



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Visualization of the maternal immune system at the maternal-fetal interface

Krop, J.

Citation

Krop, J. (2023, September 6). *Visualization of the maternal immune system at the maternal-fetal interface*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3638824>

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/1887/3638824>

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

9

**NEDERLANDSE SAMENVATTING
LIST OF PUBLICATIONS
ACKNOWLEDGEMENTS
ABOUT THE AUTHOR**

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Algemene introductie

Zwangerschap is een bijzonder proces waarbij één cel een volledig mens wordt. Uit diezelfde cel groeit naast een kindje ook de placenta, een uniek en essentieel orgaan dat één wordt met maternale cellen. Tijdens de zwangerschap kunnen immuuncellen zelfs van de moeder naar de foetus en vice versa reizen; dit proces wordt microchimerisme genoemd. In elke andere omstandigheid zijn cellen van verschillende individuen niet te combineren zonder een afstotingsreactie teweeg te brengen en is immuun onderdrukkende medicatie nodig zoals bij transplantatie. Het immuunsysteem bij zwangere vrouwen is echter wel functioneel: in geval van een infectie worden de ziekteverwekkers in principe gewoon opgeruimd. Het feit dat de lichaamsvreemde cellen van het kind niet afgestoten worden, wordt ook wel de immunologische paradox van zwangerschap genoemd. Het is nog steeds niet duidelijk wat er precies gebeurt met het immuunsysteem van de moeder tijdens de zwangerschap.

Veranderingen van het immuunsysteem zijn er wel degelijk, en in dit proefschrift hebben we de immunologische veranderingen tijdens gezonde en gecompliceerde zwangerschappen bestudeerd.

De algemene hypothese is dat onvoldoende aanpassingen van het maternale immuunsysteem tijdens zwangerschap kunnen leiden tot problemen met het functioneren van de placenta. Aangezien de belangrijkste functie van de placenta het leveren van zuurstof en voedingsstoffen aan de zich ontwikkelende foetus is, kan een onderontwikkeling van de placenta leiden tot complicaties tijdens de zwangerschap zoals miskraam of beperkte groei van de foetus.

Humaan leukocyten antigeen (HLA)

Alle kern-houdende cellen van het lichaam en bloedplaatjes brengen HLA klasse I tot expressie, terwijl HLA klasse II enkel gevonden wordt op antigeen presenterende cellen (APC), geactiveerde T-cellen en geactiveerde endotheelcellen. De functie van HLA moleculen is waarschuwen dat er een infectie gaande is, door kleine stukken van eiwitten -peptiden- te presenteren aan T-cellen van het immuunsysteem. HLA klasse I kan peptiden die afkomstig zijn van intracellulaire eiwitten presenteren aan CD8+ T-cellen, terwijl HLA klasse II peptiden afkomstig van lichaamseigen eiwitten en lichaamsvreemde eiwitten uit het extracellulaire milieu kan opnemen, verwerken en presenteren aan CD4+ T-cellen. In normale omstandigheden zijn de gepresenteerde peptiden afkomstig van lichaamseigen eiwitten en geven geen aanleiding tot een immuunrespons. In het geval van een virale infectie of maligniteit zijn deze peptiden echter afkomstig van niet-eigen of tumor-specifieke eiwitten en worden ze als vreemd herkend. Hetzelfde kan gebeuren bij zwangerschap waarbij peptiden afkomstig van foetale HLA antigenen gepresenteerd kunnen worden in HLA moleculen van de moeder (indirecte herkenning), of het van de vader geërfd HLA eiwit als intact molecuul als lichaamsvreemd wordt herkend (directe herkenning). De twee types HLA moleculen kunnen onderverdeeld worden in verschillende groepen. HLA klasse I omvat de polymorfe HLA-A, -B en -C en de niet-polymorfe HLA-E, -F en G moleculen. HLA klasse II bestaat uit HLA-DR-, -DQ- en -DP-moleculen. HLA wordt co-dominant tot expressie gebracht en wordt overgeërfd als haplotypes,

waarbij één set genen (inclusief alle klasse I- en klasse II-moleculen) van moeder en één set genen van vader op de cellen van het kind tot expressie komen.

Contact tussen moeder en kind

Door de jaren heen zijn veel functies van de verschillende cellen in de placenta omschreven, maar het is nog steeds niet duidelijk hoe die cellen samenwerken om een gezonde zwangerschap tot stand te laten komen. Het is belangrijk om te weten dat er verschillende locaties van interacties zijn tussen maternale immuuncellen en foetale cellen. Het bloed dat door de placenta stroomt en de daarin aanwezige immuuncellen komen in contact met syncytiotrofoblast (SCT) cellen. De andere locatie waar interactie optreedt tussen immuuncellen en placentale cellen is de decidua: dit is de locatie waar de placenta en het chorionmembraan contact hebben met de uterine mucosa. Hier hebben de maternale immuuncellen contact met extravilleuze trofoblsten (EVT) en fibroblasten van foetale origine (**Hoofdstuk 1, Figuur 1 en 2**). In principe brengt SCT geen HLA eiwitten tot expressie en kan dus ook niet herkend worden als lichaamsvreemd door het maternale immuunsysteem. De EVT brengen wel HLA moleculen tot expressie en kunnen wel degelijk worden herkend door het maternale immuunsysteem. EVT brengen enkel HLA-C, -E, -F en -G tot expressie, maar niet de polymorfe HLA-A en HLA-B, of klasse II moleculen. Het is beschreven dat HLA-G immuun tolerantie kan induceren. Dit fenomeen is omschreven in **hoofdstuk 3**, waarin de immuun regulatie door middel van regulatorie T-cellen (Tregs) wordt beschreven. EVT hebben een belangrijke rol bij het ontwikkelen van een gezonde placenta en dit proces wordt ondersteund door immuuncellen. NK cellen en macrofagen spelen hierbij een belangrijke rol (**Hoofdstuk 8, Figuur 1A**). Zowel NK cellen als macrofagen produceren stoffen die belangrijk zijn voor hervorming van de maternale spiraal-arteriën. Daarnaast kunnen macrofagen beschadigde en dode cellen opruimen, wat essentieel is in een snel ontwikkelend orgaan als de placenta. Ook kunnen macrofagen als APC dienen in geval van een infectie.

Naast NK cellen en macrofagen zijn Tregs essentieel voor een gezonde zwangerschap. In zwangere muizen waarbij de Tregs experimenteel verwijderd zijn gaat een hoog percentage embryo's verloren. Eveneens is bij vrouwen met herhaald zwangerschapsverlies vastgesteld dat ze verlaagde Treg percentages hebben in vergelijking met vrouwen die een gezonde zwangerschap hebben doorgemaakt. Mogelijk zijn Tregs nodig als tegenbalans om na de benodigde activatie van het immuunsysteem voor de ontwikkeling van de placenta en verdediging tegen infecties herstel van homeostase te bewerkstelligen.

Wat op dit moment bekend is van de mogelijke functies van maternale immuuncellen in de placenta is wellicht nog maar het topje van de ijsberg. Vele cellen kunnen meerdere functies uitoefenen, afhankelijk van de signalen die zij op dat moment krijgen en de locatie waar ze zich bevinden. Dit kunnen zowel signalen zijn die ze van cel-cel contact krijgen, maar ook van oplosbare factoren. Meer informatie over de rol van de cellen in de placenta kan helpen bij de zoektocht naar de oorzaak en mogelijke behandeling van zwangerschapscomplicaties.

Het hoofddoel van dit proefschrift was het onderzoeken van de rol van het maternale immuunsysteem bij het in stand houden van een gezonde zwangerschap. Dit hebben we onder

andere gedaan door veel verschillende immuuncellen tegelijk in beeld te brengen met gebruik van de geavanceerde technologie van cytometrie (CyTOF) waarbij elke individuele cel gelijktijdig bestudeerd kan worden. Hierbij kan in beeld worden gebracht welke immunologische aanpassingen gepaard gaan met het behoud van een gezonde zwangerschap. Wij hebben zowel gezonde zwangerschappen (**hoofdstuk 2**) als zwangerschappen met ongunstige uitkomst (**hoofdstuk 4 tot 7**) bestudeerd.

Resultaten en discussie

Onverklaarbare herhaald zwangerschapsverlies (uRPL)

Onverklaarde herhaald zwangerschapsverlies (uRPL) is een situatie waarbij een vrouw een afbraak van twee of meer zwangerschappen voor de 24 weken draagtijd doormaakt zonder verklaarbare reden. Dit overkomt ongeveer 2% van de koppels.

Uit een eerdere studie van Craenmehr et al (*IJMS, 2019*) bleek dat HLA-G expressie in de decidua bij vrouwen met uRPL hoger was bij vrouwen met een succesvolle zwangerschap na uRPL, in vergelijking met vrouwen die een succesvolle zwangerschap hadden zonder voorgeschiedenis van uRPL (controles). Het doel van **hoofdstuk 5** in dit proefschrift was om te bepalen of de resultaten van Craenmehr et al te vertalen zijn naar oplosbare (s)HLA-G concentraties in het perifere bloed. Daarnaast bestudeerden wij bloed tijdens het eerste trimester van zwangerschap van vrouwen met een geschiedenis van uRPL om te bepalen of sHLA-G concentratie een indicator kan zijn voor zwangerschapsuitkomst. sHLA-G concentraties in het perifere bloed van vrouwen met een succesvolle zwangerschap na uRPL bleken vergelijkbaar met die van controles. Ook vonden we geen verschil in bloedconcentraties van sHLA-G tijdens eerste trimester tussen vrouwen met een doorgaande zwangerschap na uRPL en vrouwen met zwangerschapsverlies na uRPL. Dit is een indicatie dat het systemische immuunsysteem niet een directe afspiegeling is van het lokale immuunsysteem in weefsel. Onderzoek naar een biomarker in alternatieve biomaterialen zou hierbij een uitkomst kunnen bieden, bijvoorbeeld onderzoek naar immuunmarkers in een uitstrijkje of menstrueel bloed voorafgaand aan de zwangerschap.

Eerdere studies toonden aan dat vrouwen met uRPL lagere Treg-frequenties hebben in de decidua en minder functionele Tregs in vergelijking met controles. Het is echter niet duidelijk of Treg frequentie of functionaliteit verandert op het moment dat vrouwen met een uRPL voorgeschiedenis wel een doorgaande zwangerschap doormaken. Om dit te bestuderen hebben we in **hoofdstuk 4** een suspensie CyTOF panel samengesteld om gelijktijdig de frequenties en het fenotype van de Tregs te bepalen in de decidua van een doorgaande zwangerschap na uRPL in vergelijking met een controlegroep. We zagen minimale verschillen tussen de groepen, zowel in frequenties als in fenotypes. Echter, één specifieke Treg subset was wat betreft frequentie in mindere mate aanwezig in de uRPL groep. Mogelijk vertegenwoordigt deze subset een groep Tregs met een specifieke functionele capaciteit. Om deze veronderstelling te bevestigen zouden functionele testen moeten worden gedaan. De resultaten van deze studie suggereren dat op zijn minst vergelijkbare Treg-niveaus als in gezonde zwangerschap nodig zijn voor een succesvolle zwangerschap bij vrouwen met een voorgeschiedenis van uRPL.

Tregs kunnen receptoren voor HLA-G tot expressie brengen, één daarvan is ILT2. Verdere analyse van de data uit **hoofdstuk 4 (hoofdstuk 8)** toont aan dat ILT2-markerexpressie aanwezig is op slechts 0,1-0,5% van de deciduale CD4+ T-cellen en niet op FoxP3+ Tregs. Verder onderzoek is nodig om meer inzicht te krijgen in de rol van HLA-G bij het reguleren van immuuntolerantie tijdens de zwangerschap. Het uitvoeren van in vitro experimenten zou kunnen helpen bij het ontrafelen van de functionele eigenschappen van deze cellen en bij het achterhalen op wat voor manier HLA-G de immuunrespons kan beïnvloeden.

Chronische histiocytische intervillostis (CHI)

Chronische histiocytische intervillostis (CHI) is een zeldzame aandoening die zich tijdens de zwangerschap kan voordoen en die in de meeste gevallen leidt tot zwangerschapsverlies of vroeggeboorten. De oorzaak van CHI is niet bekend en er is momenteel geen marker beschikbaar die CHI op een vroeg moment tijdens de zwangerschap kan vaststellen. De diagnose kan pas na de geboorte worden gesteld door middel van pathologie-onderzoek op de placenta. Tevens is er geen consensus en wetenschappelijke onderbouwing voor de beste behandelmethode. Meer informatie over de oorzaak van CHI en wat er in de placenta gebeurt tijdens CHI is nodig om een gerichte behandelmethode te kunnen ontwikkelen.

In **hoofdstuk 6** identificeerden we bij drie dizygote tweelingen éénzijdige CHI: met andere woorden één van de tweelingen had een aangedane placenta en de ander niet. Dit suggereert dat naast een rol voor het maternale immuunsysteem de foetus ook een significante rol kan spelen bij de oorzaak van CHI. In **hoofdstuk 7** zijn we dieper ingegaan op het maternale immuunsysteem in de placenta's bij de dizygotische tweelingen. Door gebruik te maken van imaging CyTOF hebben we de macrofagen van de CHI-aangedane- en niet-aangedane tweeling met elkaar kunnen vergelijken. Hierbij ontdekten wij een uniek fenotype van CD68+HLA-DR+CD38+ macrofagen in de intervillieuze ruimte.

Het is onduidelijk of deze cellen de schade aan de placenta veroorzaken of verergeren, of juist aanwezig zijn om de ontsteking te bestrijden en/of schade in de placenta te herstellen. Met het vaststellen van het fenotype is het mogelijk om deze cellen in toekomstige studies te isoleren en hun functie te onderzoeken.

Macrofagen in zwangerschap

Veel onderzoeken waarbij deciduale macrofagen bestudeerd worden richten zich allereerst op isolatie van de macrofagen uit het weefsel. Echter, een belangrijke beperking bij deze benadering is dat macrofagen bij weefseldigestie achter kunnen blijven in het weefsel, sneller dood gaan en een instabiel fenotype hebben. Bij Imaging CyTOF is geen weefseldigestie nodig en het is daarom een goede techniek om op hoge resolutie en op betrouwbare manier de macrofagen in de decidua te bestuderen in de weefsel context. In **hoofdstuk 2** laten we ten eerste zien dat er meer macrofagen in de decidua aanwezig zijn dan voorheen werd gedacht. Daarnaast hebben we het fenotype van deciduale macrofagen en hun interacties met andere cellen tijdens eerste, tweede en derde trimester vergeleken.

De meest prominente macrofaagtypes (dMØ1 en dMØ4) in de decidua tijdens het eerste trimester co-lokaliseerden met foetale EVT en deciduale natural killer-1 (dNK1) cellen. Deze macrofagen brengen geen HLA-DR tot expressie, een molecuul dat normaliter nodig is voor activering van CD4+ T-cellen. Het gebrek aan CD4+ T-cel activeringssignalen kan mogelijk de reden zijn voor het lage aantal deciduale T-cellen in het vroege stadium van de zwangerschap. Macrofagen zijn eerder gevonden in de vaatwand tijdens de hervorming van spiraalarteriën en in interactie met dNK-cellen. De diversiteit aan fenotypes van macrofagen was echter niet eerder zo gedetailleerd gespecificeerd als in **hoofdstuk 2**, waardoor het voorheen moeilijk was om hun rol nauwkeuriger te bestuderen. Nu hun fenotype bekend is kunnen betere in-vitro modellen worden ontworpen om de rol van macrofagen bij de afbraak van vasculaire extracellulaire matrix en ondersteuning van trofoblast-invasie te bestuderen. Wij hebben aangetoond dat gedurende de zwangerschap andere macrofaag fenotypes (of dezelfde macrofagen met een alternatieve differentiatie status) aanwezig zijn in de decidua.

Samenvattend hebben we van het werk in dit proefschrift geleerd welk fenotypen de deciduale maternale immuuncellen hebben tijdens een gezonde zwangerschap, zowel zonder als met een voorgeschiedenis van uRPL, en ook bij zwangerschappen die gecompliceerd worden door CHI. Naast het fenotype is er meer informatie vergaard over welke interacties de cellen aan kunnen gaan, wat gezamenlijk een belangrijke basis vormt om goed onderbouwde in-vitro experimenten op te zetten. Deze in-vitro experimenten zijn essentieel om met zekerheid te bepalen wat de functie van de cellen is, en op grond hiervan markers te bepalen die een indicatie geven van klinische uitkomst en mogelijke interventies te ontwikkelen.

