

University of Groningen

Characterization of allergen-specific T cell subsets in allergy

Van Hemelen, Dries

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Van Hemelen, D. (2016). *Characterization of allergen-specific T cell subsets in allergy: With a goal for improvement of allergen-specific immunotherapy*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

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

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

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

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

Chapter 10

Allergische ziekten van de luchtwegen, zoals hooikoorts (allergische rhinoconjunctivitis) en allergisch astma zijn chronische ontstekingsziekten met klachten zoals tranende ogen, niezen en benauwdheid, die worden veroorzaakt door het inademen van een allergeen, zoals bijvoorbeeld huisstofmijt.

Niet iedereen wordt allergisch, maar bij mensen die dat wel worden ontstaan bij de eerste blootstelling aan het allergeen CD4⁺ T helper 2 cellen, we noemen dit de T_H2 cel respons. Ook worden specifieke immuuglobuline E (IgE)-antilichamen gevormd die zich binden aan mestcellen en basofiele granulocyten met behulp van een receptor (de FCεRI receptor). Als iemand vervolgens opnieuw in aanraking komt met het allergeen leidt dit tot cross-linking van het celoppervlak gebonden IgE (IgE-FCεRI) en degranulatie van mestcellen en basofielen. Er komen dan stoffen vrij (mediatoren), zoals histamine, prostaglandine D₂ en leukotriënen, die een binnen minuten tot uren een acute allergische reactie veroorzaken, bijvoorbeeld een astma aanval. Bij een langdurige blootstelling (bv. een geheel pollenseizoen) ontstaat een chronische ontsteking van de luchtwegen. Hierin staat de allergeen-specifieke T_H2 cel centraal door het aanmaken van interleukine-4 (IL-4), IL-5, IL-9 en IL-13. Deze cytokines zijn betrokken bij IgE-aanmaak door B-cellen, de eosinofiele ontsteking, de verhoogde mucus productie en de luchtweg hyperreactiviteit.

Meestal is de behandeling gericht op het onderdrukken van de symptomen, zoals bijvoorbeeld met antihistaminica of corticosteroiden. Deze medicatie moet dagelijks worden gebruikt, jaren achter elkaar. Gezien het hoge ongemak voor patiënten, de wereldwijd stijgende prevalentie en het gebrek aan reële preventieve mogelijkheden is een efficiënte therapie die de ongewenste immunoreactie permanent wijzigt van essentieel belang. Allergeen specifieke Immunotherapie (SIT) is op dit moment de enige therapie die een blijvende, of ten minste een lang blijvende reductie van de klachten veroorzaakt. Deze behandeling is ruim een eeuw geleden voor het eerst toegepast voor de behandeling van hooikoorts. Hoewel de werkzaamheid van SIT in verscheidene klinische studies is aangetoond, werkt SIT voor bepaalde allergische aandoeningen goed, maar voor andere minder of zelfs helemaal niet. Bijkomend moet men om de gewenste langdurende reductie in klachten te verkrijgen, 3-5 jaar met maandelijks injecties behandeld worden. Hierdoor is een verbetering van deze behandelingsmethode uiterst noodzakelijk.

Om een therapie als SIT te verbeteren, moeten we de onderliggende mechanismen in detail begrijpen. Zowel bij het ontstaan van allergieën, als bij de behandeling daarvan spelen T cellen een cruciale rol, omwille van het geheugen effect dat deze T-cellen kunnen uitoefenen. Dit geheugen effect is voor de gewenste blijvende reductie van de symptomen van cruciaal belang. Het effect van SIT op T cellen is in enkele studies bekeken, maar dit soort studies zijn erg moeilijk door het lage aantal allergeen-

specifieke T cellen in de totale T cel populatie (ongeveer 1 op de 1 000 000 T- cellen). Voor een adequate bestudering van het effect van SIT moeten specifiek gekeken worden naar deze allergeen-specifieke T-cellen. Hiervoor is een zeer nauwkeurige selectie vereist. In dit proefschrift hebben we eerst de focus gelegd op het optimaliseren van deze selectieprocedure, om nadien deze kennis verder toe te passen om de effecten van SIT op allergeen-specifieke T cellen te bestuderen in klinische studies met graspollen, bijvoetpollen, en wespengif als allergenen.

Om allergeen-specifieke T-cellen te bestuderen, werd de hele populatie T cellen 8 dagen gekweekt in combinatie met een specifiek allergeen om zo een uitgroei van de allergeen specifieke T-cellen te induceren. Het nadeel van deze methode is dat door de lange duur van deze kweken de te bestuderen cellen kunnen veranderen. Daarom besloten we in **hoofdstuk 2** dit soort T cel kweken gedetailleerd te bestuderen om te kijken of we deze methode konden verbeteren. We hebben getest of we al allergeen specifieke T cellen al konden terugvinden tijdens hun eerste reactie op allergeen zonder ze te laten uitgroeien in het laboratorium om zo te voorkomen dat deze cellen veranderen tijdens een 8 dagen kweek. Deze resultaten werden vergeleken met de langdurige kweken. Er wordt hierbij gebruik gemaakt van een bepaalde kleurstof (CFSE) die ons in staat stelde die T cellen te identificeren die op de blootstelling aan het allergeen gingen reageren. Met deze opzet hebben we kunnen aantonen dat met beide methoden de allergeen specifieke T cellen gedetecteerd kunnen worden, en ook de geselecteerde T cellen in beide methoden, eenzelfde profiel hadden. Blijkbaar veranderen de allergeen specifieke T cellen toch niet heel sterk tijdens de 8 daagse kweken. Omdat deze 8 daagse kweken gevoeliger waren om een verschil te detecteren tussen allergische en niet-allergische individuen hebben we geconcludeerd dat dit de beste methode is voor deze analyses.

In hoofdstuk 3 hebben we deze methode verder geoptimaliseerd, door deze allergeen-specifieke T cellen specifiek aan te tonen met zogenaamde MHC-II peptide tetrameer complexen. Met deze complexen bootsen we in het laboratorium de natuurlijke weg van allergeen herkenning door T cellen na. MHC-II peptide tetrameer complexen bevatten namelijk het stukje van het allergeen waarop de T cellen reageren. Deze complexen zullen dus alleen aan de T cellen binden die specifiek zijn voor het allergeen dat we willen bestuderen. Voor deze studie hebben we het bijvoet-pollen allergeen model gebruikt, omdat T cellen die specifiek het bijvoet allergeen herkennen slechts op 1 klein stukje peptide van het allergeen reageren. Dat maakt dit model uitermate geschikt om de specificiteit en de sensitiviteit van deze tetrameer-complexen voor het aantonen van allergeen-specifieke T cellen te testen. Hoewel het mogelijk was om heel nauwkeurig allergeen-specifieke T cellen te selecteren, bleef de sensitiviteit relatief laag. Hierdoor zal een deel van de T cellen die wel allergeen-specifiek zijn niet

gedetecteerd worden. Omwille van de problemen met sensitiviteit van de tetrameren, en omdat de 8 daagse kweken met CFSE de grootste kracht had om verschillen tussen allergische en niet allergische personen te detecteren, werd besloten om de T cellen van onze verdere studies met deze 8 daagse CFSE kweken te vergelijken.

Tenslotte hebben we nog het opslaan en analyseren van T cellen tijdens een klinische studie geoptimaliseerd. Om het verloop van de behandeling te kunnen volgen tijdens klinische studies, wordt op verschillende tijdstippen tijdens de behandeling bij de patiënt bloed afgenomen. De cellen uit het bloed worden opgeslagen, zodat op een later moment de T cellen die zijn afgenomen op verschillende tijdstippen van de studie in één keer te kunnen analyseren. Omdat we met name geïnteresseerd waren in T cellen met regulerende eigenschappen, bestudeerden we in **Hoofdstuk 4** het effect van het invriezen op deze T cellen met regulerende eigenschappen. Wij hebben een methode geoptimaliseerd die ervoor zorgde dat het invriezen geen effect had op de aantallen van deze zogenaamde regulerende T cellen.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we het gebruik van de 8-daagse kweken met CFSE voor de detectie van T cellen specifiek voor een wespengif extract. Deze kweken worden gehinderd doordat wespengif toxisch is voor T cellen, waardoor deze tijdens de 8 daagse kweek sterven. Om deze toxische eigenschappen uit het wespengif te verwijderen werkten we met dialyse en hitte inactivatie van het wespengif, waarna de T cellen in leven bleven in aanwezigheid van wespengif extract, terwijl de allergenen nog wel aanwezig waren. Hierbij toonden we aan dat in de wespengif specifieke T cel populatie meer IL-4 producerende T cellen aanwezig waren in wespengif allergische patiënten in vergelijking met niet-allergische individuen. Deze observatie toont aan dat ook in Wespengif allergie een rol is voor allergeen-specifieke Th2 cellen. Wat aantoont dat deze cellen ook in wespengif-allergie een belangrijke rol spelen. Vervolgens hebben we het behandelde wespengif extract gebruikt om verschillen te bestuderen bij wespengif allergische patiënten met en zonder mastocytose. Mastocytose is aandoening waarbij er een goedaardige woekering van mestcellen is die de patiënt erg gevoelig maakt voor sterke allergische reacties, vooral op insecten. Insectenallergie is een goed te behandelen aandoening die meestal te genezen is met immunotherapie met insecten gif (venom immunotherapie, VIT), maar bij mensen met een onderliggende mastocytose werkt VIT niet of veel minder goed. Om het effect van VIT te kunnen vergelijken hebben we de wespengif-specifieke T cellen bestudeerd bij insecten allergische patiënten zonder en met onderliggende mastocytose voorafgaande aan en tijdens de behandeling van de wespengifallergie met VIT . Aangezien de wespengif-specifieke T cellen een belangrijke rol spelen in het geheugen effect van ons immuunsysteem, vroegen we ons af of er verschillen in de T cel respons te detecteren waren tijdens de VIT behandeling van wespengif allergische patiënten met en zonder mastocytose. Met behulp van

onze 8-daagse kweken, zagen we een duidelijk verschil tussen de T cellen van de 2 patiëntengroepen. In de wespengif allergische patiëntengroep zonder mastocytose, zagen we een reductie van het aantal T cellen die IL-4 en IL-9 produceerden (de allergie-veroorzakende Th2-cellen), terwijl geen reductie van deze allergie-veroorzakende Th2 cellen te vinden was in de wespengif allergische patiëntengroep met Mastocytose, wat de verminderde efficiëntie van VIT bij mastocytose patiënten kan verklaren.

Naast de rol van T cellen in bijvoet en wespengif allergie hebben we ook naar graspollen allergie gekeken, als onderdeel van de VITAL studie. In **hoofdstuk 6** hebben we de klinische resultaten van de VITAL-studie beschreven. De VITAL-studie is een geblindeerde, placebo gecontroleerde klinische studie, waarin graspollen allergische patiënten werden behandeld met een subcutane vorm van graspollen immunotherapie (allergoid SCIT, Purethal Gras, HAL-allergy), of met een controle (placebo) behandeling, een behandeling zonder het graspollen allergeen. In een derde behandelingsgroep werd een extra stofje (Vitamine D3) aan de bestaande behandeling toegevoegd. Eerder was aangetoond dat vitamine D3, bekend om zijn vermogen regulerende T cellen te induceren, een versterkend effect heeft op de werkzaamheid van SIT in een muismodel voor allergisch astma. Om deze reden werd vitamine D als potentiële kandidaat om het effect van SIT te verbeteren bestudeerd in deze klinische studie. De resultaten van onze klinische studie gaven helaas weer dat na een jaar behandeling er geen verbetering van de allergische klachten werd waargenomen, vergeleken met de controlegroep. Aangezien hier dus de standaard behandeling met allergeen al geen effect liet zien, kunnen we uit deze studie geen verdere conclusie trekken over het gebruik van Vitamine D3 om de bestaande behandeling te verbeteren. Ondanks het uitblijven van het klinische effect, zagen we in beide behandelde groepen wel een stijging van GP-specifieke antilichamen (IgG4, en IgE) zoals vaker geobserveerd na SIT, wat wil zeggen dat wel degelijk een immuunrespons tegen deze allergenen gestart is.

In **Hoofdstuk 7** ten slotte tonen we de resultaten van de graspollen-specifieke T cellen van de patiënten behandeld in de VITAL studie. Hoewel geen klinisch effect van de behandeling te detecteren was, zagen we in de groep die het graspollen allergeen met Vitamine D3 had gekregen wel een toename van allergeen-specifieke IL-10 producerende en FOXP3 positieve regulerende T cellen. Dit wil zeggen dat, hoewel er geen verbetering van de SIT behandeling kon worden vastgesteld, deze studie wel een effect aantoont van het Vitamine D3 op de inductie van regulerende T cellen aan. Hierdoor kunnen we concluderen dat deze studie aanwijzingen biedt voor een mogelijk positief effect van Vitamine D3 op de allergeen-specifieke immunotherapie behandeling. In een nieuwe studie zou dit verder onderzocht moeten worden.

Samenvattend, kunnen we stellen dat dit onderzoek heeft geleid tot een duidelijk overzicht van alle voor- en nadelen over de verschillende technieken om allergeen,

en breder ook antigeen- specifieke T cellen te bestuderen. Dit hebben we vervolgens toegepast in klinische studies, wat heeft geleid tot een mogelijke verklaring voor de verminderde effectiviteit van VIT in patiënten met mastocytose, wat gepaard gaat met het uitblijven van een afname in de allergie-veroorzakende T-cellen. In de klinische studie naar de adjuvans werking van VitD3 voor SIT leidt de toegenomen inductie van allergeen-specifieke Th cellen met regulatoire eigenschappen er nog niet direct toe dat de effectiviteit van SIT toeneemt. Hieruit kunnen we concluderen dat een reductie van de allergie-veroorzakende Th2-cellen een cruciale rol speelt in de uiteindelijke blijvende reductie van de allergische klachten bij patiënten.

