



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection : finding prognostic markers and correlates of protection**

Rovito, R.

### **Citation**

Rovito, R. (2018, October 16). *Pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection : finding prognostic markers and correlates of protection*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66319>

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/1887/66319>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66319> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Rovito, R.

**Title:** esis of congenital cytomegalovirus infection : finding prognostic markers and correlates of protection

**Issue Date:** 2018-10-16

## SAMENVATTING

Cytomegalovirus (CMV) infectie is een wereldwijd voorkomende infectie die bij het merendeel van de personen onopgemerkt blijft. Wanneer het virus echter tijdens de zwangerschap het ongeboren kind (foetus) via de placenta infecteert, kan het ernstige ziekte veroorzaken. Deze congenitale, of aangeboren, CMV infectie (cCMV) kan een verscheidenheid aan klinische manifestaties veroorzaken bij de geboorte (symptomen bij de geboorte) en op de lange termijn, de zogenaamde lange termijn gevolgen (LTG). De klinische symptomen kunnen ook variëren in ernst, b.v. bij symptomatische pasgeborenen kunnen ze variëren van verhoogde leverenzymen tot microcefalie (een te klein hoofd). De permanente lange termijn beperkingen (variërend van problemen met het zicht tot ernstige neurologische problemen) kunnen deels progressief zijn of zich later in de kindertijd openbaren, bijvoorbeeld het later ontstaan van gehoorverlies. In dat geval kan een retrospectieve diagnose een uitdaging zijn. Belangrijk is dat van het totaal aantal geïnfecteerde pasgeborenen 13% symptomatisch is bij de geboorte en de helft van deze kinderen LTG zal ontwikkelen. Echter, ook 13% van de asymptomatische pasgeborenen zal dezelfde LTG ontwikkelen; en aangezien deze groep veel groter is dan de symptomatische groep, zijn de meeste kinderen met lange termijn problemen afkomstig uit de groep die asymptomatisch bij geboorte was. In dit laatste geval wordt cCMV dus makkelijk gemist omdat er bij de geboorte geen verdenking ontstaat. Samenvattend, zullen niet alle geïnfecteerde kinderen bij de geboorte symptomen vertonen of langdurige beperkingen ontwikkelen. Op dit moment is er geen prognostische marker beschikbaar om te voorspellen welke neonaten LTG zullen hebben, en wanneer, en welk type beperking ze zullen krijgen. cCMV kan op elk moment tijdens de zwangerschap optreden, maar de gevolgen zijn ernstiger wanneer de infectie vroeg in de zwangerschap optreedt, omdat de foetus zich dan nog ontwikkelt. cCMV kan vóórkomen bij moeders na hun eerste infectie met CMV tijdens de zwangerschap (moeders die eerder seronegatief waren) of bij moeders die al eerder geïnfecteerd waren met CMV (dus seropositief waren). Bij de laatste groep is de verticale transmissie kans (dat wil zeggen de kans dat er CMV-overdracht plaatsvindt van de moeder naar de foetus) meestal lager dan bij de seronegatieve zwangere vrouwen, vanwege de reeds bestaande immuniteit tegen CMV, maar het is niet duidelijk of deze immuniteit ook beschermt tegen ernstige klinische problemen. Deze twee variabelen, trimester van maternale infectie en reeds bestaande immuniteit, bemoeilijken studies over cCMV-pathogenese in de algemene populatie.

Het doel van dit proefschrift was om nieuwe inzichten te verkrijgen in cCMV-pathogenese en om prognostische markers te identificeren voor korte- en lange termijn klinische uitkomsten. Hieraan gerelateerd zou de studie een maat voor bescherming tegen CMV kunnen opleveren, welke te gebruiken bij vaccinontwikkeling. Voor dit doel werd een retrospectief Nederlands cohort van kinderen met cCMV en CMV-negatieve controles (niet-geïnfecteerde kinderen) gebruikt. Alle kinderen zijn in 2008 in Nederland geboren en bloed op het hielprikkaartje werd gebruikt om cCMV te diagnosticeren. De hielprikkaartjes worden verkregen door binnen een week na de geboorte bloed uit de hiel van de pasgeborene op een filterpapier te druppelen. Deze hielprikkaarten worden routinematig gebruikt voor het screenen op zeldzame genetische en metabole aandoeningen waarvoor een levensreddende interventie beschikbaar is. Deze kaarten



zijn getest op de aanwezigheid van CMV-DNA om cCMV te diagnosticeren. Bovendien werd, door het meten van de hoeveelheid CMV-DNA, de "virale load" bepaald (een maat voor hoeveel virus in het lichaam aanwezig is). Van de kinderen in dit cohort waren klinische gegevens beschikbaar vanaf de geboorte tot de leeftijd van 6 jaar. Verder is van zowel moeders als kinderen een beetje wangslimvlies afgenomen. DNA uit wangslimvlies is gebruikt voor verschillende genetische studies. Voor de studie werden de volgende biomarkers onderzocht in relatie tot cCMV, de CMV-virale load, symptomen bij de geboorte en LTG tot de leeftijd van 6 jaar:

- Markers voor B-cellen,  $\alpha\beta$ - en  $\gamma\delta$ -T-cellen in de hielpriikkaart
- Genexpressie profielen in het bijzonder in relatie tot het immuunsysteem en ontstekingsreacties in de hielpriikkaart
- Gegevens over essentiële aminozuren, hormonen, carnitines en enzymen in de hielpriikkaart
- HLA (humane leukocyten antigenen) op wangslimvlies van moeders en kinderen

In de volgende paragrafen worden de belangrijkste bevindingen van alle hoofdstukken weergegeven. Eerst worden de bovengenoemde biomarkers met betrekking tot cCMV-infectie zelf en de virale load in de hielpriikkaart beschreven. Vervolgens, de biomarkers in relatie tot symptomen bij de geboorte en LTG-ontwikkeling.

## Congenitale CMV infectie

Om het effect van cCMV op de verschillende markers te bestuderen, hebben we de biomarkers in de hielpriikkaart of wangslimvlies bij kinderen met cCMV vergeleken met die bij kinderen zonder cCMV (onze controlegroep). In ons cohort was in de cCMV groep een verminderde productie van  $\alpha\beta$  T-cellen in de thymus aantoonbaar, een verhoogd aantal  $\gamma\delta$  T-cellen en verhoogde productie van B-cellen (**hoofdstuk 2**). Bovendien was bij cCMV uitputting van T-cellen te zien (d.w.z. een algemene toestand van cellulaire dysfunctie die gewoonlijk wordt gezien bij chronische infecties en blootstelling aan hoge virale loads) (**hoofdstuk 4**). Van deze markers was alleen de productie van  $\alpha\beta$  T-cellen niet geassocieerd met CMV virale load. In **hoofdstuk 4** toonde het genexpressieprofiel op de hielpriikkaart een hogere expressie van genen gerelateerd aan de aangeboren immuunrespons en NK-cel activatie bij kinderen met een hogere CMV virale load. Het aangeboren immuunsysteem, waaronder NK-cellen en  $\gamma\delta$  T-cellen, kan een belangrijke rol spelen bij het onder controle houden van CMV in het ongeboren kind, waar de CMV-specifieke immuunreactie zich nog moet ontwikkelen. Verder was een specifiek HLA van klasse II bij kinderen (d.w.z. een molecuul dat CMV-componenten presenteert aan immuun cellen), namelijk HLA-DRB1\*04, geassocieerd met een betere CMV virus controle (**hoofdstuk 6**). Dit positieve effect op virus controle kan berusten op het feit dat een HLA klasse II beide armen van de specifieke immuunrespons, de cytotoxische en antilichaamreacties, ondersteunt. cCMV had geen invloed op het neonatale metabolisme in de hielpriikkaart, maar een verlaagde hoeveelheid essentiële aminozuren (bestanddelen van eiwitten) werd gevonden in de subgroep van te vroeg geboren pasgeborenen met cCMV (geboren vóór de 37 weken zwangerschap) in vergelijking met te vroeg geboren kinderen zonder cCMV (**hoofdstuk 3**). Hoewel cCMV het neonatale metabolisme niet beïnvloedde, induceerde een

hogere CMV virale load een toename van C16 (**hoofdstuk 3**). C16 is een vetzuur en de voorloper van vetzuren met een langere keten, die ook voorkomen in de envelop van CMV. Daarom kan de toename van C16 in de groep met hogere virale load het gevolg zijn van hogere virale replicatie.

## Symptomen bij geboorte

De verschillende markers werden ook bestudeerd in relatie tot de aanwezigheid van symptomen bij de geboorte, door de markers in de cCMV-groep met symptomen te vergelijken met die in de groep zonder symptomen. De enige markers gerelateerd aan symptomen bij de geboorte werden gevonden tijdens het bestuderen van de HLA-types van zowel moeders als kinderen, en specifieke moeder-kind combinaties. In **hoofdstuk 5** en **hoofdstuk 6** hebben we de rol van HLA Klasse I en Klasse II, als ook van NK-cel receptoren bij de moeder onderzocht in relatie tot de klinische uitkomst van cCMV. We vonden dat een specifiek HLA-G-deletie/deletie genotype bij moeder, homozygotie voor HLA-C1 bij moeder, en moeder-kind HLA-E en HLA-C mismatches geassocieerd waren met symptomatische ziekte (**hoofdstuk 5**). De moeders met het HLA-G-deletie/deletie genotype hebben waarschijnlijk hogere niveaus van het HLA-G-eiwit, dat immunosuppressieve eigenschappen heeft. De immunosuppressie kan leiden tot minder controle van het virus na CMV-infectie tijdens de zwangerschap en kan leiden tot een hogere virale load in de placenta. Er is sprake van een HLA-mismatch wanneer de moeder niet dezelfde genetische HLA-informatie heeft als het ongeboren kind, omdat een deel van de genetische HLA-informatie afkomstig is van de vader, die anders kan zijn dan die van de moeder. In **hoofdstuk 5** hebben we aangetoond dat in het geval van HLA-E of HLA-C mismatch de kans op een kind met symptomen bij de geboorte hoger was. Een mismatch van HLA, zoals van HLA-E en HLA-C die aanwezig zijn in de placenta, kan leiden tot maternale T-cellen die gericht zijn tegen foetaal weefsel. Normaal gesproken wordt dit proces onderdrukt, maar in het geval van een CMV-infectie van de placenta kan dit evenwicht verstoord worden, hetgeen zou kunnen leiden tot een T-celreactie tegen de placenta en de foetus. Verder is HLA-matching noodzakelijk voor een adequate immuunrespons op virus geïnfecteerde cellen. Daarom kan een HLA-mismatch leiden tot een slechtere immuunreactie en minder controle van de virale infectie, met als gevolg een hogere virale load in placenta en mogelijk ook de foetus. Ten slotte is één van de meest voorkomende cellen in de placenta de NK-cel, die tot de aangeboren immuniteit behoort en daarom snel reageert bij activatie. Deze cellen hebben het bijzondere kenmerk dat zij zowel verschillende activerende en remmende receptoren bezitten waarbij de combinatie bepaalt in welke mate de NK-cellen geactiveerd worden. De HLA-C-moleculen kunnen in verschillende mate aan deze receptoren binden. In de groep met symptomen bij de geboorte, misten de moeders vaker het remmende HLA-C type. Daarom zouden de activerende signalen bij NK-cellen de overhand kunnen krijgen, hetgeen bijdraagt aan een (nog verder) toegenomen inflammatie van de placenta (**hoofdstuk 5**). In **hoofdstuk 6** werden de HLA-types bestudeerd die niet in de placenta tot expressie komen. Voor deze HLA-types werd geen verband gevonden met symptomen bij de geboorte. Samenvattend lijken de symptomen bij de geboorte verband te houden met genetische markers die bijdragen aan een hoge CMV virale load bij de moeder en in de placenta vanwege een gebrek aan virale controle en met een sterkere mate van placentaire ontsteking.

## Lange-termijn gevolgen

In drie hoofdstukken worden biomarkers beschreven die geassocieerd lijken te zijn met LTG op 6-jarige leeftijd. In **hoofdstuk 2** hadden geïnfecteerde kinderen die LTG hadden een lager aantal B-cellen. Bovendien vonden we een hoger percentage van HLA-C niet-overerfde maternale antigenen (NIMA) in die geïnfecteerde kinderen mét LTG (**hoofdstuk 5**). Het kind wordt blootgesteld aan antigenen die hij niet heeft geërfd, de zogenaamde NIMA, omdat er tijdens de zwangerschap en borstvoeding een wederzijdse uitwisseling van cellen tussen moeder en kind plaatsvindt. Kleine aantallen maternale cellen nestelen zich in verschillende foetale organen en blijven daar tenminste tot de volwassen leeftijd is bereikt. In plaats van een immunologische reactie tegen deze “vreemde” maternale antigenen, ontwikkelt de foetus een langdurige tolerantie (NIMA-effect). Het NIMA-effect is gunstig in de context van transplantatie omdat het de overleving van transplantaten kan verbeteren. Tijdens infecties kan het NIMA-effect echter ook een indirecte tolerantie voor de verwekker van de infectie veroorzaken. Indirecte tolerantie voor de CMV-infectie zou een ongecontroleerde virale replicatie kunnen veroorzaken gedurende de kindertijd. In **hoofdstuk 4** laten we tenslotte zien dat bij kinderen die geen LTG hebben een hogere expressie van anti-inflammatoire markers was. Dit suggereert dat een deel van de pathogenese van lange termijn schade kan worden toegeschreven aan een ongecontroleerde infectie en ontsteking.

Het doel van dit proefschrift was om prognostische markers te identificeren voor korte en lange termijn klinische uitkomsten en correlaten van bescherming voor de ontwikkeling van vaccins. We hebben enkele interessante biomarkers gevonden die, indien bevestigd in andere cohorten, potentiële kandidaten voor dergelijke doelen zouden kunnen zijn. Soms waren de verschillen tussen de groepen te klein en er was niet één biomarker die eruit sprong. Aan de andere kant hebben de bevindingen wel geleid tot een beter begrip van de cCMV-pathogenese (d.w.z. de biologische mechanismen die tot ziekte leiden). Het begrijpen van cCMV-pathogenese is om verschillende redenen relevant. Allereerst kan dit toekomstig onderzoek naar prognostische markers helpen. Ten tweede, als we de mechanismen voor de progressieve en permanente schade beter begrijpen, kan dit de toepassing van innovatieve klinische strategieën ondersteunen waarmee de korte- en lange termijn klinische uitkomst positief beïnvloed kan worden. Uiteindelijk zou een geregistreerd CMV vaccin het ultieme doel van cCMV-onderzoek zijn. Vaccinatie zou verticale transmissie tijdens de zwangerschap kunnen voorkomen en cCMV geassocieerde ziekte bij het kind. De identificatie van de bovengenoemde biomarker zou ook kunnen helpen bij toekomstig onderzoek naar de ontwikkeling van vaccins.

Tot slot, uit het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift, zijn verschillende uitdagingen naar voren gekomen waarmee bij toekomstig onderzoek rekening gehouden kan worden. De meerderheid van de pasgeborenen met cCMV is asymptomatisch bij de geboorte en heeft een goede prognose en een normale ontwikkeling. Daarom is de vergelijking van de immunologische kenmerken van deze kinderen met die van symptomatische pasgeborenen mét lange termijn schade, als ook met die van asymptomatisch pasgeborenen met dezelfde LTG essentieel om te bepalen welke factoren bepalend zijn voor lange termijn schade. Ondertussen moeten we nieuwe klinische strategieën ontwerpen, en onderzoeken of de huidige klinische strategieën van

nut zijn voor die asymptomatische pasgeborenen. Bij deze groep moet bijvoorbeeld onderzocht worden of de voordelen van antivirale behandeling opwegen tegen de bijwerkingen. Daarnaast is het van belang om te komen tot standaardisatie van de definities van symptomatische ziekte en LTG-ontwikkeling, zonder welke geen betrouwbare conclusie kan worden getrokken over cCMV-pathogenese.

