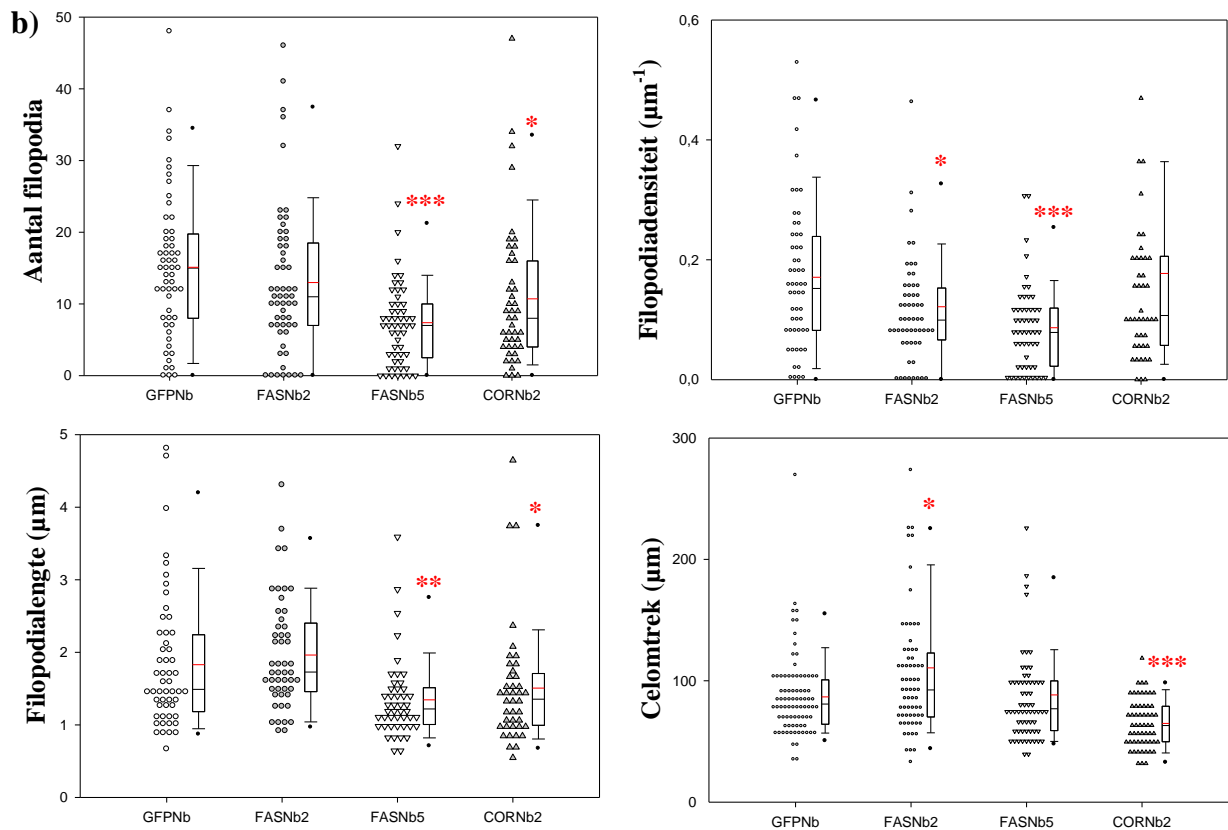
Figuur 17. Intracellulaire delocalisatie-experimenten. Immunkuering met een monoklonaal anti-fascine (a), een monoklonaal anti-cortactine (b) of monoklonaal anti-HS1 (c) antilichaam (groen) en een mono- of polykloonaal anti-V5 antilichaam (rood) voor aankleuring van de MOM-nanobodies (voorzien van een V5-tag). MOM-GFPNb werd gebruikt als een negatieve controle. In de tweede cel is de kernkleuring (DAPI, blauw) weergegeven. Schaal = 10 μm .

3.4 Functionele experimenten met nanobodies

3.4.1 Effect op filopodia-aantal en -lengte

Om het belang van fascine actinebundeling en het cortactine SH3 domein in filopodia na te gaan, werden de met nanobody-getransfecteerde DCs geanalyseerd op aantal en lengte van filopodia. FASNb5 leidde tot kortere en minder filopodia (**Figuur 18**). Ook het aantal filopodia relatief ten opzichte van de celomtrek (filopodiadensiteit) daalde significant. Echter, FASNb2 dat actinebundeling niet verstoort, leidde ook tot minder filopodia/ μm , maar de omtrek van FASNb2-getransfecteerde cellen bleek dan ook groter. CORNb2 daarentegen leidde tot een kleinere omtrek en net als FASNb5 tot minder en kortere filopodia, zij het iets minder uitgesproken.



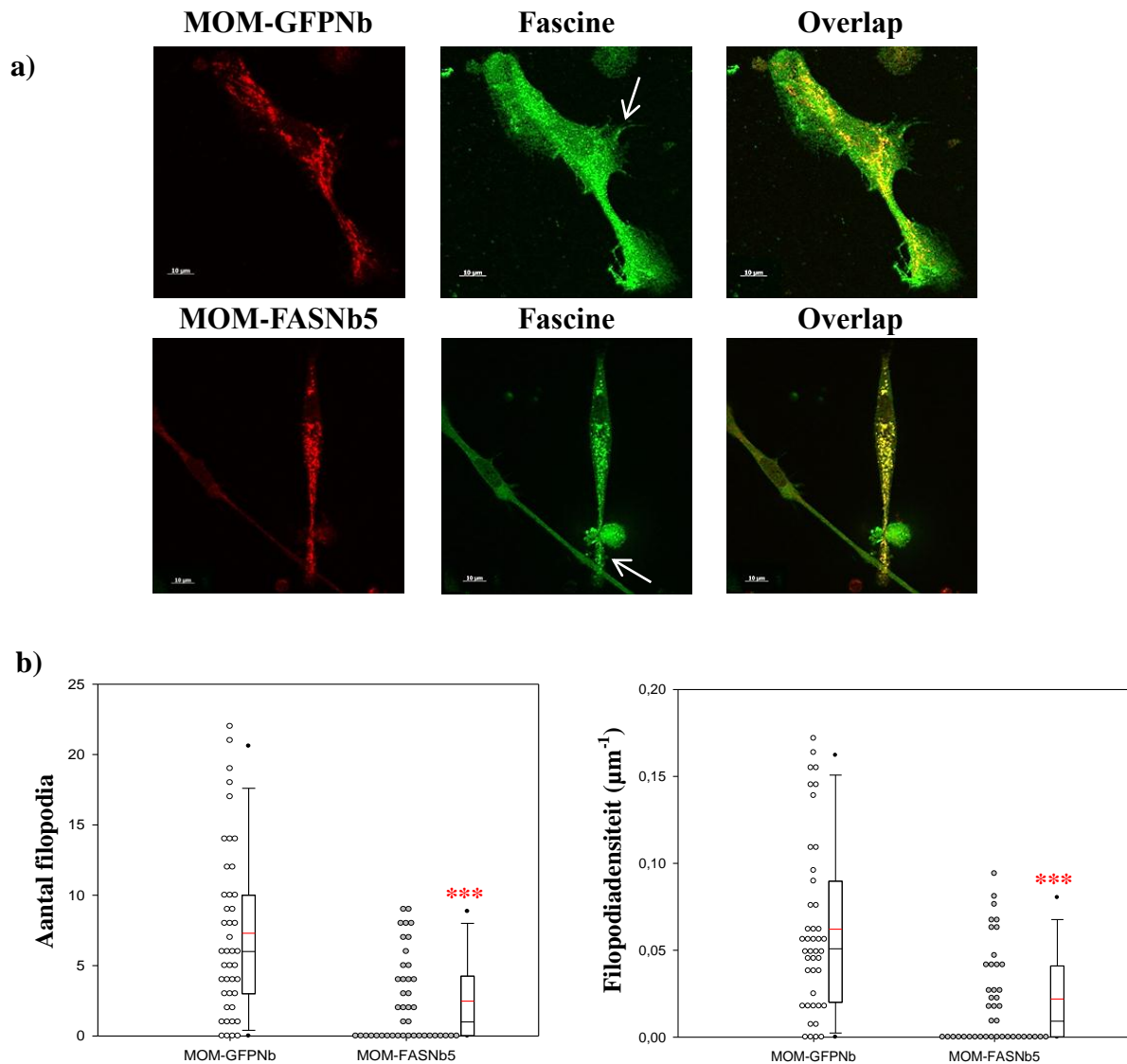


Figuur 18. Effect van nanobodies op filopodia-aantal en -lengte. a) Immuunkleuring met respectievelijk een monoklonaal anti-V5 antilichaam (groen) en falloidinerood voor visualisatie van de nanobodies en actine. Representatieve weergaven van elke conditie. Pijlen wijzen voorbeelden van filopodia aan. Schaal = 10 μm . b) Dot density plots en boxplots voor het aantal filopodia, filopodiadensiteit⁴ (aantal filopodia relatief ten opzichte van de celomtrek in μm), filopodialengte en celomtrek⁵ in cellen getransfecteerd met GFPNb ($n = 56$), FASNb2 ($n = 57$), FASNb5 ($n = 53$) of CORNb2 ($n = 44$), afkomstig van 3 verschillende donoren. Elk symbool stelt een individuele cel voor. Cellen zonder filopodia werden niet meegeanalyseerd voor kwantificatie van filopodialengte. Statistische significanties werden berekend ten opzichte van GFPNb. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney U toets.

Delokalisatie van fascine met MOM-FASNb5 reduceerde het aantal filopodia en filopodiadensiteit (**Figuur 19**). Op de celomtrek of filopodialengte was geen effect waarneembaar (niet weergegeven).

⁴ Om optimaal van de schaal gebruik te kunnen maken, worden volgende outliers niet in de grafiek weergegeven: FASNb2: 0.72; CORNb2: 1.11; 0.98. Statistische analyses en boxplots zijn wel gebaseerd op alle data.

⁵ Om optimaal van de schaal gebruik te kunnen maken, worden volgende outliers niet in de grafiek weergegeven: FASNb2: 568.38; FASNb5: 328.75. Statistische analyses en boxplots zijn wel gebaseerd op alle data.



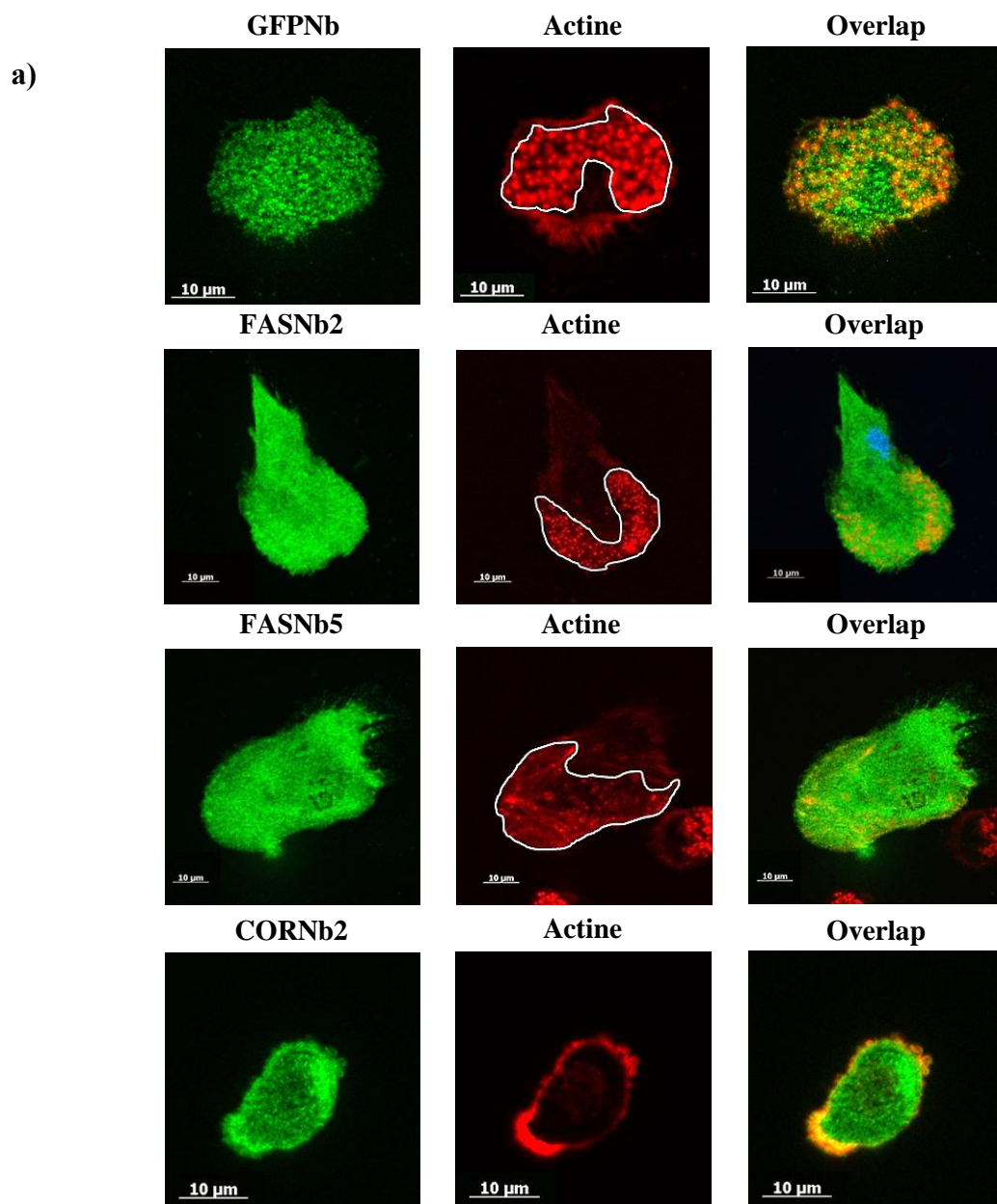
Figuur 19. Effect van MOM-FASNb5 op filopodia-aantal en -densiteit. **a)** Immuunkleuring met een polykloonaal anti-V5 antilichaam (visualisatie nanobody, rood) en een monokloonaal anti-fascine antilichaam (groen). Representatieve weergaven van elke conditie. Pijlen wijzen voorbeelden van filopodia aan. Schaal = 10 μm . **b)** Dot density plots en boxplots voor het aantal filopodia en filopodiadensiteit (aantal filopodia relatief ten opzichte van de celomtrek in μm) in cellen getransfecteerd met MOM-GFPNb ($n = 43$) en MOM-FASNb5 ($n = 41$), afkomstig van 3 verschillende donoren. Elk symbool stelt een individuele cel voor. Statistische significanties werden berekend ten opzichte van MOM-GFPNb. *** $p < 0,001$; Mann-Whitney U toets.

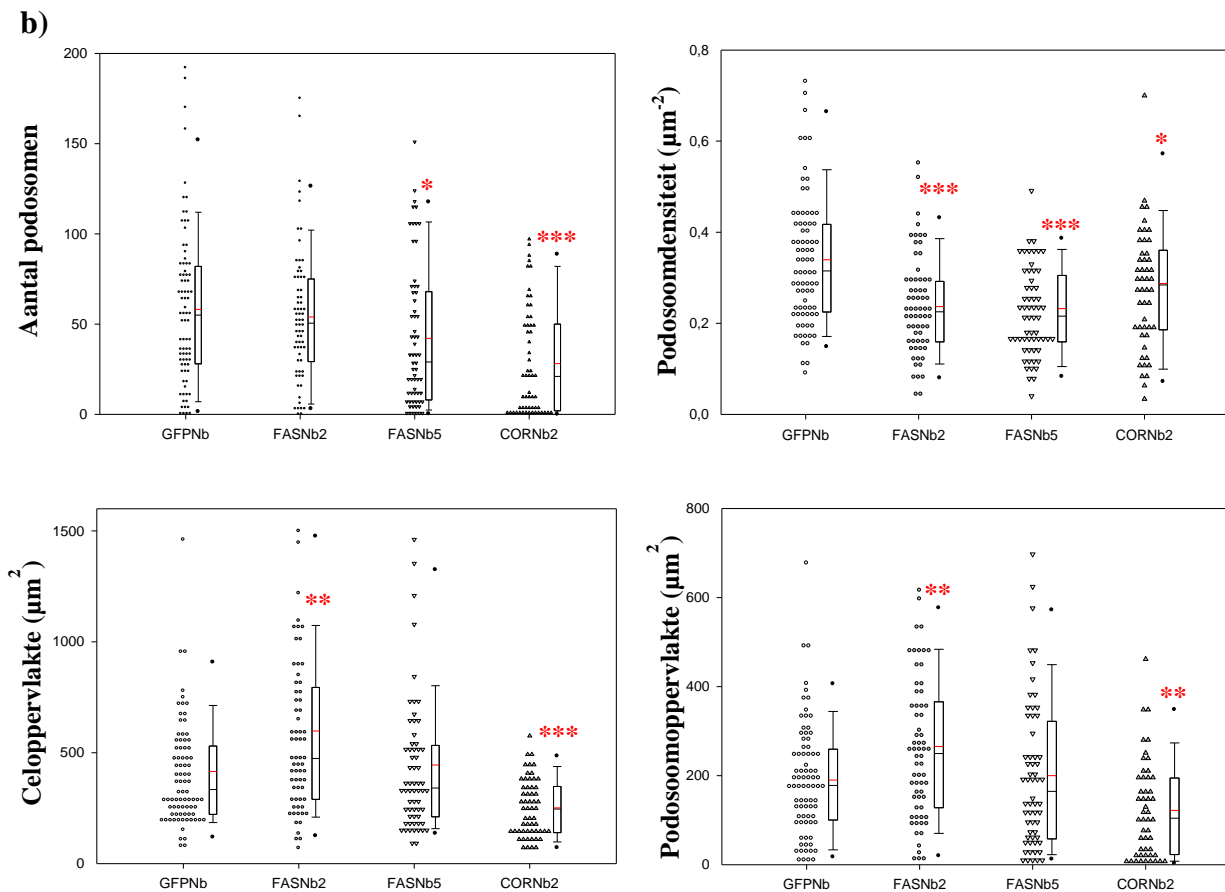
3.4.2 Effect op podosoomaantal en -densiteit

Aangezien zowel fascine als cortactine aanwezig zijn in podosomen, wilden we het effect nagaan van de nanobodies op podosoomaantal en -densiteit. Podosoomdensiteit werd berekend door het aantal podosomen te delen door de oppervlakte ingenomen door alle

podosomen samen (= podosoomoppervlakte), wat een maat is voor hoe dicht de podosomen bij elkaar liggen. Ook de totale celoppervlakten werden bepaald.

FASNb5 reduceerde het aantal podosomen en de podosoomdensiteit, wat erop wijst dat de podosomen meer gespreid zijn. Inderdaad, het podosoomoppervlak blijft even groot terwijl er minder podosomen aanwezig zijn (**Figuur 20**). CORNb2-getransfecteerde DCs waren opnieuw significant kleiner en reduceerden bovendien podosoomaantal, -densiteit en -oppervlakte. Transfectie met FASNb2 vergrootte het cel- en podosoomoppervlak en leidde tot een daling van de podosoomdensiteit.





Figuur 20. Effect van nanobodies op podosoomaantal en -densiteit. a) Immunkleuring met respectievelijk een monoklonaal anti-V5 antilichaam (groen) en falloïdinerood voor visualisatie van de nanobodies en actine. Representatieve weergaven van elke conditie. De podosooppervlakte is de oppervlakte ingenomen door alle podosomen samen (in het wit omlijnd). Schaal = 10 μm . b) Dot density plots en boxplots voor het aantal podosomen, podosoomsiteit⁶ (aantal podosomen relatief ten opzichte van de podosooppervlakte in μm^2), cel⁷- en podosooppervlakte⁸ in cellen getransfecteerd met GFPNb ($n = 83$), FASNb2 ($n = 68$), FASNb5 ($n = 63$) of CORNb2 ($n = 57$), afkomstig van 3 verschillende donoren. Elk symbool stelt een individuele cel voor. Cellen zonder podosomen werden niet meegeanalyseerd voor kwantificatie van podosoomsiteit en -oppervlakte. Statistische significanties werden berekend ten opzichte van GFPNb. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mann-Whitney U toets.

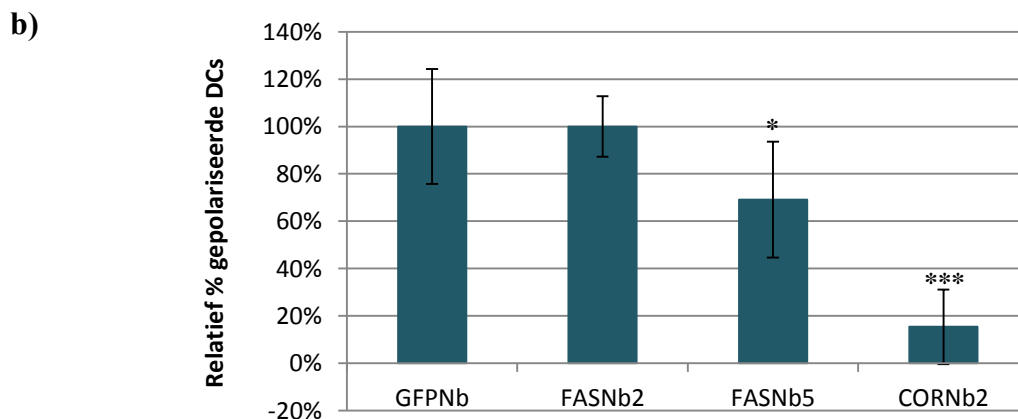
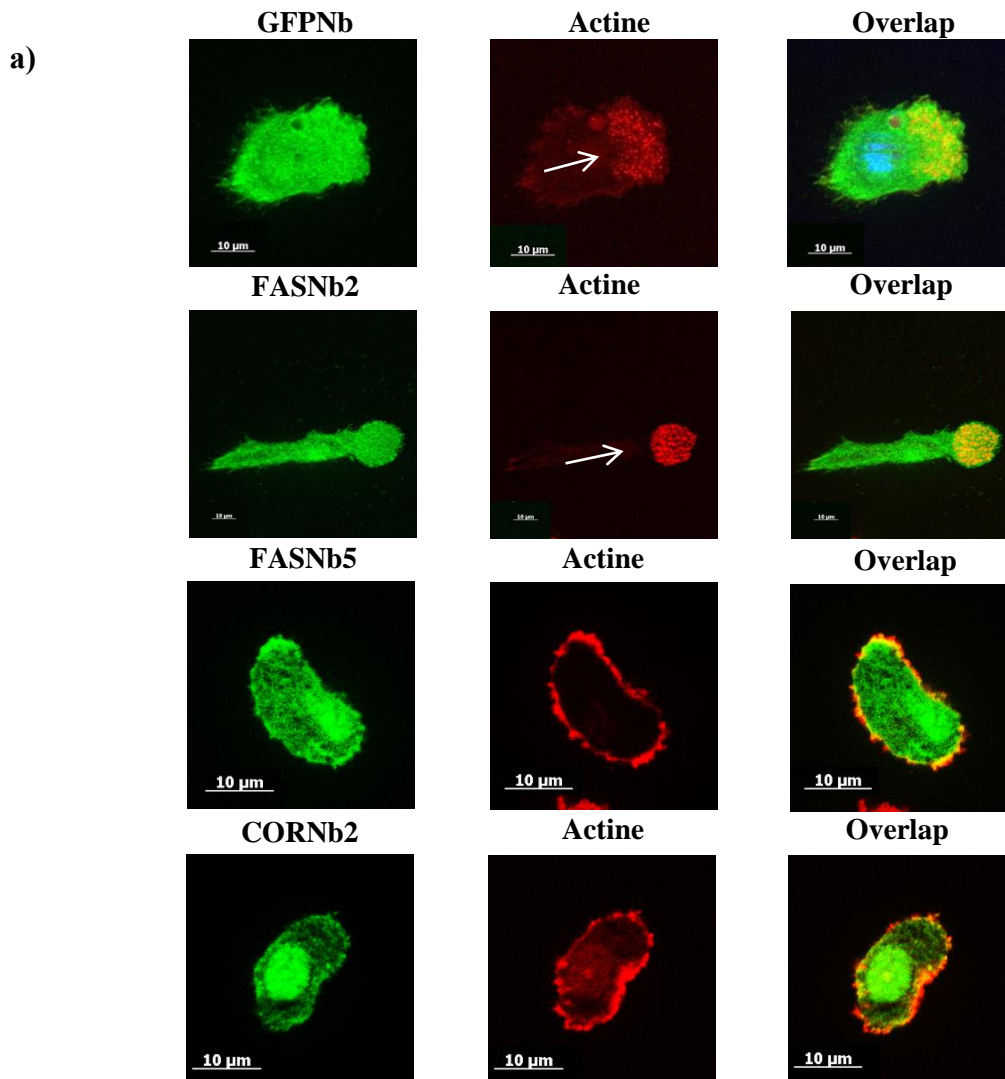
⁶ Om optimaal van de schaal gebruik te kunnen maken, worden volgende outliers niet in de grafiek weergegeven: GFPNb: 0.80; FASNb5: 0.82; CORNb2: 1.02. Statistische analyses en boxplots zijn wel gebaseerd op alle data.

⁷ Om optimaal van de schaal gebruik te kunnen maken, worden volgende outliers niet in de grafiek weergegeven: GFPNb: 1997.35; FASNb2: 1937.65; 2201.03; FASNb5: 1816.71. Statistische analyses en boxplots zijn wel gebaseerd op alle data.

⁸ Om optimaal van de schaal gebruik te kunnen maken, wordt volgende outlier niet in de grafiek weergegeven: FASNb2: 961.44. Statistische analyses en boxplots zijn wel gebaseerd op alle data.

3.4.3 Effect op polarisatie

De effecten van de nanobodies op filopodia en podosomen deden vermoeden dat er ook een effect op polarisatie zou zijn. Inderdaad, zowel voor FASNb5 als CORNb2 kon een significante reductie in aantal gepolariseerde cellen worden waargenomen (**Figuur 21**).



Figuur 21. Effect van nanobodies op polarisatie. **a)** Immuunkleuring met een monoklonaal anti-V5 antilichaam (groen) en falloïdinerood voor respectievelijk visualisatie van de nanobodies en actine. Representatieve weergaven van elke conditie. Pijlen geven de toegekende migratierichting weer. Schaal = 10 μ m. **b)** Percentage gepolariseerde DCs getransfecteerd met GFPNb ($n = 83$), FASNb2 ($n = 68$), FASNb5 ($n = 63$) of CORNb2 ($n = 57$), afkomstig van 3 verschillende donoren, relatief ten opzichte van GFPNb. Foutbalken geven de SD weer. Statistische significanties werden berekend ten opzichte van GFPNb. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ongepaarde t -toets.

3.4.4 Effect op matrixdegradatie

De podosoomdaling geïnduceerd door FASNb5 of CORNb2 zou mogelijks een effect kunnen hebben op matrixdegradatie. Om dit na te gaan, werden de DCs onmiddellijk na transfectie uitgezaaid op een rode gelatinematrix en 20, 28 of 60 uur later gefixeerd. Echter, in geen enkele conditie werden matrixdegraderende cellen waargenomen, waardoor vergelijking tussen de verschillende nanobodies onmogelijk was. Ook bij de niet-getransfecteerde DCs die het Neon[®] transfectie protocol doormaakten, is er nauwelijks matrixdegradatie.

3.5 Samenvattende tabel

Een overzicht van de statistisch significante effecten geïnduceerd door nanobody-expressie of maturatie wordt weergegeven in **Tabel 1**.

Tabel 1. Overzicht van de statistisch significante resultaten

	maturatie	FASNb2	FASNb5	CORNb2
Filopodia-aantal	-	ns	***	*
Filopodiadensiteit	-	*	***	ns
Filopodialengte	-	ns	**	*
Celomtrek	-	*	ns	***
Podosoomaantal [#]	***	ns	*	***
Podosoomdensiteit	-	***	***	*
Podosoomoppervlakte	-	**	ns	**
Celoppervlakte	-	**	ns	***
Polarisatie	**	ns	*	***
Matrixdegradatie	ns (dalende trend)	?	?	?

Significanties ten opzichte van GFPNb; ns (niet significant) $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; - niet bepaald; ? geen resultaat; **groen** = stijging; **roze** = daling; [#] % podosoomdragende DCs (bij maturatie) of aantal podosomen/cel (bij FASNb2/5 en CORNb2)

4. Bespreking

4.1 DCs als gastheer van de nanobodies

In deze masterproef gebruikten we nanobodies om specifieke functies en domeinen van fascine en cortactine te bestuderen in humane monocyt-afgeleide DCs. We werkten met primaire cellen om zo goed mogelijk de *in vivo* DC biologie na te bootsen en omdat humane DC-achtige cellijnen (KG-1, THP-1, MUTZ-3) nog steeds geen volledig model zijn van alle DC functies (vb. podosoomvorming, maturatie) [66]. De gecultiveerde cellen hadden steeds een DC fenotype met lamellipodia en podosomen. In deze podosomen bleek fascine zich hoger te bevinden dan cortactine, in een zogenaamde ‘cap’structuur, zoals eerder ook beschreven werd voor het actinebundelend formine FMNL1 [29]. Dit kan worden verklaard door de verschillende functies van fascine en cortactine in podosomen. Fascine zal parallelle actinebundels vormen in de ‘cap’, welke de stuwende kracht vormen van het podosoom tegen de ECM. Cortactine daarentegen activeert het Arp2/3 complex en stabiliseert vertakte actinefilamenten, functies aan de basis en centraal in de podosoomstructuur (**Figuur 4**) [30]. Ook zijn hematopoëtisch homoloog HS1 kan deze functies uitvoeren [60], wat wellicht de colokalisatie van cortactine en HS1 in podosomen verklaart. Via Western blotting toonden we aan dat DCs meer HS1 dan cortactine bevatten, al is het nog niet duidelijk of dat ook voor individuele podosomen geldt. HS1 is immers ook essentieel voor receptor-gemedieerde endocytose in DCs en draagt zo bij tot antigeenpresentatie [64], terwijl voor cortactine nog geen additionele functies in DCs zijn beschreven. Cortactine is daarentegen sterk opgereguleerd in kankercellen.

Verhoogde fascine-expressie werd gezien bij mature DCs en deze toename is bovendien een onderschatting, aangezien hiervoor cellysaten werden gebruikt van DCs gecultiveerd met of zonder LPS. Indien mature DCs vooraf geïsoleerd zouden worden op basis van een maturatiemerker zoals CD83 [25], zou de toename van fascine meer uitgesproken zijn. Met een antilichaam specifiek voor Ser39 fosforylering zagen we eveneens een verhoogde fosfoscine-expressie tijdens maturatie, maar aangezien deze toename nagenoeg evenredig is met verhoogde fascine-expressie, kunnen we niet besluiten dat de graad van fosforylering sterker is in mature DCs.

Aangezien we met de nanobodies de effecten van fascine-inhibitie in DCs willen bestuderen en mature DCs daarentegen gekenmerkt worden door een sterk verhoogde fascine-expressie,

vonden we het interessant eerst de morfologische verschillen tussen immature en mature DCs na te gaan. Net als Burns *et al.* (2004) zagen we een verlies van podosomen tijdens maturatie [25]. Dit ging gepaard met afname in polarisatie, aangezien een podosoomrijk celfront kenmerkend is voor directioneel migrerende cellen. Bovendien zagen we dat mature DCs minder in staat zijn de gelatinematrix te degraderen. De associatie tussen podosoomverlies en verminderde matrixdegradatie komt overeen met de bevindingen van West *et al.* (2008), die het tijdelijke podosoomverlies na Toll-like receptor activatie associeerden met afname in matrixdegradatie [26].

4.2 Karakterisatie-experimenten van nanobodies

Via co-immunoprecipitatie en delokalisatie-experimenten werd reeds aangetoond dat FASNb2, FASNb5 en CORNb2 hun doelwit binden in PC-3 cellen [65]. Ook in DCs binden FASNb2 en FASNb5 fascine, zoals blijkt uit intracellulaire delokalisatie met MOM-nanobodies en recombinante pull-down van fascine. Met CORNb2 daarentegen kon in DCs geen binding met cortactine worden aangetoond. Voor pull-down zal het lage cortactine gehalte in DCs beperkend geweest zijn, aangezien ook geen grote hoeveelheid lysaat kon worden aangeboden. Voor HS1 daarentegen zijn er hoge gehalten aanwezig die toch niet neergehaald worden door CORNb2, wat zijn specificiteit lijkt te bevestigen. Intracellulair is het mogelijk dat de tertiaire structuur en de interactiepartners van cortactine, waarvan er vele het SH3 domein binden, efficiënte delokalisatie verhinderen.

4.3 Functionele experimenten met nanobodies

We brachten de nanobodies tot expressie met behulp van de op elektroporatie-gebaseerde Neon[®] transfectie [67-69]. De transfectie-efficiëntie van de primaire DCs was laag (<1%), maar liet ons toch toe voldoende cellen te transfecteren om kwantificatie mogelijk te maken. Ondanks de gesuggereerde bruikbaarheid van het Tet-On advanced systeem in primaire cellen, bleek de lentivirale transductie onsuccesvol. Mogelijks lag de lentivirale vector of zijn specifieke promotor aan de basis van het falen van transductie. De vereiste condities voor efficiënte humane DC transductie zijn immers nog niet duidelijk gekarakteriseerd. Inderdaad, in de literatuur worden hiervoor verschillende types vectoren en virussen gebruikt met wisselend succes [70-73].

4.3.1 Minder en kortere filopodia met FASNb5 en CORNb2

Net als andere beweeglijke celtypes zijn DCs rijk aan filopodia, vingervormige membraanprotrusies die de omgeving aftasten en geassocieerd zijn met fascine-expressie [44,49]. FASNb5 en niet FASNb2 leidde tot minder en kortere filopodia, waaruit we kunnen besluiten dat de actinebundelende activiteit van fascine noodzakelijk is voor filopodiavorming. Delokalisatie van fascine naar de mitochondriën met MOM-FASNb5 lijkt nog grotere effecten te hebben dan verstoring van actinebundeling met FASNb5 bij vergelijking van de absolute waarden. Dit zou betekenen dat fascine naast actinebundeling nog een andere functie in filopodia heeft. Echter, beide condities kunnen niet vergeleken worden aangezien filopodia van MOM-FASNb5-getransfecteerde DCs met een anti-fascine antilichaam werden gevisualiseerd en FASNb5-getransfecteerde DCs met falloïdine. De minder duidelijke filopodia via fascine immuunkleuring zouden dan ook kunnen verklaren waarom we met MOM-FASNb5 geen effect zagen op filopodialengte. In PC-3 cellen leidden FASNb5-EGFP en MOM-FASNb5-EGFP eveneens tot een lager filopodia-aantal en de effecten van beide nanobodies waren gelijkaardig [65]. Bovendien is er al veel evidentie geleverd dat de actinebundelende activiteit van humaan fascine essentieel is voor filopodiavorming [39,40], al werd voor *Drosophila* fascine ook een bijkomende functie gesuggereerd [74].

Net als fascine bevatten plastines (fimbrines) actinebundelende activiteit en komen ze voor in filopodia. Plastines zijn ook aangerijkt in lamellipodia, in tegenstelling tot fascine [75]. L-plastine is specifiek voor leukocyten, maar wordt ectopisch geëxprimeerd in kankercellen. Een L-plastine nanobody dat actinebundeling verstoort, leidt in PC-3 cellen tot minder filopodia en dit wordt gedeeltelijk hersteld door overexpressie van fascine. Dit is suggestief voor coöperatie tussen fascine en L-plastine bij filopodiavorming in PC-3 cellen [14]. L-plastine komt ook voor in DCs, maar er is geen opregulatie tijdens maturatie [54]. Het zou interessant zijn om in DCs na te gaan of L-plastine overexpressie de effecten van het fascine nanobody kan herstellen en omgekeerd.

CORNb2 leidde ook tot kortere en minder filopodia, al is het effect minder uitgesproken dan voor FASNb5. Cortactine kan een indirecte rol hebben in filopodiavorming gebaseerd op de interactie met WIP [76], wat specifiek verstoord wordt door CORNb2 [65]. Het is ook mogelijk dat deze effecten veroorzaakt werden door de minder efficiënte spreiding en dus kleinere celoppervlakken van CORNb2-expresserende cellen, aangezien filopodiadensiteit per eenheid van celomtrek niet meer significant verschilde.

4.3.2 Podosoomdaling met FASNb5

Podosomen worden gekenmerkt door een actinekern omgeven door een ring van integrinen. Ook tal van andere eiwitten hebben een structurele of functionele rol in podosomen, waaronder fascine en cortactine [29]. Zowel FASNb5 als CORNb2 leidden tot minder podosomen en bijgevolg een lagere podosoomdensiteit. FASNb2 had geen effect op het aantal podosomen, wat aantoont dat de actinebundelende activiteit van fascine betrokken is in podosoomvorming in immature DCs. Ook in gladde spiercellen is fascine vereist voor podosoomvorming [33] en lokalisatie van fascine ter hoogte van podosomen werd eveneens in THP-1 cellen gezien [54]. Echter, Yamakita *et al.* (2011) toonden aan dat fascine noodzakelijk is voor disassemblage van podosomen tijdens DC maturatie [54]. Ook wij zagen een podosoomdaling in mature DCs. Deze tegenstrijdige rol van fascine in podosomen kan mogelijks verklaard worden door het expressieniveau van fascine. Er wordt immers gesuggereerd dat de abundante aanwezigheid van fascine in mature DCs de actinefilamenten verzadigt, waardoor andere actinebindende eiwitten niet langer hun functie in podosoomvorming kunnen uitoefenen. Dit zou verklaren waarom in immature DCs, THP-1 cellen en gladde spiercellen, met lage expressieniveaus van fascine, een podosoom-assemblerende rol van fascine wordt gezien [54].

In tegenstelling tot het effect in podosomen, leidde FASNb5 niet tot minder invadopodia in MDA-MB-231 cellen. Wel was er een verstoord invadopodiapatroon en een kortere levensduur van de invadopodia. Fascine actinebundeling lijkt dus vooral een rol te hebben in de maturatie van invadopodia en niet bij de initiatie [65]. Het zou alvast interessant zijn om ook de levensduur van podosomen te bestuderen in FASNb5-expresserende immature DCs, maar hiervoor zouden de DCs het nanobody stabiel tot expressie moeten brengen. Verder zou de combinatie met een L-plastine nanobody bestudeerd kunnen worden, aangezien L-plastine ook nodig is voor podosoomvorming en -stabiliteit [17].

4.3.3 Podosoomdaling met CORNb2

CORNb2 leidde tot minder en ‘losser gepakte’ podosomen in DCs, wat overeenkomt met de waarnemingen in MDA-MB-231 invadopodia [65]. Dit kan veroorzaakt worden door een verminderde rekrutering van cortactine naar podosoom initiatieplaatsen, wat afhangt van het SH3 domein [77]. Hierover is evenwel geen consensus, aangezien in osteoclasten werd aangetoond dat het SH3 domein van cortactine niet essentieel is voor podosoominitiatie [78]. Om een volledig beeld te hebben zouden ‘live cell imaging’ experimenten moeten worden

uitgevoerd, aangezien ook al is aangetoond dat podosomen in HS1^{-/-} DCs een verminderde levensduur hebben [62] en cortactine-WIP interactie betrokken is in maturatie en stabilisatie van muis DC podosomen [63].

4.3.4 FASNb2 en CORNb2 beïnvloeden DC spreiding

Opmerkelijk was dat FASNb2 de celomtrek en -oppervlakte (celspreiding) vergrootte, wat resulteerde in een lagere filopodia- en podosoomdensiteit. In THP-1 cellen leidde FASNb2 ook tot een grotere spreiding van de cel, maar enkel wanneer de cellen op een coating werden uitgezaaid [Van Audenhove, niet gepubliceerd]. DCs geïsoleerd uit fascine knock-out muizen zijn eveneens meer uitgestrekt dan wild-type DCs en dit op niet-gecoate coverslips [54]. In PC-3 cellen op collageen I coating leidde FASNb2 niet tot meer celspreiding, terwijl er net minder celspreiding met FASNb5 werd gezien [65]. Fascine siRNA had geen effect op de celspreiding van de A375MM humane melanoma cellijn op gelatine coating [45], net als shRNA hierop geen effect had in B16F1 muis melanoma cellen [75]. Over het effect van fascine-inhibitie op celspreiding zijn er dus heel wat tegenstrijdigheden in de literatuur en wellicht is het celtype en de celomgeving (ECM) hierbij bepalend. Het is inderdaad zo dat fascine onder controle staat van de ECM, aangezien protrusievorming toe- en afneemt met respectievelijk thrombospondin-1 en fibronectine [44].

In tegenstelling tot FASNb2 leidde CORNb2 tot een kleinere omtrek en oppervlakte. De rol van cortactine in celspreiding werd ook al in COS7 fibroblast-achtige cellen aangetoond, waarbij gesuggereerd werd dat de interactiepartners van het SH3 domein hierbij betrokken zijn [79]. Hier konden we alvast aantonen dat cortactine-WIP interactie essentieel is bij celspreiding.

4.3.5 FASNb5 en CORNb2 inhiberen DC polarisatie

Alvorens cellen kunnen migreren, moeten ze gepolariseerd zijn. Polarisation is dan ook de eerste stap als antwoord op een migratiestimulus [80]. In DCs omvat polarisation de vorming van lamellipodia, filopodia en podosomen aan het celfront en dit fenotype is nodig voor directionele migratie [81]. Vandaar dat we de effecten van fascine en cortactine nanobodies op polarisation bepaalden. Aangezien zowel FASNb5 als CORNb2 het aantal filopodia en aantal podosomen reduceerden, was het niet onverwacht dat er ook een verminderde polarisation was. CORNb2 veroorzaakte een sterkere reductie dan FASNb5 wat kan te wijten zijn aan de reeds verminderde spreiding van de cellen. Deze effecten doen vermoeden dat

beide nanobodies leiden tot een afname in directionele migratie. Hiervoor zou een migratie-assay moeten worden uitgevoerd met DCs die het nanobody stabiel tot expressie brengen.

4.3.6 Effecten van nanobodies op matrixdegradatie?

We hebben reeds aangetoond dat fascine en cortactine essentiële componenten zijn van podosomen, structuren die in staat zijn de ECM te degraderen. Fascine is betrokken bij de matrixdegraderende activiteit van invadopodia in A375MM humane melanomacellen en PC-3 prostaatkankercellen [45,65]. Bovendien werd met nanobodies aangetoond dat fascine MMP-9 secretie beïnvloedt onafhankelijk van zijn actinebundelende activiteit [65]. Het zou dus interessant zijn om ook in podosomen de rol van fascine actinebundeling bij matrixdegradatie na te gaan.

Aan cortactine werd zowel in invadopodia als podosomen een essentiële rol toegekend in matrixdegradatie, via het rekruteren van MMPs naar invadosomen [41]. Essentieel hierbij is de interactie tussen WIP en cortactine [63,65]. In CORNb2-expresserende DCs zou er dan ook een sterke reductie van matrixdegradatie worden verwacht.

Helaas genereerden we uit het matrixdegradatie-experiment geen resultaten. Geen enkele getransfekteerde DC was in staat de gelatinematrix te degraderen, zelfs niet na 60 uur, waardoor het effect van de nanobodies niet vergeleken kon worden. Ook niet-getransfekteerde DCs die het transfectie-protocol ondergingen, waren nauwelijks in staat de matrix te degraderen. Blijkbaar zien de cellen te veel af van transfectie om hun matrixdegraderende activiteit aan te vatten. Opnieuw zouden DCs die het nanobody stabiel tot expressie brengen, hier een oplossing kunnen zijn.

4.4 Besluit

In deze masterproef hebben we met nanobodies aangetoond dat actinebundeling door fascine en het SH3 domein van cortactine van belang zijn in zowel filopodia als podosomen van DCs, cellulaire structuren die gebruikt worden voor directionele migratie. Dit geeft ons meer inzicht in de dynamiek van DCs, een dynamiek die essentieel is voor hun immuunregulerende functie. Bovendien geeft dit aan dat toekomstige fascine- en cortactine-inhibitoren als kankertherapie tumorspecifiek moeten zijn, gezien de potentiële nadelige effecten op het immuunsysteem. Ten slotte is deze masterproef een mooi voorbeeld van hoe nanobodies biologische processen kunnen moduleren.

Addendum

Alvorens Neon[®] transfectie werd gebruikt, probeerden we lentivirale transductie, JetPRIME[®] en JetPEI[®] transfectie (beide afkomstig van Polyplus transfection, Illkirch, Frankrijk). Deze methoden resulteerden niet in nanobody-expresserende cellen.

A. Lentivirale transductie

A.1 Lentivirus productie

De dag voor transfectie werden 6 miljoen HEK 293T cellen uitgezaaid in 15 ml DMEM medium (Gibco) gesupplementeerd met 10% FBS, 100 µg/ml streptomycine en 100 IU/ml penicilline. De cellen werden getransfecteerd via de CaPO₄ methode met een DNA transfectiemix die 24 µg transfer plasmide (pLVX-Tight-Puro met nanobody-EGFP), 18 µg packaging plasmide (psPAX2) en 7.2 µg enveloppe plasmide (pMD2.G) bevatte. Na overnacht incubatie werden de cellen gewassen met PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺) en werd het medium ververs. Het virale supernatans werd geogst 48 en 72 uur na transfectie en gecentrifugeerd (3', 1900×g) om celdebris te verwijderen. Het supernatans werd over een 0.22 µm polyethersulfon membraan gebracht en de virale suspensie werd geconcentreerd door 2 uur en 10 minuten centrifugatie (90.000×g, 4°C).

A.2 Virale titerbepaling

In een 6-well plaat werden 200.000 HEK 293T cellen per well uitgezaaid in DMEM met 10% FBS, 100 µg/ml streptomycine en 100 IU/ml penicilline. De volgende dag werden de cellen getransduceerd met 1 ml virusoplossing, die deel uitmaakt van een 10-voudige verdunningsreeks van de virusstock. De geïnfecteerde platen werden 90 minuten gecentrifugeerd (1900×g, kamertemperatuur) en vervolgens geïncubeerd bij 37°C en 10% CO₂. De eerste en derde dag na transductie werden de cellen gewassen met PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺) en werd elke well voorzien van vers medium met puromycine (1 µg/ml) of G418 (400 µg/ml), respectievelijk de selectiemerker van de pLVX-Tight-Puro vector en de regulator. Een week na transductie werden de cellen gewassen met PBS (-Ca²⁺/Mg²⁺), gekleurd met een kristalvioletooplossing en werden de plaques geteld om de virale titer te bepalen.

A.3 Transductie

Zowel PBMCs (voorzien van 20 ng/ml IL-4 en 50 ng/ml GM-CSF) als gedifferentieerde DCs werden blootgesteld aan de geproduceerde lentivirussen met een MOI van 5, 10 of 20 (voor zowel pLVX-Tight-Puro-nanobody construct als voor de regulator) en 4 µg polybreen. Er werd 90 minuten gecentrifugeerd (1900×g, kamertemperatuur) om de transductie-efficiëntie te verhogen. De blootstellingsduur aan de lentivirussen varieerde in de verschillende condities van een volledige week tot enkele uren (om celdood te verminderen). Om het getransduceerde nanobody tot expressie te brengen werd doxycycline (500 ng/ml, Clontech, Mountain View, CA, VS) toegevoegd. Echter, geen enkele conditie leidde tot getransduceerde cellen.

B. JetPRIME[®] (Polyplus transfection) transfectie

750 ng DNA werd opgelost in 75 µl JetPRIME[®] buffer, waarna vervolgens 1.5 µl JetPRIME[®] reagens werd toegevoegd. Vortexen verhoogt de transfectie-efficiëntie. Na spin-down werd het mengsel 10 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur en vervolgens druppelend op de cellen gebracht. Er werd 5 minuten gecentrifugeerd (300×g, kamertemperatuur). Na 4 uur werd het celmedium ververs.

C. JetPEI[®] (Polyplus transfection) transfectie

4 µl JetPEI[®] reagens werd opgelost in 50 µl JetPEI[®] buffer en toegevoegd aan 1 µg DNA opgelost in 50 µl JetPEI[®] buffer. Na vortexen en spin down werd het transfectiemengsel 15-30 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur en druppelend op de cellen gebracht. Er werd 5 minuten gecentrifugeerd (300×g, kamertemperatuur). Na 4 uur werd het celmedium ververs.

