



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The immune compartment at the maternal-fetal interface throughout human pregnancy

Zwan, A. van der

Citation

Zwan, A. van der. (2020, February 6). *The immune compartment at the maternal-fetal interface throughout human pregnancy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/84689>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/84689>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/84689> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zwan, A. van der

Title: The immune compartment at the maternal-fetal interface throughout human pregnancy

Issue Date: 2020-02-06

Chapter 09

English summary

Nederlandse samenvatting

List of publications

Acknowledgements

About the author

English summary

The immune system

Our immune system is shaped by cell populations, known as white blood cells or leukocytes, that protect us against tumor cells and microorganisms, such as viruses, bacteria and parasites. Immune cells come in several flavors, namely myeloid cells (dendritic cells, macrophages), NK cells, T cells (CD4+ and CD8+ T cells), and B cells, and have several different functions (**Chapter 1, Fig. 1**). To function properly, immune cells must distinguish between 'self' (one's own healthy cells) and 'non-self' antigens such as tumor cells and pathogens. MHC genes are essential for this recognition and encode for MHC class I and II molecules. In humans, MHC molecules are known as human leukocyte antigens (HLA). Every individual inherits one of these molecules from their mother (maternal) and one from their father (paternal). HLA antigens are molecules present on the cell membrane of cells and they exist in numerous variants in human populations. One of the main functions of HLA molecules is to present peptides (antigens) from pathogens to receptors present on T cells (TCR). Peptides are parts of a protein derived from inside the cell (**Chapter 1, Fig. 2A**). T cells are activated by non-self antigens presented in self HLA molecules. Conversely, T cells can also get activated by the presence and recognition of non-self (allogeneic) HLA molecules as is the case in transplantation, blood transfusions and pregnancy. In organ transplantation, when a donor and recipient have different HLA molecules, the recipient's immune system mounts a response against the HLA molecules of the donor as the graft (organ) expressing these donor molecules is perceived as 'foreign'. This response against the donor is referred to as an allo-immune response.

Pregnancy

Pregnancy resembles organ transplantation in that the fetus expresses inherited paternal antigens and is hereby considered a semi-allogeneic graft that is immunologically foreign to the mother. After solid organ transplantation, given the HLA mismatches between donor and recipient, recipients rely on life-long immunosuppressive drugs to prevent graft rejection by the recipient's immune system. Uncomplicated pregnancy is a unique setting where the immune system of the mother tolerates the semi-allogeneic fetus for a period of nine months without immunosuppressive treatment. After fertilization, the human blastocyst adheres to the wall of the uterus. The inner cell mass of the blastocyst develops into the embryo and the outer cell mass consisting of trophoblast cells (fetal cells) will form the placenta. The placenta is a key player in pregnancy as it connects the developing fetus via the umbilical cord to the wall of the uterus to allow for the exchange of nutrients and oxygen. Extravillous trophoblasts (EVT) deeply invade the epithelial layer (the decidua) and spiral arteries of the uterus hereby enlarging the diameter of the arteries to increase blood flow to the baby and also to attach the placenta to the uterus.

Furthermore, this is where the trophoblasts come into direct contact with maternal immune cells, the so-called maternal-fetal interface (**Chapter 1, Fig. 3**). The coordinated interactions between trophoblasts, decidual stromal cells and maternal immune cells is tightly regulated to maintain immune tolerance and thereby ensure a healthy pregnancy. Not in all cases is a pregnancy successful. Aberrant functioning of the maternal immune system has been suggested to play a role in pregnancy complications such as pre-eclampsia, recurrent miscarriage, preterm birth and fetal growth restrictions. Pre-eclampsia is a pregnancy complication characterized by high blood pressure and proteinuria (protein in the urine) and the incidence rate is circa 3-5% of pregnancies. Recurrent miscarriage is defined as three or more consecutive miscarriages prior to the 20th week of gestation, which is the case in 1 to 2% of all couples trying to conceive. Premature birth is defined as babies born alive before 37 weeks of gestation. Placental infections may alter the functioning of the maternal immune system thereby resulting in complications. The most common congenital infection is human cytomegalovirus (HCMV). HCMV sero-positive women were shown to have a 1.5-fold increased risk to develop pre-eclampsia. Furthermore, clinical associations have been found between bacterial infections and pre-term birth. Other pathogens that can infect the trophoblasts during pregnancy are Zika virus, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, and human immunodeficiency virus (HIV). To obtain a better understanding of the immunological component in pregnancy complications it is essential to fully comprehend the immune network and its regulatory mechanisms at the maternal-fetal interface in healthy pregnancy.

This thesis

In this thesis we aimed at further exploring the underlying mechanisms of immune regulation and recognition by maternal immune cells, with a specific focus on decidual CD4⁺ and CD8⁺ T cells and their interaction with EVT throughout healthy pregnancy. Moreover, the need for on the one hand placental tolerance and on the other hand immunity against invading pathogens and how these two components may be in conflict is addressed. Immune cells were isolated from the maternal side of the placenta, the decidua, and from the peripheral blood of pregnant women at time of delivery. Cells that ensure that an immune response is regulated thereby preventing autoimmune diseases are referred to as regulatory T cells (Treg). Treg play an important role in maintaining tolerance during pregnancy. In **Chapter 2** we identified the presence of three subtypes of CD4⁺ Treg at the maternal-fetal interface that suppress effector T cell responses. These Treg can be induced by EVT and decidual macrophages. When CD8⁺ T cells get activated by foreign antigens they start proliferating, expanding and differentiating into cytotoxic effector cells. The majority of CD8⁺ T cells at the maternal-fetal interface are effector-memory T cells that exhibit a mixed profile of activation and dysfunction enabling them to provide both tolerance and immunity (**Chapter 3**). Studies have shown that not only can these CD8⁺ T cells recognize the fetus, but some of them are virus-specific in order to protect the fetus against invading viruses. In healthy individuals, a significant proportion of virus-specific CD8⁺ T cells can recognize the viral peptide presented in an HLA molecule that initially activated them and also recognize allogeneic (foreign) HLA molecules.

This phenomenon is referred to as heterologous immunity and we describe it as the same TCR being able to 'cross-react' with different peptide-HLA complexes (**Chapter 1, Fig. 2B**). In a transplantation setting, the recipient's virus-specific T cells can attack virus-infected cells and simultaneously mount a response against the allogeneic HLA molecules expressed on the donor cells. Similarly, during pregnancy decidual virus-specific CD8+ T cells may be able to attack the paternal allogeneic HLA molecules expressed on the trophoblasts hereby possibly having harmful consequences for pregnancy outcome. In **Chapter 4**, we showed that virus-specific CD8+ T cells are able to cross-react against allo-HLA-C, and further studies are required to determine whether this cross-reactivity could result in pregnancy complications.

As mentioned, in pregnancy there is a fine balance for the maternal immune system between providing tolerance against the semi-allogeneic fetus, yet at the same time protecting mother and baby against placental infections. HLA-C expressed by EVT plays an important role here, as both decidual NK cells and CD8+ T cells can interact with HLA-C. A summary of the research performed by other research groups on the regulation of decidual NK cells and CD8+ T cells at the maternal-fetal interface is provided in the review in **Chapter 5**.

The first part of this thesis is focused on isolating specific decidual T cell subsets and performing functional tests with them in a laboratory setting. In the second part, we applied a relatively new technique, mass cytometry, to get an overview of all the immune cells present at the maternal-fetal interface throughout the three trimesters of pregnancy (**Chapter 7**). To determine the identity of immune cells, the go-to technique up until recently has been flow cytometry. Here, different cell types can be distinguished by adding antibodies that will bind to specific proteins on the cell membranes. Each antibody is tagged with a fluorochrome (fluorescent dye) that can be detected by a flow cytometer. Mass cytometry (CyTOF) is based on flow cytometry, except that the antibodies are tagged with metals instead of fluorochromes. By using a mass cytometer, we can measure which metals have been bound by which cells and thereby identify different cell types. CyTOF allows us to detect many more cell surface proteins when compared to flow cytometry and thereby gives us better insight into the heterogeneity within the immune system. By applying mass cytometry to analyze decidual immune cells we created an immune atlas of healthy pregnancy that serves as a foundation for understanding pregnancy complications. Mass cytometry studies generate a lot of 'big' data and quality control measures, as carried out in **Chapter 6** together with recently described applications, should be incorporated into the workflow of mass cytometry studies to ensure reliable and reproducible data analysis.

A lot of research has been performed in the field of reproductive immunology to get a better understanding of tolerance in healthy pregnancy and what goes wrong in complicated pregnancies. However, we are not there yet. Moving forward, all individual parts studied thus far should be put together to understand the complex,

dynamic placental system during pregnancy, that does not only involve the maternal immune system as described in this thesis, but also trophoblast invasion, the role of hormones, a potential microbiome and the influence of pathogens (**Chapter 8**). Collaboration between cross-disciplinary teams and different research fields is required in future challenges to unravel which parameters derail the placental microenvironment in order to identify diagnostic markers that will aid in the development of novel diagnostic tools and therapies to treat pregnancy complications.

Nederlandse samenvatting

Het afweersysteem

Ons afweersysteem wordt gevormd door celpopulaties, bekend als witte bloedcellen of leukocyten, die ons beschermen tegen tumorcellen en micro-organismen, zoals virussen, bacteriën en parasieten. Afweercellen (immuuncellen) zijn er in verschillende soorten, namelijk myeloïde cellen (dendritische cellen, macrofagen), NK cellen, T cellen (CD4+ en CD8+ T cellen) en B cellen, en hebben verschillende functies (**Hoofdstuk 1, Fig. 1**). Om goed te functioneren, moeten immuuncellen onderscheid kunnen maken tussen 'zelf' (de eigen gezonde lichaamscellen) en 'niet-zelf' antigenen zoals tumorcellen en pathogenen. MHC-genen zijn essentieel voor deze herkenning en coderen voor MHC-klasse I en II moleculen. Bij mensen staan MHC moleculen bekend als Humaan Leukocyten Antigenen (HLA). Elk individu erft één van deze moleculen van zijn moeder (maternaal) en één van zijn vader (paternaal). HLA-antigenen zijn moleculen die aanwezig zijn op het celmembraan en ze bestaan in talloze varianten in menselijke populaties. Eén van de belangrijkste functies van HLA-moleculen is het presenteren van peptiden (antigenen) van pathogenen aan receptoren die aanwezig zijn op T cellen (het TCR).

Peptiden zijn delen van een eiwit afkomstig van binnenin de cel (**Hoofdstuk 1, Fig. 2A**). T cellen worden geactiveerd door niet-zelf antigenen gepresenteerd in zelf HLA-moleculen. Daarnaast kunnen T cellen ook worden geactiveerd door de aanwezigheid en herkenning van niet-zelf (allogene) HLA-moleculen zoals het geval is bij transplantatie, bloedtransfusies en zwangerschap. Bij orgaantransplantatie, wanneer een donor en ontvanger verschillende HLA-moleculen hebben, genereert het immuunsysteem van de ontvanger een reactie tegen de HLA-moleculen van de donor, omdat het transplantaat (orgaan) dat deze donormoleculen tot expressie brengt, wordt gezien als 'vreemd'. Deze reactie tegen de donor wordt een allo-immuunrespons genoemd.

Zwangerschap

Zwangerschap lijkt op orgaantransplantatie in de zin dat de foetus erfelijke vaderlijke antigenen tot expressie brengt en hierbij wordt beschouwd als een semi-allogeen 'transplantaat' dat immunologisch vreemd is voor de moeder. Na een solide orgaantransplantatie, gezien de HLA-mismatches tussen donor en ontvanger, zijn ontvangers levenslang afhankelijk van immunosuppressiva om transplantaat afstoting door het

immuunsysteem van de ontvanger te voorkomen. Een ongecompliceerde zwangerschap is een unieke situatie waarbij het immuunsysteem van de moeder de semi-allogene foetus gedurende een periode van negen maanden verdraagt zonder immunosuppressieve behandeling. Na de bevruchting hecht de humane blastocyst zich aan de baarmoederwand. De binnenste celmassa van de blastocyst ontwikkelt zich tot het embryo en de buitenste celmassa bestaande uit trofoblastcellen (foetale cellen) vormt de placenta. De placenta is een belangrijke speler tijdens de zwangerschap, omdat het de ontwikkelende foetus via de navelstreng verbindt met de wand van de baarmoeder om de uitwisseling van voedingsstoffen en zuurstof mogelijk te maken. Trofoblasten (extravillieuze trofoblasten, EVT) dringen diep de epitheliale laag (de decidua) en spiraal arteriën van de baarmoeder binnen, waardoor de diameter van de arteriën vergroot wordt om zo de bloedtoevoer naar het kind te vergroten en waardoor de placenta aan de baarmoederwand wordt verankerd. Verder komen hier de trofoblasten in direct contact met maternale immuuncellen, de zogenaamde maternale-foetale interface (**Hoofdstuk 1, Fig. 3**). De gecoördineerde interactie tussen trofoblasten, deciduale stromale cellen en immuuncellen van de moeder is strak gereguleerd om immuuntolerantie te handhaven en daardoor een gezonde zwangerschap te garanderen.

Niet in alle gevallen is een zwangerschap succesvol. Er wordt gesuggereerd dat een afwijkende werking van het immuunsysteem van de moeder een rol speelt bij zwangerschapscomplicaties zoals pre-eclampsie, herhaalde miskramen, vroeggeboorte en beperkingen van de foetale groei. Pre-eclampsie (zwangerschapsvergiftiging) is een zwangerschapscomplicatie gekenmerkt door hoge bloeddruk en proteïnurie (eiwit in de urine) en de incidentie ligt rond de 3-5% van de zwangerschappen. Een herhaalde miskraam wordt gedefinieerd indien er tenminste drie opeenvolgende miskramen zijn opgetreden voorafgaand aan week 20 van de zwangerschap, wat het geval is bij 1 tot 2% van alle stellen die proberen zwanger te worden. Vroeggeboorte wordt gedefinieerd als baby's die vóór 37 weken zwangerschap geboren worden. Infecties van de placenta kunnen de werking van het immuunsysteem van de moeder beïnvloeden, wat kan leiden tot complicaties. De meest voorkomende aangeboren infectie is het humaan cytomegalovirus (HCMV). HCMV sero-positieve vrouwen hebben een 1.5-voudig verhoogd risico op het ontwikkelen van pre-eclampsie. Daarnaast zijn er klinische associaties gevonden tussen bacteriële infecties en vroeggeboorte. Andere pathogenen die de trofoblasten tijdens de zwangerschap kunnen infecteren, zijn het Zika-virus (ZIKV), *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii* en het humaan immunodeficiëntievirus (HIV).

Om de immunologische component bij zwangerschapscomplicaties beter te kunnen begrijpen is het essentieel om het immuunnetwerk en de regulerende mechanismen bij de maternale-foetale interface volledig te begrijpen tijdens een gezonde zwangerschap.

Dit proefschrift

In dit proefschrift hadden we als doel om de onderliggende mechanismen van immuunregulatie en herkenning door maternale immuuncellen verder te ontrafelen, met een specifieke focus op deciduale CD4⁺ en CD8⁺ T cellen en hun interactie met EVT tijdens een gezonde zwangerschap. Bovendien wordt ingegaan op de noodzaak om enerzijds placentale tolerantie en anderzijds immuniteit tegen binnendringende pathogenen te waarborgen en hoe deze twee componenten in conflict met elkaar kunnen zijn. Immuuncellen werden geïsoleerd uit de maternale zijde van de placenta, de decidua, en uit het perifere bloed van zwangere vrouwen op het moment van bevallen. Cellen die ervoor zorgen dat een immuunrespons wordt gereguleerd en niet uit de hand loopt, waardoor auto-immuunziekten worden voorkomen, worden regulatoire T cellen (Treg) genoemd. Regulatoire T cellen spelen een belangrijke rol bij het handhaven van de tolerantie tijdens de zwangerschap. In **Hoofdstuk 2** hebben we de aanwezigheid van drie subtypen van CD4⁺ Treg in de maternale-foetale interface geïdentificeerd die effector T cel reacties kunnen onderdrukken. Deze Treg kunnen worden geïnduceerd door EVT en deciduale macrofagen.

Wanneer CD8⁺ T cellen worden geactiveerd door vreemde antigenen, beginnen ze zich te vermenigvuldigen en te differentiëren tot cytotoxische effector cellen. De meerderheid van de CD8⁺ T cellen in de maternale-foetale interface zijn effector-geheugen T cellen die een gemengd profiel van activatie en disfunctie vertonen waardoor ze zowel tolerantie als immuniteit kunnen bieden (**Hoofdstuk 3**). Studies hebben aangetoond dat deze CD8⁺ T cellen niet alleen de foetus kunnen herkennen, maar dat sommige van deze cellen virus-specifiek zijn om de foetus te beschermen tegen binnendringende virussen. Bij gezonde personen kan een aanzienlijk deel van de virus-specifieke CD8⁺ T cellen het virale peptide herkennen dat wordt gepresenteerd in een HLA-molecuul dat ze aanvankelijk heeft geactiveerd en daarnaast ook een reactie tegen allogene (vreemde) HLA-moleculen genereren. Dit fenomeen wordt heterologe immuniteit genoemd en we beschrijven het als dezelfde TCR die kan 'kruis-reageren' met verschillende peptide-HLA-complexen (**Hoofdstuk 1, Fig. 2B**). In een transplantatie setting kunnen de virus-specifieke T cellen van de ontvanger virus-geïnfecteerde cellen aanvallen en tegelijkertijd een reactie genereren tegen de allogene HLA-moleculen die op de donorcellen tot expressie worden gebracht. Evenzo zouden tijdens de zwangerschap deciduale virus-specifieke CD8⁺ T cellen in staat kunnen zijn om de vaderlijke allogene HLA-moleculen die op de trofoblasten tot expressie worden gebracht aan te vallen, wat mogelijk tot schadelijke gevolgen voor de zwangerschapsuitkomst zou kunnen leiden. In **Hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of virus-specifieke CD8⁺ T cellen kunnen kruis-reageren tegen allo-HLA-C, het enige polymorfe HLA-molecuul dat tot expressie wordt gebracht door trofoblasten. Onze resultaten toonden aan dat kruis-reactiviteit tegen allo-HLA-C mogelijk is en verder onderzoek is nodig om te bepalen of deze kruis-reactiviteit zou kunnen leiden tot zwangerschapscomplicaties.

Zoals vermeld, moet er tijdens de zwangerschap een goed evenwicht bestaan voor het immuunsysteem van de moeder tussen het bieden van tolerantie tegen de semi-allogene foetus, en tegelijkertijd het beschermen van moeder en baby tegen infecties van de placenta. HLA-C dat tot expressie wordt gebracht door EVT speelt hierbij een belangrijke rol, gezien zowel de deciduale NK cellen als de CD8+ T cellen interacties kunnen aangaan met HLA-C. Een samenvatting van het onderzoek dat is uitgevoerd door andere onderzoeksgroepen naar de regulatie van deciduale NK cellen en CD8+ T cellen in de maternale-foetale interface wordt gegeven in **Hoofdstuk 5**.

Het eerste deel van dit proefschrift richt zich op het isoleren van specifieke deciduale T cel subsets en het uitvoeren van functionele testen met deze cel subsets in een laboratorium setting. In het tweede deel hebben we een relatief nieuwe techniek toegepast, massa cytometrie, om een overzicht te krijgen van alle immuuncellen die aanwezig zijn in de maternale-foetale interface gedurende de drie trimesters van zwangerschap (**Hoofdstuk 7**). Om de identiteit van immuuncellen te bepalen, was de meest gangbare techniek tot voor kort flow cytometrie. Met deze techniek kunnen verschillende celtypen van elkaar worden onderscheiden door antilichamen toe te voegen die binden aan specifieke eiwitten op het celmembraan van de cellen. Elk antilichaam is gekoppeld aan een fluorochroom (lichtgevend molecuul) dat kan worden gedetecteerd door een flow cytometer. Massa cytometrie (CyTOF) is gebaseerd op flow cytometrie, maar de antilichamen zijn gekoppeld aan metalen in plaats van fluorochromen. Door een massa cytometer te gebruiken, kunnen we meten welke metalen door welke cellen zijn gebonden en daarmee verschillende celtypen identificeren. CyTOF stelt ons in staat om veel meer celoppervlakte eiwitten te bepalen in vergelijking met flow cytometrie en geeft ons daardoor beter inzicht in de heterogeniteit binnen het immuunsysteem. Door massa cytometrie toe te passen op het analyseren van deciduale immuuncellen hebben we een 'immuunatlas' gecreëerd voor gezonde zwangerschappen die als basis gebruikt kan worden voor het begrijpen van zwangerschapscomplicaties.

Studies met massa cytometrie genereren veel 'big' data en kwaliteitscontrole maatregelen, zoals uitgevoerd in **Hoofdstuk 6** tezamen met recent beschreven toepassingen, moeten worden opgenomen in de workflow van studies met massa cytometrie om betrouwbare en reproduceerbare data analyses te verzekeren.

Er is veel onderzoek verricht op het gebied van de reproductieve immunologie om een beter begrip te krijgen van de tolerantie mechanismen bij gezonde zwangerschappen en daarbij wat er mis kan gaan bij gecompliceerde zwangerschappen. We zijn er echter nog niet. Voor de toekomst moeten alle afzonderlijke delen die tot nu toe zijn bestudeerd, worden samengevoegd om het complexe, dynamische placenta systeem tijdens de zwangerschap te begrijpen, dat niet alleen betrekking heeft op het maternale immuunsysteem zoals beschreven in dit proefschrift, maar ook op de trofoblastinvasie, de rol

van hormonen, een potentieel microbioom en de invloed van pathogenen (**Hoofdstuk 8**). Samenwerking tussen multi-disciplinaire teams en verschillende onderzoeksvelden is vereist in toekomstige uitdagingen om te ontrafelen welke parameters de placentale micro-omgeving doen ontsporen om zo diagnostische markers te identificeren die zullen helpen bij de ontwikkeling van nieuwe diagnostische hulpmiddelen en therapieën om zwangerschaps- complicaties te behandelen.