

Natural killer cell profiling in women with recurrent pregnancy loss

Citation for published version (APA):

Habets, D. (2022). *Natural killer cell profiling in women with recurrent pregnancy loss*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20220915dh>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20220915dh](https://doi.org/10.26481/dis.20220915dh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Having a positive pregnancy test is for most couples an overwhelming feeling of joy and happiness, yet for some it causes fear and anxiousness when previous pregnancies are lost recurrently. Recurrent Pregnancy Loss, in short RPL, is a distressing pregnancy disorder experienced by 1-3% of couples trying to conceive. Despite extensive clinical investigations of underlying etiologies, still 50% of RPL cases remain unexplained. As we know that the maternal immune system is of great importance for acceptance of a semi-allogenic fetus, after all half of the fetal genes come from the father and the products of those genes could be seen as 'foreign' by the mother's immune system, RPL might be linked to problems with the way the maternal immune system adjusts to early pregnancy. Moreover, there seems to be an important role for a special kind of immune cell, the so-called Natural Killer or NK cell. A NK cell is a type of immune cell loaded with packages containing toxic substances that can kill target cells, for example tumor cells or cells infected with a virus. Surprisingly, during early pregnancy a NK cell in the **decidua** is not a good killer but rather a good nanny that helps to provide a beneficial environment for the developing fetus and placenta.



Decidua: a thick layer of modified mucous membrane which lines the uterus during pregnancy.

Unfortunately, we do not yet know the exact role of NK cells in RPL, but it may be the case that in women with RPL these NK cells do not properly perform their function as a nanny and this leads to the loss of an early pregnancy. NK cell function is regulated by various inhibitory and activating receptors. By means of these receptors a NK cell can distinguish different signals and the combination of these signals ultimately determines the function of the NK cell. If this balance of signals is disturbed, the NK cells can no longer do their job properly. Since we are not yet sure which receptors may play an important role in RPL, it is necessary to profile NK cells in women with RPL in more detail.

This thesis is dedicated to identifying NK cells in women with RPL by means of NK cell profiles, hereby determining what the NK cell looks like based on subgroups and receptors. Understanding the immunologic pathogenesis of RPL is very much needed for providing appropriate care and knowing what is the most beneficial way of profiling NK cells, could benefit diagnosis of these women.

We first give a general introduction in **chapter 1**, for providing more insight into the clinical problem of RPL. In addition, we describe the physiology of the immune system during pregnancy, in particular how the immune system should adapt to the different trimesters of pregnancy, and we explain the importance of NK cells in early pregnancy. NK cells have multiple functions during early pregnancy and should be both tolerant acting as a nanny but still able to respond to pathogens as killers. They also play an important role in facilitating changes to the blood vessels in the uterine wall so that nutrients and oxygen can be exchanged efficiently between the mother and the growing fetus. We end with a description of the possible pathology of NK cells in RPL.

To get a better insight into what is known and also not known yet, we provide in **chapter 2** a concise overview of studies investigating NK cells profiles, measured in different tissues by different laboratory techniques in women with RPL versus controls. We found that especially NK receptors belonging to the inhibitory killer cell receptor family, and to some extent also the activating natural cytotoxicity receptor family, have been studied in the context of RPL. Studies investigating **immune checkpoint** receptors are almost completely lacking, while these receptors are known to play an important role in maintaining immunological tolerance in cancer.



Immune checkpoint: a regulator of the immune response; inhibitory immune checkpoint molecules contribute to immune tolerance and prevent the immune system from overreacting to the body's own or harmless cells, activating immune checkpoint molecules provide immune activation and are important for clearing diseased and foreign cells.

We first wondered whether timing of sampling and location of sampling are important for what the NK cell looks like, because hormones may have an influence on this and we know that NK cells in different tissues (e.g., the liver) have a different function and therefore they may also look different and be regulated differently. That is why, **chapter 3** examines the influence of the menstrual cycle on NK cell profiles in peripheral blood and investigates whether profiles are different when investigated in menstrual blood. We found that NK cell profiles based on receptor expression were comparable on the different days of the menstrual cycle, meaning that timing of sampling is not critical for analysis of individual NK receptors. Compared to NK cell profiles in peripheral blood, NK cell profiles in menstrual blood showed higher expression of some inhibitory receptors and some immune checkpoint receptors and additionally showed high levels of tissue-residency markers, hereby empowering future studies on the role of peripheral blood and menstrual blood NK cell profiles in reproductive success.

To compare NK cell profiles in women with RPL and women with a previous uncomplicated pregnancy and see if specific subgroups or receptors are associated with RPL, we set up a study of which **chapter 4** gives a description of the protocol. The so-called OVIDE study was conducted in Maastricht combining expertise from both the department of Gynecology, by setting up a specialized outpatient clinic for women with RPL, as well as the department of Transplantation Immunology, by setting up standardized operating procedures for isolation, measurement and analysis of NK cell profiles.

Results of the OVIDE study, investigating whether NK cell profiles in peripheral blood of women with RPL are different from women with a previous uncomplicated pregnancy and studying the association with the severity of RPL, are presented in **chapter 5**. We found that NK cell profiles from women with RPL showed a higher expression of the inhibitory LILRB1 receptor and the immune checkpoint receptor TACTILE and that higher expression of both was associated with the number of losses, meaning the higher the expression of these receptors the more losses the women endured, hereby identifying LILRB1 and TACTILE as NK cell receptors associated with RPL. In addition, we found a large variation in expression of the NKG2C receptor in women with RPL whose higher levels could be explained by going through an infection with the **cytomegalovirus**, hereby providing first support for the potential role of the cytomegalovirus in RPL via its impact on NK cells.



Cytomegalovirus: a common virus for people of all ages, however a healthy person's immune system usually keeps the virus from causing illness.

11

As it is known that for some receptors, their function is influenced by the presence of a **polymorphism** in the DNA, we studied the so-called p.V176F polymorphism and its relation to the activating CD16 receptor expression and Human Leukocyte Antigen or HLA antibody status in **chapter 6**. As this could have a possible influence on NK cell antibody-dependent cellular cytotoxicity, in short ADCC in women with RPL in this way allowing the NK cell to assume more of a killer function. First, we found similar frequencies of the polymorphism in women with RPL and in healthy controls. Second, we only found a higher intensity of the CD16 receptor but no differences in expression in the presence of the polymorphism. Third, no differences in frequencies of the polymorphism were detected when comparing women with or without antibodies against HLA, therefore we could not provide strong evidence for an association between the polymorphism and RPL.



Polymorphism: changes in the genetic code that cause multiple variants (alleles) of a gene to coexist in a population and create genetic differences between individuals.

In addition to studying a particular polymorphism that could be related to NK cell function, it could also be that other factors are valuable when profiling NK cells. As NK cell orchestrated **spiral artery** remodeling during early pregnancy might indirectly be influenced by maternal cardiovascular or metabolic status, we studied the additional influence of the metabolic and cardiovascular system in RPL in **chapter 7**. Although we found no major differences in preconceptional vascular or metabolic parameters between women with RPL and controls, we found in our study where we compared deviating parameters that more than 80% of women with RPL had at least one abnormal constituent of a circulatory risk profile and that 27% had at least one abnormal constituent of the metabolic syndrome. Meaning that the presence of abnormal circulatory factors prior to pregnancy, and to lesser extent of the metabolic syndrome, may predispose to RPL.



Spiral artery: small arteries whose role is to supply blood to the upper functional layer of the uterus, and play a vital role in supplying nutrients to the placenta and fetus during pregnancy.

As immune interventions which may also affect NK cells are already being offered to women with RPL even though we don't quite know how these exactly work yet, we studied the effectiveness of intravenous immune globulin, in short **IVIg** treatment on live birth rate in women with RPL and an underlying immune condition by reviewing available literature in **chapter 8**. Although we showed that treatment with IVIg was associated with a two-fold increase in live birth rate and that the effect of IVIg was particularly marked in the subgroup of studies including patients based on presence of elevated NK-cell percentage, results should be interpreted with caution. We concluded that future trials in women with RPL and underlying immune conditions are needed before using IVIg can be safely used in a clinical setting.



IVIg: a therapy made up of a large amount of antibodies (IgG) from healthy individuals which help fight infection and disease which is given intravenously and is for example used to treat various autoimmune diseases.

To address findings of this thesis within the context of recent literature and to provide suggestions for future research, we gave a general discussion in **chapter 9**. By profiling NK cells, we have described parameters associated with RPL. These parameters are very valuable for developing diagnostic markers to better identify women with RPL and an underlying immune etiology and for developing predictive markers, to see when early pregnancy is heading in the wrong direction or to see which women will respond best to a particular treatment. In addition, NK cell profiles can help us to better understand the pathology of RPL in order to develop new immune modulating strategies.

Finally, we elaborated on wider implications and the impact of this thesis in **chapter 10** and we conclude that it is important to keep looking for new causes of RPL, as 50% of all causes cannot be explained yet. This allows us to have a major influence through our immunological research on future family planning of couples dealing with RPL.

SAMENVATTING

Het hebben van een positieve zwangerschapstest is voor de meeste stellen een overweldigend gevoel van vreugde en geluk, maar voor sommigen veroorzaakt het angst en spanning wanneer eerdere zwangerschappen herhaaldelijk verloren zijn gegaan. Herhaalde miskramen, kortweg HM, is een verdrietige zwangerschapscomplicatie die wordt ervaren door 1-3% van de stellen die proberen zwanger te worden. Ondanks uitgebreid klinisch onderzoek naar onderliggende oorzaken, blijft nog steeds 50% onverklaard. Omdat we weten dat het immuunsysteem van de moeder van groot belang is voor de acceptatie van een semi-allogene foetus, immers de helft van de foetale genen komt van de vader en de producten van die genen zouden door het immuunsysteem van de moeder als 'lichaamsvreemd' gezien kunnen worden, kan HM in verband worden gebracht met problemen met de manier waarop het immuunsysteem van de moeder zich aanpast aan de vroege zwangerschap. Bovendien lijkt er een belangrijke rol te zijn weggelegd voor een speciaal soort afweercel; de zogenaamde Natural Killer of NK cel. Een NK cel is een type afweercel beladen met pakketjes met daarin toxische stoffen die andere cellen kunnen doden, bijvoorbeeld tumorcellen of cellen die zijn geïnfecteerd met een virus. Verrassend genoeg is een NK cel in de **decidua** tijdens de vroege zwangerschap geen goede moordenaar, maar eerder een goede oppas die helpt om een bevorderende omgeving te creëren voor de ontwikkelende foetus en placenta.



Decidua: een dikke laag hervormd slijmvlies dat de baarmoeder bekleedt tijdens de zwangerschap.

11

We weten jammer genoeg nog niet de exacte rol van NK cellen in HM, maar mogelijk kan het zo zijn dat in vrouwen met HM deze NK cellen niet goed hun functie als oppas uitvoeren en dit ertoe leidt dat een vroege zwangerschap verloren gaat. Het reguleren van NK cel functie gebeurt door verschillende remmende en activerende receptoren. Middels deze receptoren kan een NK cel verschillende signalen onderscheiden en de combinatie van deze signalen bepaald uiteindelijk wat de functie van de NK cel is. Mocht deze balans van signalen verstoord worden, dan kunnen de NK cellen hun werk niet meer goed doen. Gezien we nog niet zeker weten welke receptoren mogelijk een belangrijke rol spelen in HM, is het nodig om NK cellen in vrouwen met HM in meer detail in kaart te brengen.

Dit proefschrift is gewijd aan het karakteriseren van NK cellen in vrouwen met HM middels NK cel profielen, waarbij gekeken wordt hoe de NK cel eruit ziet op basis van subgroepen en receptoren. Het begrijpen van de immunologische pathogenese van HM is hard nodig om de juiste zorg te bieden en als we weten wat de meest gunstige manier is om NK cellen te karakteriseren, zou dit de diagnose van deze vrouwen ten goede kunnen komen.

In **hoofdstuk 1** geven we eerst een algemene introductie om meer inzicht te krijgen in de klinische problematiek van HM. Daarnaast beschrijven we de fysiologie van het immuunsysteem tijdens de zwangerschap, met name hoe het immuunsysteem zich dient aan te passen aan de verschillende trimesters van de zwangerschap en lichten we het belang van NK cellen in de vroege zwangerschap toe. NK cellen hebben meerdere functies tijdens de vroege zwangerschap en behoren zowel verdraagzaam te zijn als oppas, maar ook nog steeds kunnen te kunnen reageren op ziekteverwekkers als moordenaars. Tevens vervullen ze een belangrijke rol bij het faciliteren van veranderingen aan de bloedvaten in de baarmoederwand waardoor voedingsstoffen en zuurstof efficiënt uitgewisseld kunnen worden tussen de moeder en de groeiende foetus. We eindigen met een omschrijving over de mogelijke pathologie van NK cellen in HM.

Om een beter inzicht te krijgen in wat er wel en ook nog niet bekend is, geven we in **hoofdstuk 2** een beknopt overzicht van studies naar NK cel profielen, gemeten in verschillende weefsels door verschillende laboratoriumtechnieken bij vrouwen met HM versus controles. We ontdekten dat vooral receptoren die behoren tot de familie van de remmende killer cel receptoren, en tot op zekere hoogte ook de familie van activerende natuurlijke cytotoxiciteit receptoren, zijn bestudeerd in de context van HM. Studies naar **immune checkpoint** receptoren ontbreken bijna volledig, terwijl bekend is dat deze een belangrijke rol spelen bij het handhaven van immunologische tolerantie in kanker.



Immune checkpoint: een regulator van de immuunrespons; remmende immune checkpoint moleculen dragen bij aan immunologische tolerantie en voorkomen dat het immuunsysteem te sterk reageert op lichaamseigen of onschadelijke cellen, activerende immune checkpoint moleculen zorgen voor immuun activatie en zijn belangrijk voor het opruimen van zieke en ongewenste cellen.

Bij het bestuderen van NK profielen vroegen we ons eerst af of timing van afname en locatie van afname belangrijk zijn voor hoe de NK cel eruit ziet, omdat hormonen wellicht een invloed hierop kunnen hebben en we weten dat NK cellen in diverse weefsels (bijvoorbeeld de lever) een andere functie hebben en ze er daarom mogelijk ook anders uitzien en anders gereguleerd worden. Daarom wordt in **hoofdstuk 3** de invloed van de

menstruatiecyclus op NK cel profielen in perifere bloed onderzocht en wordt onderzocht of profielen anders zijn wanneer onderzocht in menstrueel bloed. We ontdekten dat NK cel profielen op basis van receptor expressie vergelijkbaar waren op de verschillende dagen van de menstruatiecyclus, wat betekent dat timing van afname niet cruciaal is voor analyse van individuele NK cel receptoren. Vergeleken met NK cel profielen in perifere bloed, vertoonden NK cel profielen in menstrueel bloed een hogere expressie van sommige remmende receptoren en sommige immune checkpoint receptoren en vertoonden deze bovendien hoge niveaus van weefsel-specifieke markers, wat toekomst biedt voor toekomstige studies naar de rol van perifere bloed en menstrueel bloed NK cel profielen in reproductief succes.

Om NK cel profielen te vergelijken in vrouwen met HM en vrouwen met een eerdere ongecompliceerde zwangerschap en te zien of specifieke subgroepen of receptoren geassocieerd zijn met HM, hebben we een studie opgezet waarvan **hoofdstuk 4** een beschrijving van het protocol geeft. Het zogenaamde OVIDE-onderzoek is uitgevoerd in Maastricht en combineert expertise van zowel de afdeling Gynaecologie, door het opzetten van een gespecialiseerde polikliniek voor vrouwen met HM, als de afdeling Transplantatie Immunologie, door het opzetten van gestandaardiseerde werkwijzen voor isolatie, meting en analyse van NK cel profielen.

Resultaten van de OVIDE studie, waarin wordt onderzocht of NK cel profielen in perifere bloed van vrouwen met HM anders zijn dan die van vrouwen met een eerdere ongecompliceerde zwangerschap en waarin de associatie met de ernst van HM wordt bestudeerd, worden gepresenteerd in **hoofdstuk 5**. We vonden dat NK cel profielen van vrouwen met HM een hogere expressie van de remmende LILRB1 receptor en de immune checkpoint receptor TACTILE vertoonden en dat hogere expressie van beide markers geassocieerd was met het aantal verliezen, wat betekent dat hoe hoger de expressie van deze receptoren, hoe meer miskramen de vrouwen in onze studie leden, waardoor LILRB1 en TACTILE werden geïdentificeerd als NK cel receptoren geassocieerd met HM. Daarnaast vonden we een grote variatie in expressie van de NKG2C receptor in vrouwen met HM waarvan de hogere niveaus verklaard konden worden door het doormaken van een infectie met het **cytomegalovirus**, waarmee we de eerste ondersteuning bieden voor de mogelijke rol van het cytomegalovirus in HM via impact op NK cellen.



Cytomegalovirus: een veelvoorkomend virus in mensen van alle leeftijden; het immuunsysteem van een gezond persoon zorgt er echter meestal voor dat het virus geen ziekte veroorzaakt.

Omdat het bekend is dat voor sommige receptoren diens functie wordt beïnvloed door de aanwezigheid van een **polymorfisme** in het DNA, hebben we in **hoofdstuk 6** het zogenaamde p.V176F-polymorfisme en de relatie met de activerende CD16 receptor expressie en humaan leukocytenantigeen of HLA antilichaam status bestudeerd. Mogelijk zou dit p.V176F-polymorfisme namelijk een invloed kunnen hebben op NK cel antilichaam-afhankelijke-cellulaire-cytotoxiciteit, kortweg ADCC bij vrouwen met HM waardoor deze NK cel meer de functie van moordenaar zou kunnen aannemen. Ten eerste vonden we vergelijkbare frequenties van het polymorfisme bij vrouwen met HM en bij gezonde controles. Ten tweede vonden we alleen een hogere intensiteit van de CD16 receptor, maar geen verschillen in expressie, in de aanwezigheid van het polymorfisme. Ten derde werden er geen verschillen in frequenties van het polymorfisme gevonden bij het vergelijken van vrouwen met of zonder antilichamen tegen HLA, waardoor we uiteindelijk geen sterk bewijs hebben kunnen leveren voor een verband tussen het polymorfisme en HM.



Polymorfisme: veranderingen in de genetische code waardoor meerdere varianten (allelen) van een gen naast elkaar voorkomen in een populatie en genetische verschillen tussen individuen ontstaan.

Naast het bestuderen van een polymorfisme dat verband zou kunnen houden met de functie van NK cellen, kan het ook zijn dat andere factoren waardevol zijn voor het karakteriseren van NK cellen. Omdat remodelering van **spiraal arteriën** gereguleerd wordt door NK cellen tijdens de vroege zwangerschap, kan maternale cardiovasculaire of metabole status mogelijk ook een vroege zwangerschap beïnvloeden en daarom hebben we de invloed van het metabole en cardiovasculaire systeem in HM in **hoofdstuk 7** bestudeerd. Hoewel we geen grote verschillen vonden in preconceptionele vasculaire of metabole parameters tussen vrouwen met HM en controles, vonden we in onze studie waarbij we afwijkende parameters vergeleken dat meer dan 80% van de vrouwen met HM ten minste één abnormale parameter van een circulatoir risicoprofiel had en dat 27% ten minste één abnormale parameter had van het metabool syndroom. Dit betekent dat de aanwezigheid van abnormale circulatoire factoren voorafgaand aan de zwangerschap, en in mindere mate van het metabool syndroom, van invloed kunnen zijn voor HM.



Spiraal arterie: kleine slagaders die de bovenste functionele laag van de baarmoeder van bloed voorzien, en die een vitale rol spelen bij het leveren van voedingsstoffen aan de placenta en de foetus tijdens de zwangerschap.

Omdat immuun interventies die mogelijk ook NK cellen beïnvloeden reeds worden aangeboden aan vrouwen met HM ondanks dat we nog niet helemaal weten hoe deze werken, hebben we de effectiviteit van intraveneuze immunoglobuline, kortweg IVIG behandeling op levendgeborenen bij vrouwen met HM en een onderliggende immuun aandoening bestudeerd in **hoofdstuk 8** door beschikbare literatuur te bestuderen. Hoewel we aantoonden dat behandeling met **IVIG** geassocieerd was met een tweevoudige toename van het aantal levendgeborenen en dat het effect van IVIG bijzonder uitgesproken was in de subgroep van onderzoeken met patiënten op basis van de aanwezigheid van een verhoogd NK cel percentage, moeten de resultaten met voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. We concludeerden dat toekomstige studies bij vrouwen met HM en onderliggende immuun aandoeningen nodig zijn voordat IVIG veilig kan worden gebruikt in een klinische setting.



IVIG: een therapie die bestaat uit een grote hoeveelheid antilichamen (IgG) van gezonde personen die infecties en ziekten helpen bestrijden, die intraveneus wordt toegediend en wordt gebruikt om bijvoorbeeld verschillende auto-immuunziekten te behandelen.

Om de bevindingen van dit proefschrift binnen de context van recente literatuur te bekijken en suggesties te doen voor toekomstig onderzoek, hebben we een algemene discussie in **hoofdstuk 9** gegeven. Door middel van het karakteriseren van NK cellen middels NK cel profielen, hebben we parameters beschreven die geassocieerd zijn met HM. Deze parameters zijn zeer waardevol voor het ontwikkelen van diagnostische markers om vrouwen met HM en een onderliggende immuun etiologie beter te karakteriseren en voor het ontwikkelen van voorspellende markers bijvoorbeeld om te zien wanneer een vroege zwangerschap de verkeerde kant op dreigt gaat of om te zien welke vrouwen het beste op een bepaalde behandeling zullen reageren. Daarnaast kunnen NK cel profielen ons helpen om de pathologie van HM beter te begrijpen om zo nieuwe immuun modulerende strategieën te ontwikkelen.

Tenslotte zijn we dieper ingegaan op bredere implicaties en de impact van dit proefschrift in **hoofdstuk 10** en concluderen we dat het belangrijk is te blijven zoeken naar nieuwe oorzaken in HM, omdat 50% van alle oorzaken nog niet verklaard kan worden. Hierdoor kunnen we middels ons immunologisch onderzoek een grote invloed hebben op toekomstige gezinsplanning van koppels die te maken hebben met HM.