



Samenvatting van het proefschrift

M.E. Joosse

"A Dynamic Balance: Regulatory and inflammatory T-cell response"

Promotiedatum: 06 november 2019

Universiteit: Erasmus MC

Promotores:

Prof. Dr. J.C. Escher

Copromotores:

Prof. dr. R.W. Hendriks

Prof. dr. F. Koning

Dr. E. Lubberts

Het slijmvlies (mucosa) van ons maag-darm kanaal wordt continu blootgesteld aan grote hoeveelheden lichaamsvreemde eiwitten uit voedsel en van onschadelijke darmbacteriën. Om infecties met schadelijke indringers tegen te gaan, bevat de darm een groot aantal afweercellen (immuuncellen) die ziekteverwekkers signaleren en vernietigen. Het afweersysteem (immuunsysteem) van de darm moet er voor zorgen dat het schadelijke darmbacteriën aanvalt, maar de onschadelijke darmbacteriën (commensalen) met rust laat. Om dit te bewerkstelligen, bestaat het immuunsysteem van de darm uit zowel ontstekingsbevorderende (inflammatoire) als ontstekingsremmende (regulerende) immuuncellen. In een gezonde darm is er een balans tussen regulerende en inflammatoire immuuncellen. Deze balans wordt homeostase genoemd.

Het immuunsysteem in de darm Het immuunsysteem in de darm bestaat uit cellen van het aangeboren en het verworven immuunsysteem. Het darmweefsel onder het darmepitheel (laag van dicht aaneengesloten cellen) bevat antigeen-presenterende cellen (APC), waaronder dendritische cellen (DC) en macrofagen. Deze cellen van het aangeboren afweersysteem nemen lichaamsvreemde eiwitten (antigenen) op en verzorgen daarmee de eerstelijns afweer. De darm bevat ook een groot aantal immuuncellen van het verworven immuunsysteem, waaronder T-cellen. Deze cellen dragen een receptor die 'op maat' gemaakt kan worden voor het herkennen van

antigenen en hebben een geheugen waardoor ze bij een tweede ontmoeting met hetzelfde antigeen snel kunnen reageren. Anatomisch gezien wordt het immuunsysteem in de darm onderverdeeld in inductie en effector plaatsen. De darm-geassocieerde lymfoïde weefsels en de lokale darm drainerende lymfeklieren zijn de inductie plaatsen, waar naïeve (niet eerder aan antigeen blootgestelde) T-cellen worden geactiveerd door APC. Het darmweefsel en darmepitheel zijn de effector plaatsen waar antigeen-specifieke effector T-cellen hun acties uitvoeren. APC nemen antigenen op en presenteren deze op hun MHC moleculen op het celmembraan. Vervolgens reizen ze naar de lymfeklieren om daar naïeve T-cellen te activeren. Naïeve T-cellen uit perifere bloed reizen ook naar de lymfeklieren met behulp van specifieke migratiereceptoren. Activatie van T-cellen

wordt in gang gezet wanneer een naïeve T-cel een APC tegenkomt die het juiste antigeen-MHC-complex tot expressie brengt. Als een sleutel in een slot zorgt de binding van antigeen-MHC-complex aan de T-cel receptor dat de naïeve T-cel actief wordt, deelt en differentieert waardoor er een groot aantal antigeen-specifieke effector en geheugen T-cellen ontstaan. Dit proces is afhankelijk van drie signalen: de verbinding van het antigeen-MHC complex van de APC met de T-cel receptor (signaal 1), co-stimulatorische moleculen aanwezig op de APC (signaal 2) en cytokines (kleine, oplosbare eiwitten) die door de APC worden uitgescheiden (signaal 3). Deze signalen zorgen ook voor het tot expressie komen van migratiereceptoren die T-cellen specifiek naar de effector plaatsen van de darm leiden. Dus, na herkenning van antigeen in darm-geassocieerde lymfoïde weefsels en lokale darm drainerende lymfeklieren, verlaten T-cellen de lymfoïde weefsels om zich naar de darm te begeven, waar ze verblijven als lang levende antigeen-specifieke effector en geheugen T-cellen.

CD4+ T-cellen in de darm

Wanneer een naïeve T-cel een APC tegenkomt met het juiste antigeen-MHC-complex kan dit leiden tot differentiatie van zowel inflammatoire (ontstekingsbevorderende) als regulerende (ontstekingsremmende) T-cellen. In de darm zijn veel factoren aanwezig die APC leren tolerant te zijn tegen onschuldige antigenen, en dus preferentieel de ontwikkeling van regulerende T-cellen te stimuleren. Als gevolg hiervan leidt herkenning van een onschadelijk antigeen tot een gebalanceerde immunoreactie, waarbij regulerende T-cellen in balans zijn met inflammatoire T-cellen.

Regulerende (ontstekingsremmende) T-cellen

Regulerende T-cellen worden gekenmerkt door eigenschap dat zij in staat zijn ongewenste reacties van andere immuuncellen te onderdrukken. Regulerende T-cellen in de darm worden onderverdeeld in CD4+Foxp3+ regulerende T-cellen (Tregs) en IL-10-producerende CD4+Foxp3neg T-cellen. Tregs en IL-

10-producerende CD4+Foxp3neg T-cellen oefenen hun regulerende functies uit in verschillende delen van de darm. Tregs zijn in grote getalen aanwezig in de dikke darm (colon), terwijl IL-10-producerende CD4+Foxp3neg T-cellen een prominente rol spelen in de dunne darm. Beide regulerende T-cel populaties gebruiken meerdere mechanismen om inflammatoire immunoreacties te onderdrukken, waarvan

interleukine 10 (IL-10)-productie het meest onderzocht is. Dit cytokine is van essentieel belang is om ontsteking in de darm te voorkomen.

Inflammatoire (ontstekingsbevorderende) T-cellen Naast regulerende T-cellen bevat het darmweefsel diverse groepen van inflammatoire T-cellen. Er zijn verschillende groepen van inflammatoire T-cellen, aangeduid als T-helper (Th)-cellen, waaronder Th1, Th2 en Th17 cellen. Deze T-cel populaties kunnen worden onderscheiden op basis van hun cytokine profiel en hebben elk een andere functie. Hoewel inflammatoire T-cellen van essentieel belang zijn voor de eliminatie van invasieve pathogene bacteriën, wordt chronische darmontsteking, zoals gezien wordt in patiënten met inflammatoire darmziekten (IBD), vaak gekenmerkt door uitgebreide infiltratie van het darmweefsel met inflammatoire T-cel populaties.

Inflammatoire darmziekten (IBD)

Door fouten in tolerantie voor onschadelijke bacteriën kan chronische darmontsteking ontstaan, in het Engels "inflammatory bowel disease (IBD)" genoemd. De twee bekendste chronische darmontstekingen zijn colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn (ZvC). IBD verschilt van patiënt tot patiënt en zit soms overal en soms alleen op een plek. De precieze oorzaak van IBD is onbekend, maar drie factoren spelen een oorzakelijke rol. Deze factoren zijn genetische belasting (gevoeligheids genen), darmbacteriën en het immuunsysteem van de darm. Er wordt gedacht dat IBD wordt veroorzaakt door een ontregelde immunoreactie op antigenen van onschuldige darmbacteriën in een genetisch-gevoelig persoon. Over de afgelopen decennia is er steeds meer bewijs gekomen dat ontregeling van het immuunsysteem betrokken is bij de ontwikkeling van IBD. Ten eerste, uit genetische analyses van grote groepen IBD patiënten zijn ongeveer 160 gen gebieden (waarin zich meerdere genen bevinden) gevonden die een genetische aanleg voor IBD zouden kunnen veroorzaken. Van deze gen gebieden is een groot deel betrokken bij immunoreacties van het aangeboren en verworven immuunsysteem. Ten tweede, genetische deficiëntie van bepaalde immunogenen zijn geassocieerd met IBD-achtige darmontsteking. Deze mono-genetische ziekten (veroorzaakt door één gen) hebben laten zien dat zowel een tekort aan aangeboren immunoreacties als een tekort aan regulerende immunoreacties kan leiden tot chronische ontsteking van

de darm. Tot slot, de darmontsteking kan in een groot deel van de IBD patiënten met succes worden behandeld met afweerremmende medicijnen. Dit suggereert dat metingen van ontregelde immuunreacties in de toekomst misschien kunnen helpen om IBD niet meer alleen onder te verdelen in colitis ulcerosa en ZvC maar in 'afweersfouten' waarop een therapie is af te stemmen.

Dit proefschrift

Dit proefschrift richt zich op het classificeren van kinderen met IBD op basis van de onderliggende afweersfout om zo het ziektebeloop en reactie op behandeling beter te voorspellen. Zoals beschreven in Hoofdstuk 1 spelen T-cellen een belangrijke rol in het ontstaan van chronische darmontsteking. De darmontsteking in IBD wordt gekenmerkt door infiltratie van T-cellen die grote hoeveelheden inflammatoire cytokines uitscheiden. Remmende receptoren op het celmembraan van deze T-cellen dienen als "checkpoints" die activatie via de T-cel receptor (signaal 1) en co-stimulatoire moleculen (signaal 2) dempen. In Hoofdstuk 2 bespreken we de nieuwe inzichten in de rol van deze remmende receptoren in darm homeostase. Ons review beschrijft de verschillende remmende receptoren die door zowel CD4+Foxp3+ Tregs als IL-10-producerende CD4+Foxp3neg T-cellen tot expressie worden gebracht, en hun rol in darm homeostase.

Het meten van de ontregelde balans tussen regulerende en inflammatoire T-cellen in IBD patiënten zou kunnen helpen om patiënten te classificeren en hun ziektebeloop te voorspellen. In Hoofdstuk 3 onderzochten we of we veranderingen in regulerende en inflammatoire T-cellen in het bloed van IBD patiënten konden detecteren. Om dit te onderzoeken hebben we onze analyses gericht op circulerende CD38+ effector T-cellen, een T-cel populatie waarvan we eerder hebben aangetoond dat deze sterk verrijkt is aan T-cellen die naar de darm toe migreren. We laten zien dat gezonde individuen en IBD patiënten deze circulerende CD38+ effector T-cellen hebben en dat deze cellen zowel regulerende als inflammatoire cel populaties bevatten. Bij gezonde individuen, die gebalanceerde immuunreacties in de darm hebben, hadden CD38+ effector T-cellen bij voorkeur een regulatorisch fenotype met lage frequenties van geactiveerde CD25+CD45RA^{neg} en hoge frequenties van T-cellen met de remmende receptor T-cel Ig en ITIM-domein (TIGIT) op hun oppervlak. Bij een deel van de IBD patiënten was de balans tussen regulerende en inflammatoire T-cellen verschoven richting inflammatie. In vergelijking met gezonde

controles, hadden IBD patiënten met actieve darmziekte (voor aanvang van therapie) verhoogde frequenties van CD25+CD45RA^{neg} T-cellen en verlaagde frequenties van TIGIT+ T-cellen. Er werden geen verschillen in de frequenties van Foxp3+ Tregs in CD38+ effector T-cellen gezien tussen IBD patiënten en

gezonde controles. Het percentage van TIGIT+ cellen in CD38+ effector T-cellen kon patiënten met korte duur van klinische ziekteremissie na start van therapie identificeren. Om precies te zijn, TIGIT-percentages lager dan 25% vóór behandeling waren geassocieerd met kortere duur van klinische ziekteremissie. Onze resultaten tonen aan dat fenotypische karakterisering van circulerende CD4+ T-celpopulaties in het bloed van IBD patiënten klinisch-relevante subgroepen kan onderscheiden. In het bijzonder, analyse van meerdere remmende receptoren, waaronder TIGIT, op CD38+ effector T-cellen zou kunnen helpen om IBD patiëntstratificatie voorafgaand aan behandeling verder te optimaliseren.

Omdat een subgroep van IBD patiënten verlaagde TIGIT+-cel frequenties hadden, wilden we factoren identificeren die betrokken zijn bij de inductie van TIGIT-expressie op het celmembraan van CD4+ T-cellen. In Hoofdstuk 4, door zowel humaan als muis materiaal te gebruiken, analyseerden we TIGIT expressie op verschillende CD4+ T-cel populaties en bepaalden we de signalen die noodzakelijk zijn voor TIGIT expressie op het celmembraan. We laten zien dat activatie via de T-cel receptor middels anti-CD3 TIGIT expressie induceert op antigeen-specifieke effector T-cellen. Omdat een subgroep van IBD patiënten verlaagde TIGIT+-cel frequenties hadden, veronderstelde we dat TIGIT expressie op T-cellen betrokken kan zijn bij het reguleren van immuunreacties tegen darmbacteriën. Het koloniseren van kiemvrije muizen (muizen zonder darmbacteriën) met specifieke pathogeen-vrije (SPF) darmbacteriën resulteerde in een twee- tot drievoudige toename van TIGIT expressie in darmweefsel. Omdat een groot deel van de T-cellen in de darm verondersteld wordt een specificiteit voor bacteriële antigenen heeft, onderzochten we of TIGIT tot expressie werd gebracht door T-cellen die specifiek bacteriële antigenen herkenden. Hoewel de meerderheid van de bacterieel antigeen-reactieve T-cellen geen TIGIT tot expressie brachten, kwam TIGIT tot expressie op circa 7%-10% van de bacterieel antigeen-reactieve T-cellen. Bacterieel antigeen-reactieve TIGIT+CD4+ T-cellen bevatten hogere frequenties van IL-10+ cellen in vergelijking met bacterieel antigeen-reactieve TIGITnegCD4+ cellen. Dit impliceert dat TIGIT+CD4+ T-cellen betrokken kunnen zijn bij het reguleren van immuunreacties tegen darmbacteriën.

In zowel Hoofdstuk 3 als Hoofdstuk 4 zagen we een sterke associatie tussen TIGIT en CD38. CD38 is een ectoenzym dat betrokken is bij de synthese van twee signaleringsmoleculen die noodzakelijk zijn voor intracellulaire Ca²⁺ mobilisatie. Met behulp van de calcineurine-remmer tacrolimus en calcium ionophore ionomycine (dat de intracellulaire Ca²⁺ concentratie verhoogd) laten we zien dat calcium-afhankelijke signalering na T-cel receptor activatie vereist was om TIGIT expressie op T-cellen te induceren. Toekomstige

experimenten zijn nodig om vast te stellen of CD38 bijdraagt aan TIGIT-inductie op T-cellen door de intracellulaire Ca²⁺ concentratie te verhogen.

Een subgroep van patiënten met de ZvC heeft verhoogde antistofresponsen tegen bacterieel flagelline, een eiwit dat tot expressie wordt gebracht door zowel onschuldige als pathogene bacteriën. Deze antistoffen zijn geassocieerd met een verhoogd risico op agressieve en gecompliceerde ziekte. Antistofresponsen zijn vaak afhankelijk van de activatie van T-cellen. Daarom veronderstelden we dat patiënten met de ZvC met verhoogde anti-flagelline antistof-titers ook verhoogde frequentie van flagelline-reactieve T-cellen zouden hebben (Hoofdstuk 5). Ook hebben we getest of deze flagelline-reactieve T-cellen een meer inflammatoir fenotype hadden vergeleken met flagelline-reactieve cellen van gezonde personen en ZvC-patiënten met lage titer aan anti-flagelline antistoffen. Onze analyses tonen aan dat ZvC-patiënten met een hoge anti-flagelline IgG-titers verhoogde frequenties van flagelline-reactieve T-cellen in perifere bloed hadden vergeleken met gezonde controles. Zowel bij gezonde als zieke personen hadden flagelline-reactieve T-cellen regulatoire en inflammatoire kenmerken en konden $\alpha 4\beta 7$ en CD38 tot expressie brengen. ZvC-patiënten met een verhoogde anti-flagelline IgG-titers en reactiviteit op 8/8 flagellines hadden verminderde frequenties van IL-10⁺ en TIGIT⁺ flagelline-reactieve T-cellen in vergelijking met gezonde controles en ZvC-patiënten met lage anti-flagelline IgG-titers. In overeenstemming met eerdere bevindingen, leken TIGIT en IL-10 expressie positief gecorreleerd aan elkaar. TIGIT⁺ flagelline-reactieve T-cellen waren namelijk verrijkt in IL-10-producerende cellen in vergelijking met TIGIT^{neg}CD4⁺ T-cellen.

In Hoofdstuk 6 hebben we T-cellen uit perifere bloed en darmweefsel bestudeerd afkomstig van een patiënt met een genetische duplicatie van de IL2RA locus, die op zeer jonge leeftijd IBD ontwikkelde. Dit stelde ons in staat de kenmerken van darmontsteking in de context van een hyper-inflammatoir T-celdefect te onderzoeken. De patiënt ontwikkelde op 2-jarige leeftijd een colitis ulcerosa-achtige colitis, waarbij een ernstige pancolitis met oedemateus slijmvlies en meerdere erosies werd gezien bij endoscopie.

Histologie van aangedane darmbiopten toonde hyper-proliferatieve T-cellen in het lamina propria en darmepitheel en vele interferon-gamma (IFN γ)⁺ en pSTAT5⁺ laesies. De darmontsteking was ongevoelig voor standaard immunosuppressieve en immunomodulerende medicijnen en biologicals. De patiënt moest een subtotale colectomie ondergaan, wat ervoor heeft gezorgd dat de patiënt blijvend in klinische remissie is zonder dat hiervoor nog onderhoudstherapie nodig is. Er zijn meldingen geweest van patiënten met vergelijkbare genduplicaties bij wie geen darm-gerelateerde klachten werden beschreven. Deze observaties suggereren dat het hyper-proliferatieve T-

celfenotype dat we observeerden in de context van IL2RA duplicatie niet voldoende kan zijn om darmontsteking te veroorzaken. In plaats daarvan kan het zijn dat een omgevingsfactor, zoals een specifiek bacterieel antigeen, chronische ontsteking heeft geïnitieerd in de darm van deze specifieke patiënt. Dus, ondanks dat defecten die algemene T-celhyperproliferatie veroorzaken bijdragen aan de gevoeligheid om IBD te ontwikkelen, is er een extra "trigger" nodig om expansie van inflammatoire T-cellen die in de antigeenrijke darmomgeving zijn geactiveerd te veroorzaken.

Het ziekteverloop van IBD kan worden gecompliceerd door lokale (bijvoorbeeld kanker, Hoofdstuk 7 en Hoofdstuk 8) en extra-intestinale complicaties (bijvoorbeeld scleroserende cholangitis, een ernstige leveraandoening die leidt tot destructie van galgallen, Hoofdstuk 9) die het ziekteverloop negatief beïnvloeden. Gezien het feit dat deze complicaties niet frequent voorkomen, is meer gedetailleerde informatie over IBD patiënten die op jonge leeftijd die kanker of scleroserende cholangitis (SC) ontwikkelen nodig om meer inzicht te krijgen in voorspellende factoren van deze ernstige uitkomsten. In Hoofdstuk 7 geven we een literatuuroverzicht van patiënten die op kinderleeftijd IBD ontwikkelden en later in het leven kanker kregen of een fatale afloop hadden. In Hoofdstuk 8 rapporteren we het grootste aantal kinder IBD patiënten met kanker en/of een fatale afloop tot nu toe. Kanker en infecties waren de belangrijkste oorzaken van mortaliteit. Ondanks dat vaak wordt verondersteld dat SC bij kinderen een mildere ziektebeloop heeft dan bij volwassenen, lieten onze data zien dat SC een significante risicofactor was voor kanker-geassocieerde mortaliteit. In Hoofdstuk 9 evalueerden we de tijd-tot-complicatiecurven in twee onafhankelijke cohorten uit hetzelfde geografische gebied om het ziektebeloop op de lange termijn te vergelijken tussen SC-patiënten op de kinderleeftijd en op de volwassen leeftijd. Onze gegevens tonen aan tijd tot transplantatie en SC-gerelateerde sterfte niet verschilt tussen patiënten die SC op de kinderleeftijd

ontwikkelden versus patiënten die SC op volwassen leeftijd kregen. Onze resultaten benadrukken het belang van de nauwkeurige follow-up van jonge patiënten met zeldzame ziekten, waarvan het ziektebeloop vaak niet goed in kaart wordt gebracht door de overgang naar volwassen-gerichte zorg.

De resultaten van dit proefschrift worden in Hoofdstuk 10 in perspectief geplaatst. Wanneer alle data uit dit proefschrift wordt gecombineerd, is een terugkerende observatie dat, in vergelijking met gezonde individuen, IBD patiënten een ontregelde balans hebben tussen regulerende en inflammatoire T-cellen. We leveren bewijs aan voor zowel verminderde regulerende T-cel kenmerken (Hoofdstuk 3 en 5) als voor verhoogde inflammatoire T-cel kenmerken (Hoofdstuk 3 en 6). We tonen aan dat expressie van remmende receptoren op T-cellen IBD patiënten stratificatie mogelijk maakt voorafgaand

aan de behandeling. Met deze bevindingen hebben we een basis gelegd voor de detectie van immuun-disfunctie in patiënten met IBD. De belangrijkste uitdaging voor toekomstig onderzoek is om IBD patiënten te classificeren op basis van immuun-disfunctie, met als doel subgroepen van IBD patiënten te identificeren die het meest gebaat zijn bij gerichte therapieën. Bovendien kan het ontdekken van de overeenkomsten in ziekte-veroorzakende mechanismen tussen IBD en andere immuun-gemedieerde inflammatoire ziekten (IMID's) subgroepen van patiënten identificeren in verschillende IMID's die baat kunnen hebben bij dezelfde gerichte behandeling.