



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Human T-cell responses to *Aspergillus fumigatus*: In healthy individuals and patients with *Aspergillus*-related disease

Jolink, H.

Citation

Jolink, H. (2017, March 7). *Human T-cell responses to Aspergillus fumigatus: In healthy individuals and patients with Aspergillus-related disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/47911>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/47911>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/47911> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Jolink, H.

Title: Human T-cell responses to *Aspergillus fumigatus*: In healthy individuals and patients with *Aspergillus*-related disease

Issue Date: 2017-03-07

Nederlandse samenvatting

Achtergrond

Aspergillus fumigatus is een schimmel die alom aanwezig is in de omgeving zoals in grond en compost, maar die ook in pandig aangetoond kan worden, met name in het geval van bouwwerkzaamheden. Sporen van deze schimmel bevinden zich in de lucht, waardoor mensen iedere dag honderden *Aspergillus fumigatus* sporen inademen. In mensen met een normaal functionerend afweersysteem geeft dit geen aanleiding tot symptomen.

Bij patiënten met een ernstige afweerstoornis kan *Aspergillus fumigatus* echter leiden tot invasieve aspergillose, een ernstige infectie die zich manifesteert met koorts en longklachten, zoals hoesten, kortademigheid en pijn bij ademen. De infectie kan zich soms verspreiden naar andere organen, waaronder de huid en de hersenen. In het geval van verspreiding naar de hersenen heeft de patiënt meestal neurologische uitvalsverschijnselen zoals krachtsverlies. De mortaliteit in patiënten met invasieve aspergillose is hoog, 50-80%, waarbij dit deels ook verklaard wordt door het ernstige onderliggende lijden.

Aspergillus fumigatus kan aan de andere kant een allergische aandoening veroorzaken in patiënten met astma of cystic fibrose (CF) als onderliggend lijden. Deze aandoening, allergische bronchopulmonale aspergillose (ABPA), wordt gekenmerkt door toename van astma symptomen, zoals hoesten, piepen, kortademigheid en toename van sputumproductie. Dit sputum is vaak dik en taai, en moeilijk op te hoesten. Algemene symptomen zoals gewichtsverlies, malaise en lichte temperatuursverhoging kunnen ook voorkomen. ABPA wordt veroorzaakt door een afwijkende reactie van het afweersysteem na blootstelling aan *Aspergillus fumigatus*, het is echter niet geheel duidelijk waardoor deze afwijkende reactie uitgelokt wordt.

Het afweersysteem speelt dus een belangrijke rol in het ontstaan van *Aspergillus* gerelateerde ziektes. Het afweersysteem bestaat uit verschillende typen witte bloedcellen, die een rol spelen in de afweer tegen ziekteverwekkers, waaronder *Aspergillus fumigatus*. Het immuunsysteem wordt onderverdeeld in 2 delen, het aangeboren of innate immuunsysteem en het verworven of adaptieve immuunsysteem. Tot het aangeboren immuunsysteem behoren de neutrofiële granulocyten, monocyt, macrofagen en dendritische cellen. Al deze afweercellen zijn goed in staat om vreemde deeltjes te herkennen en in de cel op te nemen, een proces dat fagocytose wordt genoemd. De monocyt, macrofagen en dendritische cellen kunnen vervolgens de deeltjes afbreken tot kleine stukjes eiwit – peptiden – die ze aan het oppervlak van de cel kunnen presenteren in speciale moleculen, de human leukocyt antigen (HLA) moleculen. Daarom worden deze cellen ook wel antigeen presenterende cellen genoemd. Dit proces is van belang om T-cellen te activeren, die behoren tot het tweede deel van het afweersysteem, het adaptieve immuunsysteem.

De T-cel wordt geactiveerd als een peptide in een HLA molecuul herkend wordt door de T-cel. Hiervoor heeft de T-cel een receptor op het oppervlak. T-cellen die ziekteverwekkers herkennen die zich in de cel bevinden zoals virussen, hebben een CD8 receptor, en herkennen peptiden in HLA klasse I moleculen. T-cellen die ziekteverwekkers herkennen die zich buiten de cel bevinden zoals een groot deel van de bacteriën en schimmels, hebben een CD4 receptor, en herkennen peptiden in HLA klasse II moleculen. CD8+ T-cellen worden ook wel cytotoxische T-cellen genoemd en CD4+ T-cellen worden ook wel Thelper cellen genoemd. Elke T-cel heeft een unieke T-celreceptor en herkent in principe maar één bepaalde peptide-HLA combinatie. Afhankelijk van signalen van de antigeen presenterende cel en bepaalde signaalstoffen (cytokines) in de omgeving van de CD4+ T-cel, zal de T-cel een bepaald fenotype tot expressie brengen. Er zijn 3 belangrijke Thelper cel fenotypes: Thelper1, Thelper2 en Thelper17. T-cellen produceren cytokines, waarbij Thelper1 cellen voornamelijk IFN γ , TNF- β en IL-2 produceren, Thelper2 cellen IL-4, IL-5, IL-10 en IL-13, en Thelper17 cellen IL-17, IL-21 en IL-22. De verschillende Thelper fenotypes gaan met verschillende andere cellen van het afweersysteem een interactie aan. Zo activeren Thelper1 cellen monocyt en macrofagen, en gaan ze een interactie aan met CD8+ cytotoxische T-cellen en met IgG-producerende B-cellen. Thelper2 cellen gaan een interactie aan met mestcellen, eosinofiele granulocyten en met B-cellen, zodat B-cellen IgE gaan produceren. Tot slot zorgen Thelper17 cellen voor de activatie en aantrekking van neutrofiële granulocyten.

Als een T-cel een peptide herkent dat nog niet eerder in het lichaam aanwezig is geweest, dan is er een extra signaal nodig om de T-cel te activeren. Deze naïeve T-cel zal zich delen en uitgroeien tot een grote populatie van T-cellen met dezelfde herkenning. In de loop van dit proces zullen T-cellen die het peptide het beste binden (hoog-avide T-cellen) overblijven. Als de infectie bestreden is, dooft de immuunrespons uit, waarbij een deel van de T-cellen in lage aantallen in het lichaam aanwezig blijft. Dit zijn de geheugen of memory T-cellen. Bij een tweede infectie met dezelfde verwekker, zal de immuunrespons sneller en krachtiger op kunnen treden door de aanwezigheid van deze memory T-cellen. Van dit gegeven kan men ook gebruik maken om de aanwezigheid van een T-celrespons tegen een bepaalde ziekteverwekker te meten.

In de afweerreactie tegen *Aspergillus fumigatus* zijn verschillende afweercellen van belang. Al heel lang is bekend dat neutrofiële granulocyten van groot belang zijn om een aspergillus infectie te voorkomen en om deze te kunnen klaren. Neutrofiële granulocyten kunnen *Aspergillus fumigatus* sporen fagocyteren en zo uitgroei tot schimmeldraden (hyfen) voorkomen. Als hyfen al gevormd zijn, zorgen neutrofiële granulocyten door uitstoot van verschillende stoffen zoals proteases en door de vorming van neutrophil extracellular traps (NETs) voor schade aan en afgenomen groei van hyfen. Andere fagocyterende cellen zijn ook van belang: Alveolaire macrofagen, aanwezig in de long, komen als eerste in aanraking met geïnhalede sporen van *Aspergillus fumigatus*. Subtiële genetische afwijkingen in de herkenning- en signaalsystemen van macrofagen, monocyt en dendritische

cellen geven een verhoogd risico op het optreden van invasieve aspergillose bij patiënten die een verminderde afweer hebben na stamceltransplantatie. Dit wijst er op dat deze cellen zeker een rol hebben in de afweer tegen *Aspergillus fumigatus*.

Recent is er meer aandacht gekomen voor de rol van T-cellen in de immuunrespons tegen *Aspergillus fumigatus*. In het bloed van gezonde mensen zijn *Aspergillus*-specifieke T-cellen aangetoond door witte bloedcellen afkomstig uit het bloed te stimuleren met extract van *Aspergillus fumigatus* eiwitten of met recombinant *Aspergillus* eiwitten. Een enkele studie heeft daarnaast de aanwezigheid van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in patiënten met invasieve aspergillose aangetoond. In muizenstudies waarin muizen met een verminderde afweer werden geïnfecteerd met *Aspergillus fumigatus* sporen, zorgde vaccinatie met *Aspergillus* antigenen of de toediening van *Aspergillus*-specifieke T-cellen voor een betere prognose. In één studie bij patiënten na haploidentieke stamceltransplantatie zijn ook aanwijzingen gevonden dat de toediening van *Aspergillus*-specifieke T-cellijnen tot een verbeterde prognose zou leiden.

Dit proefschrift

Hoewel er de laatste tijd aanwijzingen zijn dat *Aspergillus*-specifieke T-cellen een rol spelen in de afweer tegen *Aspergillus fumigatus*, zijn veel aspecten nog onduidelijk. Hoe is de afweerrespons tegen *Aspergillus fumigatus* opgebouwd? Welke rol hebben *Aspergillus*-specifieke T-cellen in het voorkomen of klaren van een aspergillus infectie in patiënten met een verminderde afweer? Welk type helper T-cellen zijn belangrijk in de afweer tegen *Aspergillus fumigatus*? En zijn er verschillen in de cytokine profielen in verschillende compartimenten van het lichaam? Hoe komt het dat sommige patiënten allergisch reageren op blootstelling aan *Aspergillus* sporen? Zorgen bepaalde *Aspergillus* eiwitten voor zo'n allergische reactie? Tot slot, als er *Aspergillus*-specifieke T-cellen zijn, betekent dit ook dat zij een actieve rol spelen in het voorkomen of klaren van aspergillus infecties, en op welke manier doen ze dat dan? De studies beschreven in dit proefschrift proberen een antwoord te geven op deze vragen.

Karakterisering van de immuunrespons tegen *Aspergillus fumigatus* in gezonde mensen

In **hoofdstuk 2** is de afweerrespons tegen *Aspergillus fumigatus* in gezonde mensen in kaart gebracht. Witte bloedcellen (mononucleaire cellen) uit het bloed van 24 gezonde donoren werden gestimuleerd met overlappende peptiden van 2 verschillende eiwitten van *Aspergillus fumigatus*: Crf1 en Catalase1. In 18 van de 24 donoren werden Crf1- en Catalase1-specifieke T-cellen aangetoond in lage frequenties. Deze T-cellen waren gericht tegen een groot aantal verschillende epitopen met een diverse HLA-restrictie en produceerden voornamelijk IFN γ , wijzend op een Thelper1 profiel. Door de Crf1- en Catalase1-specifieke T-cellen 1 cel per well te selecteren op basis van expressie van activatiemarkers en vervolgens klonen op te kweken, kon de *Aspergillus*-reactiviteit worden getest. Het merendeel van de klonen produceerde IFN γ en kleinere hoeveelheden IL-4 of IL-17 na

stimulatie met *Aspergillus* eiwit extract, waarmee de specificiteit van de T-cellen voor *Aspergillus* werd aangetoond. Concluderend was er sprake van een brede T-celrespons tegen *Aspergillus fumigatus* met een Thelper1 cytokine profiel.

Kinetiek van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in patiënten met invasieve aspergillose

In **hoofdstuk 3** wordt een studie beschreven, waarin bij 11 patiënten met invasieve aspergillose de aanwezigheid en het cytokineprofiel van Crf1- en Catalase1-specifieke T-cellen wordt bestudeerd gedurende het beloop van de aspergillus infectie. Er werden 33 patiënten met invasieve aspergillose geselecteerd voor deelname aan deze studie; de overlevingsperiode van 22 van de 33 patiënten was gemiddeld slechts 4 weken, waardoor er geen perifeer bloed materiaal beschikbaar was of er geen T-cellen aangetoond konden worden in het bloed. De overige 11 patiënten werden geïncubeerd in de studie. Mononucleaire cellen uit het bloed van deze patiënten, afgenomen op verschillende tijdstippen voor en na de diagnose invasieve aspergillose, werden gestimuleerd met overlappende peptiden van de eiwitten Crf1 en Catalase1. Op basis van expressie van de activatiemarker CD154 en de productie van IFN γ werden *Aspergillus*-specifieke T-cellen aangetoond in 9 patiënten, die een gunstig beloop van de aspergillus infectie hadden. Deze *Aspergillus*-specifieke T-cellen namen toe rond het moment dat er sprake was van afname van aspergillus afwijkingen. De *Aspergillus*-specifieke T-cellen hadden een Thelper1 cytokine profiel en de herkenning van T-cel epitopen door deze T-cellen was gevarieerd. In 2 patiënten met een ongunstig beloop van de aspergillus infectie konden geen *Aspergillus*-specifieke T-cellen worden aangetoond. De resultaten van deze studie wijzen op een correlatie tussen de opkomst van *Aspergillus*-specifieke T-cellen en het herstel van invasieve aspergillose.

Cytokineprofiel van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in verschillende lichaamscompartimenten

Veel informatie over *Aspergillus*-specifieke T-cellen is afkomstig van onderzoek naar *Aspergillus*-specifieke T-cellen in perifeer bloed. De blootstelling aan *Aspergillus fumigatus* vindt echter primair plaats in de long, en slechts bij disseminatie van de infectie zal er blootstelling aan *Aspergillus fumigatus* zijn in het bloed. In **hoofdstuk 4** worden daarom frequenties en cytokineprofielen van *Aspergillus*-specifieke T-cellen afkomstig uit longweefsel vergeleken met *Aspergillus*-specifieke T-cellen uit perifeer bloed. Het longweefsel was afkomstig van 10 COPD-patiënten die een longtransplantatie of een partiële longresectie vanwege een longtumor hadden ondergaan. Van 3 van hen was ook perifeer bloed beschikbaar. Ook werden nog 7 andere COPD-patiënten geïncubeerd die een partiële longresectie hadden ondergaan, van wie alleen perifeer bloed aanwezig was. Mononucleaire cellen werden uit bloed of longweefsel geïsoleerd en gestimuleerd met overlappende peptiden van 6 verschillende *Aspergillus fumigatus* eiwitten: Crf1, Catalase1, Asp1, Asp2, Asp3 en Asp4. *Aspergillus*-specifieke T-cellen werden geïdentificeerd op

basis van CD154-expressie; de frequenties in longmateriaal en perifeer bloed bleken niet verschillend. Zoals in eerdere studies naar *Aspergillus*-specifieke T-cel immuniteit, hadden *Aspergillus*-specifieke T-cellen in perifeer bloed voornamelijk een Thelper1 profiel met productie van IFN γ en waren er slechts lage frequenties van IL-17 producerende *Aspergillus*-specifieke T-cellen. *Aspergillus*-specifieke T-cellen in longmateriaal daarentegen hadden voornamelijk een Thelper17 cytokineprofiel met productie van IL-17 en slechts weinig *Aspergillus*-specifieke T-cellen afkomstig uit de long produceerden IFN γ . Het cytokineprofiel van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in de long was dus vergelijkbaar met het Thelper fenotype zoals in andere schimmel- en gistinfecties, waar sprake is van een Thelper17 cytokineprofiel. Dit zou men ook verwachten, aangezien Thelper17 cellen van belang zijn voor de activatie en aantrekking van neutrofiele granulocyten, waarvan al langer bekend is dat ze een belangrijke rol spelen in de afweer tegen schimmelinfecties, waaronder *Aspergillus fumigatus*.

Rol van *Aspergillus* eiwitten in het ontstaan van een Thelper2 respons in ABPA

Aspergillus-specifieke T-cellen van patiënten met allergische bronchopulmonale aspergillose (ABPA) hebben een Thelper2 cytokineprofiel, met productie van IL-4, IL-5 en IL-13, in tegenstelling tot gezonde mensen en patiënten met invasieve aspergillose waar *Aspergillus*-specifieke T-cellen in perifeer bloed een Thelper1 respons laten zien. In **hoofdstuk 5** werd de rol die bepaalde *Aspergillus* eiwitten spelen in het ontstaan van deze Thelper2 respons bestudeerd. Mononucleaire cellen uit perifeer bloed van patiënten met ABPA en van gezonde mensen werden gestimuleerd met overlappende peptiden van de 6 *Aspergillus fumigatus* eiwitten Crf1, Catalase1, Asp1, Asp2, Asp3 en Asp4. Er was geen verschil in de T-celrespons in patiënten met ABPA en gezonde mensen; in beide groepen werd een brede T-celrespons geïdentificeerd, gericht tegen verschillende *Aspergillus* eiwitten. De cytokineprofielen van de *Aspergillus*-specifieke T-cellen in beide groepen waren wel verschillend. In patiënten met ABPA werd een overwegend Thelper2 respons gevonden, terwijl in gezonde mensen sprake was van een Thelper1 respons. Dit was niet afhankelijk van het eiwit dat was gebruikt voor stimulatie. Concluderend, hadden *Aspergillus*-specifieke T-cellen in ABPA patiënten een Thelper2 fenotype, onafhankelijk van het *Aspergillus* antigeen waarmee gestimuleerd was.

Werkingsmechanisme van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in de afweer tegen *Aspergillus fumigatus*

In **hoofdstuk 6** wordt een *in vitro* model beschreven, waarin werd bestudeerd wat het werkingsmechanisme van *Aspergillus*-specifieke T-cellen is in de afweer tegen *Aspergillus fumigatus*. Uit perifeer bloed van gezonde mensen werden op basis van specifieke oppervlaktecelmarkeringen de verschillende typen afweercellen geïsoleerd met behulp van MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting). Monocyten, neutrofiele granulocyten en T-cellen werden gelabeld met fluorochromen gekoppeld

aan specifieke oppervlaktecelmarkers en geïnactiveerde *Aspergillus fumigatus* sporen werden gekleurd met Cellvue, waardoor de verschillende populaties in flow cytometry experimenten zichtbaar gemaakt konden worden. Het effect van inactieve, aspecifiek geactiveerde T-cellen en *Aspergillus*-specifieke T-cellen op de fagocytose capaciteit van monocyt en neutrofiele granulocyten werd geanalyseerd. De fagocytose capaciteit van monocyt was hoog en veranderde niet door de toevoeging van T-cellen. De fagocytose capaciteit van neutrofiele granulocyten was veel lager en nam toe bij toevoeging van geactiveerde T-cellen, waarbij het niet van belang was of deze cellen *Aspergillus*-specifiek waren of aspecifiek geactiveerd. Rustende T-cellen hadden geen effect op de fagocytose capaciteit van neutrofiele granulocyten. Waarschijnlijk wordt het effect gemedieerd door cytokines, waaronder IL-2, GM-CSF en IFN γ . Mogelijk hebben T-cellen ook een rol in de latere fase van de afweer tegen *Aspergillus fumigatus* of in de aantrekking van afweercellen naar de locatie van de infectie. Er werd een assay opgezet om het effect van T-cellen in een later stadium van aspergillus infectie te bestuderen. Deze assay gaf helaas geen betrouwbare, reproduceerbare resultaten en is daarom niet geschikt voor het beantwoorden van deze onderzoeksvraag.

De resultaten beschreven in dit proefschrift verbreden en verdiepen de kennis over *Aspergillus*-specifieke T-cellen in gezonde mensen en verschillende patiëntengroepen. In alle populaties zijn *Aspergillus*-specifieke T-cellen aanwezig met een breed herkenningsprofiel. Afhankelijk van de onderliggende ziekte hebben de *Aspergillus*-specifieke T-cellen een ander cytokineprofiel, dit is echter niet afhankelijk van specifieke *Aspergillus* antigenen. Het opkomen van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in patiënten met invasieve aspergillose ten tijde van verbetering van de infectie, suggereert een rol van *Aspergillus*-specifieke T-cellen in het klaren van *Aspergillus fumigatus*, hoewel deze aanname slechts gebaseerd kan worden op een correlatie in de tijd tussen beide observaties. Verdere studies zijn nodig om vast te kunnen stellen of bijvoorbeeld het toedienen van *Aspergillus*-specifieke T-cellen (adoptieve T-cel therapie) aan patiënten met invasieve aspergillose een goede therapeutische strategie is. Daarin zouden dan ook de verschillen in effectiviteit van *Aspergillus*-specifieke T-cellen met verschillende Thelper profielen kunnen worden bestudeerd, aangezien er een verschillend cytokineprofiel werd gevonden in *Aspergillus*-specifieke T-cellen afkomstig uit perifeer bloed en uit longweefsel.