



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Monitoring the immune responses to vaccination and pertussis: bordetella pertussis and beyond**

Diks, A.M.

### **Citation**

Diks, A. M. (2022, December 21). *Monitoring the immune responses to vaccination and pertussis: bordetella pertussis and beyond*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3503582>

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/1887/3503582>

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

### Samenvatting

Ons immuunsysteem bestaat uit verschillende onderdelen, die elk een eigen belangrijke rol spelen in de bescherming van ons lichaam tegen pathogenen (bacteriën, virussen, schimmels, etc.) en tegen weefselschade. In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift leg ik uit hoe het immuunsysteem werkt. Daarnaast leg ik uit hoe het monitoren van het immuunsysteem ('immuunmonitoring') waardevolle informatie kan leveren over de immunestatus van een individu of van een groep. Immunmonitoring kan informatie geven over het immuunsysteem wanneer het in balans is, of juist wanneer een afweerreactie bezig is. Dit is bijvoorbeeld na het ontvangen van een vaccinatie. Als je het immuunsysteem na een vaccinatie bestudeert, kan dit informatie geven over het gebruikte middel (de efficiëntie) en over het functioneren van het immuunsysteem van de individu of de groep. Het belang van immunmonitoring wordt algemeen erkend en er wordt vanuit verschillende hoeken gewerkt aan het "harmoniseren" of bij voorkeur "standaardiseren" van de laboratoriumprotocollen die worden gebruikt voor immunmonitoring studies.

Wanneer een klinische studie op meerdere locaties plaatsvindt, is het erg belangrijk dat er vooraf een zorgvuldige standaardisatie tussen deze locaties wordt verkregen. Dit zorgt ervoor dat de geproduceerde data betrouwbaarder zijn en niet worden beïnvloed door gebruik van verschillende (locatie-gebonden) laboratoriumprotocollen. Daarom behandel ik in dit proefschrift eerst het effect van verschillende factoren in het verwerkingsproces (bijv. het pre- en post-analytische proces) op de kwaliteit van de bloedmonsters, die worden gebruikt voor bijvoorbeeld immunfenotypering. In **hoofdstuk 2.1** hebben we onderzocht hoe de gemeten aantallen en de verdeling van de bloedcellen kunnen worden beïnvloed door: (1) vertraging van het verwerken van het bloedmonster, (2) vertraging van het meten van een verwerkt bloedmonster op de flowcytometer, (3) de temperatuur waarop het bloedmonster wordt bewaard, (4) het gebruik van fixerende middelen om het bloedmonster langer houdbaar te maken. Op basis van onze onderzoeksresultaten hebben wij richtlijnen kunnen opstellen. Deze richtlijnen verbeteren de betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid van data betreffende de gemeten aantallen en de verdeling van bloedcellen.

Data-analyse is een post-analytische procedure waar standaardisatie ook nodig is. Daarom onderzochten wij in **hoofdstuk 2.2** het effect van vertraagde verwerking van bloedmonsters op de kwaliteit van automatische (= door een database aangestuurde) analyse. We zagen dat, wanneer het aankomt op reproduceerbaarheid en robuustheid, een automatische analyse superieur is aan een handmatige analyse. Desalniettemin is een (handmatige) check door een expert nog altijd nodig wanneer de aantallen van de verschillende afweercellen, de rijping van de verschillende afweercellen, of de expressie van celkenmerken buiten de normale waarden valt.

De kennis verzameld in **hoofdstuk 2** is vervolgens gebruikt in meerdere klinische studies waarin we de cellulaire afweerreacties na een gecontroleerde infectie

met *Bordetella (B.) pertussis* (= de kinkhoest bacterie) of na vaccinatie tegen *B. pertussis* (= de kinkhoestvaccinatie) bestudeerden. De hier besproken klinische studies zijn opgezet in het LUMC of binnen het IMI-2 PERISCOPE consortium. De belangrijkste uitkomsten van deze studies zijn samengevat in hoofdstuk 3 van dit proefschrift.

In **hoofdstuk 3.1** hebben we onderzocht hoe de kinetiek van meer dan 250 verschillende soorten afweercellen in ons bloed veranderen na het toedienen van een niet-cellulair kinkhoest vaccin (aP vaccin; bevat slechts drie specifieke eiwitten van de kinkhoestbacterie). Op verschillende momenten na de vaccinatie zagen we consistente veranderingen in de kinetiek van de afweercellen. De toename en uitrijping van het aantal (IgG1) plasmacellen (= antistof-producerende afweercellen) op dag 7 na vaccinatie was de meest consistente en duidelijke verandering. Vervolgens hebben wij ons in **hoofdstuk 3.2** vooral gericht op de veranderingen in het B-cel gedeelte van het immuunsysteem. Hier keken we naar de veranderingen in het immuunsysteem na toediening van een vaccin binnen verschillende leeftijdsgroepen. Zij verschilden zodanig in leeftijd dat ze als baby verschillende kinkhoestvaccins hebben gekregen (de zogenoemde vaccinatie-achtergrond). Opnieuw zagen we dat de uitrijping van IgG1 plasmacellen en de toename in aantallen plasmacellen de meest duidelijke veranderingen waren. Dit vonden we in elke groep, ongeacht de leeftijd of vaccinatie-achtergrond. Naast de IgG1 respons zagen we wel andere specifieke verschillen tussen mensen met een bepaalde leeftijd of vaccinatie-achtergrond; volwassenen hadden een gemengde IgG1-IgG3 én IgA1 plasmacel-respons, terwijl kinderen en adolescenten een gemengde IgG1-IgG3 en IgG4 plasmacel-respons hadden. Ook hadden mensen die als baby gevaccineerd waren met het cellulair vaccin (wP; vaccin met de complete dode bacterie) een sterkere toename in het aantal plasmacellen vergeleken met mensen die het niet-cellulaire vaccin (aP) als baby hadden ontvangen. Dit kan erop duiden dat vaccinatie met het oude (cellulaire) vaccin een betere antistofproductie heeft opgewekt, of dat de oudere mensen vaker contact hebben gehad met de kinkhoest bacterie, bijvoorbeeld doordat ze een lichte infectie hebben gehad. Hierdoor worden er óók IgA antistoffen gemaakt; deze zijn erg belangrijk voor de afweer in de slijmvliezen. De slijmvliezen (bijv. de luchtwegen) zijn nou precies de plekken waar de kinkhoestbacterie probeert het lichaam binnen te komen. Tenslotte vonden we in dit onderzoek dat de resultaten van de flowcytometrie experimenten overeenkwamen met die van de ELISpot experimenten (= kweekexperimenten). Deze technieken geven dus aanvullende informatie over dezelfde personen.

De flowcytometrie resultaten kunnen ook worden uitgebreid door andere technieken dan ELISpot of serologische antistofbepalingen, bijvoorbeeld door meer verkennende RNA technieken te gebruiken om de grote mate van diversiteit van de antistoffen te onderzoeken. Dit noemen we ook wel B-cel receptor (BCR) repertoire-analyse. De BCR zit vast aan de buitenkant van het celoppervlak van de B cel, maar kan ook worden uitgescheiden door de B cel. Wanneer de BCR uitgescheiden is, noemen wij de BCR een antistof. Dit hebben wij gedaan in **hoofdstuk 3.3**. We onderzochten het BCR-repertoire en de klonale relaties tus-

## Samenvatting

---

sen plasmacellen geïsoleerd op verschillende momenten na vaccinatie. Dit deden wij door middel van de zogenoemde ‘single-cell sequencing’ techniek. Het BCR-repertoire van plasmacellen geïsoleerd op 5, 7, 10 en 14 dagen na vaccinatie verschilden van de plasmacellen geïsoleerd op dag 0 (dus vóór de vaccinatie). De verschillen waren vooral zichtbaar in het gebruik van de IgG1 zware keten (= een onderdeel van de BCR), de hoeveelheid ‘class-switching events’ (= het veranderen van antistof-functie), en de positieve selectie in de CDR3 regio over tijd (= het veranderen van de vorm van de grijp-arm van de antistof door mutaties in het DNA te introduceren. Dit heeft als doel om BCRs met verschillende beschermingsgraden te maken en de beste BCRs te selecteren). In dit hoofdstuk zagen we dat de verdeling binnen de plasmacel populaties zoals bepaald met flow cytometrie overeenkwam met die zoals bepaald met single-cell sequencing. Tenslotte hebben we in dit hoofdstuk bioinformatica toegepast om een zogenoemde ‘query tool’ te ontwerpen; deze bioinformatica-techniek helpt bij het zoeken naar BCRs die specifiek zijn gericht tegen onderdelen van het niet-cellulaire pertussis vaccin.

Verschillende celpopulaties en tijdstippen kunnen belangrijk zijn in verschillende studiemodellen. Daarom vergeleken we in **hoofdstuk 3.4** de kinetiek van verschillende celpopulaties (uit het aangeboren en aangeleerde immuunsysteem) na het ontvangen van een vaccin tegen *B. pertussis* of na een infectie met *B. pertussis* (onder gecontroleerde omstandigheden). Vergeleken met de respons na vaccinatie, was de toename en uitrijping van plasmacellen vertraagd en minder uitgesproken. De toename en uitrijping van plasmacellen werd wel in meer verschillende antistof-subgroepen (isotypen) gevonden dan het geval was na vaccinatie.

Met de data uit **hoofdstuk 3** hebben we bepaald welke tijdstippen en welke celpopulaties informatief kunnen zijn om te monitoren in toekomstige vaccinatie-/ infectiestudies. Ook keken we naar de cel kinetiek die geassocieerd werd met bescherming tegen kolonisatie na een infectie met *B. pertussis*. Hieronder vielen de vroege toename in het aantal (CD36-) niet-klasseke monocyten (dag 1), van de ‘Natural Killer’ cellen (dag 3), de ‘follicular helper T cellen’ (dag 1-3) en de plasmacellen (dag 3). Vanwege die associaties zijn deze afweercelpopulaties mogelijk interessant voor toekomstige monitoring studies.

De resultaten van deze studies benadrukken het belang van pilot-studies, bijvoorbeeld om de juiste tijdstippen of celpopulaties vast te stellen. Verder laat dit onderzoek zien dat er verschillen bestaan in immuunrespons na een infectie of vaccinatie. De huidige kinkhoestvaccins beschermen ons niet goed tegen de aanwezigheid van de kinkhoestbacterie op onze slijmvliezen (= kolonisatie) en daarmee ook minder goed tegen overdracht/verspreiding van de bacterie. Als we beter begrijpen hoe de bescherming tegen bacteriële kolonisatie tot stand komt, kunnen we deze informatie misschien gebruiken om betere vaccins tegen kinkhoest te ontwikkelen.

In **hoofdstuk 4** gebruikten we immuunmonitoring om het immuunsysteem te

bekijken terwijl het in balans is. We bestudeerden de aantallen en de verdeling van afweercellen in het bloed bij een groep mensen die een speciale genetische variant in het *PLCG2* gen bij zich dragen (de variant heet p.P522R), en vergeleken dit met mensen die deze variant niet hebben. *PLCG2* draagt de genetische code voor het eiwit PLC $\gamma$ 2. De p.P522R variant-eiwit wordt geassocieerd met gezond oud worden, zowel geestelijk als lichamelijk. Hoewel we weten dat het PLC $\gamma$ 2 eiwit in afweercellen betrokken is bij het doorgeven van signalen, zodra een BCR of een Fc-receptor wordt geactiveerd, weten we niet veel van de invloed die het p.P522R variant-eiwit heeft op het afweersysteem. Daarom onderzochten we hoe dit variant-eiwit de aantallen en het functioneren van afweercellen in (oudere) volwassenen beïnvloedt. Hierbij maakten we ook gebruik van cel-stimulaties in het laboratorium. Daarnaast bestudeerden we de antistofreactie tegen COVID-vaccinatie in deze groep (oudere) volwassenen; dus hier keken we weer naar het afweersysteem in actie. Hoewel we geen verschillen zagen in respons tegen COVID-vaccinatie bij mensen die de p.P522R variant wel of niet bij zich droegen, zagen we wel dat mensen met de p.P522R variant minder immunologische veroudering leken te hebben ten opzichte van leeftijdsgenoten die de variant niet hadden.

Dus: in dit proefschrift heb ik pre- en post-analytische procedures die belangrijk zijn voor de reproduceerbaarheid van klinische studies geëvalueerd, en heb ik deze toegepast voor monitoring van het immuunsysteem. Hierbij keek ik zowel naar het immuunsysteem in actie (vaccinatie tegen en blootstelling aan *B. pertussis*) en naar het immuunsysteem in balans (om de genetische variant *PLCG2* p.P522R te bestuderen). Hierbij heb ik (1) richtlijnen opgesteld voor het verwerken van (bloed)monsters in klinische studies, (2) de verschillende immunoreacties van het lichaam na vaccinatie tegen *B. pertussis* of infectie met *B. pertussis* bestudeerd, en (3) de mogelijke implicaties van het dragen van genetische variant *PLCG2* p.P522R op het humane immuun systeem beschreven. In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift – **hoofdstuk 5**– bediscussieer ik de potentiële implicaties van deze bevindingen. Ook geef ik aan wat ik denk dat de volgende stappen zouden kunnen zijn in de ontwikkeling en/of verbetering van kinkhoest vaccins en in het verder ontrafelen van de gevolgen van *PLCG2* p.P522R op het immuunsysteem en de mogelijkheid om dit als een therapeutisch doelwit te gebruiken.