

Circulating lymphocyte subsets as prognostic markers in multiple sclerosis

Citation for published version (APA):

Mimpen, M. C. (2022). *Circulating lymphocyte subsets as prognostic markers in multiple sclerosis: a first step towards systems immunology*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20221118mm>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20221118mm](https://doi.org/10.26481/dis.20221118mm)

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.



Nederlandse Samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Multiple sclerose (MS) is een auto-immuun aandoening van het centrale zenuwstelsel, oftewel de hersenen en het ruggenmerg. Door een fout in het immuunsysteem worden zenuwcellen (neuronen) en hun isolerende laag (myeline) aangevallen. Als gevolg van deze aanvallen kunnen de zenuwen signalen niet meer goed doorgeven, waardoor patiënten klachten krijgen zoals zwakte, gevoelsstoornissen, pijn, problemen met het zien en balansproblemen. Het grootste deel van de MS patiënten heeft relapsing-remitting MS (RRMS). Dat wil zeggen dat klachten tijdens een aanval ontstaan (een relapse), waarna ze (gedeeltelijk) wegtrekken (remissie). Bij een kleiner deel van de MS patiënten is er sprake van geleidelijke achteruitgang zonder tussentijds herstel, dit wordt progressieve MS genoemd. Als de progressieve vorm direct aanwezig is zonder dat er relapsen aan vooraf zijn gegaan, dan wordt dit primair progressieve MS (PPMS) genoemd. Indien de progressieve fase vooraf wordt gegaan door een relapsing-remitting beloop, wordt dit secundair progressieve MS (SPMS) genoemd. Naast het bijhouden van klinische klachten kan MS ook opgevolgd worden met MRI scans van de hersenen. Hierop kunnen lokale ontstekingen in de hersenen te zien zijn, welke gezien kan worden als een teken van actieve ziekte, of ziekteactiviteit. Op dit moment is er geen genezing voor MS, maar wordt door middel van medicijnen die het immuunsysteem beïnvloeden gepoogd om de ziekteactiviteit zo veel mogelijk te remmen, om achteruitgang zo veel mogelijk te voorkomen.

Het is nog niet duidelijk hoe de fout in het immuunsysteem die MS veroorzaakt kan ontstaan. Waarschijnlijk zorgt een ongelukkige combinatie van genetische factoren en omgevingsfactoren voor de fout. Uit onderzoek blijken enkele omgevingsfactoren als belangrijke spelers in het ontstaan van MS naar voren te komen. Dit betreft een tekort aan vitamine D, een infectie met het Epstein-Barr virus (EBV, bekend als de veroorzaker van de ziekte van Pfeiffer), roken en obesitas.

Zoals gezegd is MS een auto-immuun ziekte, wat betekent dat er afweercellen betrokken zijn in de oorsprong van de ziekte. Lang werd gedacht dat één soort afweercel de hoofdrolspeler was in MS, namelijk de T cel (vernoemd naar het orgaan waar hij gemaakt wordt, namelijk de thymus) en in het bijzonder de T helper cel. Recenter onderzoek toont dat naast de T cel, ook de B cel (vernoemd naar het beenmerg waar hij gemaakt wordt) en de NK cel (natural killer, of natuurlijke doder, omdat hij niet door een andere cel geactiveerd hoeft te worden voordat hij zijn functie uit kan voeren) actief een rol spelen in het ziekteproces bij MS. Door dit recente onderzoek zijn we veel te weten gekomen over hoe deze cellen werken in MS patiënten, maar desondanks is er weinig bekend over wat de aanwezigheid van deze cellen betekent voor de patiënt. Oftewel:

Is er een waarde voor de patiënt om naar de samenstelling van het immuunsysteem te kijken? Zegt dit bijvoorbeeld iets over de mate van ziekteactiviteit die ze te wachten staat? Deze kwesties worden verkend in dit proefschrift.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie omtrent de aandoening multiple sclerose en een overzicht van de bekende factoren die bijdragen aan het ontstaan en beloop van multiple sclerose. Dit hoofdstuk beschrijft de doelstellingen en de opzet van dit proefschrift.

Het hoofdstuk benoemt onder andere vitamine D. Dit is een belangrijke stof die we voornamelijk binnen krijgen door UV straling van zonlicht. Het staat vooral bekend om zijn rol in botregulatie en calcium huishouding, maar lijkt ook een rol te spelen in het immuunsysteem. Omdat lage vitamine D waarden zijn geassocieerd met het ontstaan, en met een slechter beloop van MS, hebben verscheidene studies het effect van vitamine D supplementies bij MS patiënten onderzocht. Een van deze studies was de internationale SOLAR studie, welke uitzocht of MS patiënten die één jaar lang hoge dosis vitamine D suppletie kregen, minder tekenen van ziekteactiviteit hadden dan MS patiënten die één jaar lang een placebo namen. Dit werd gemeten in onder andere hoeveelheid aanvallen en in nieuwe ontstekingshaarden op MRI scans na één jaar. Een kleiner deel van de patiënten in de SOLAR studie werden ook benaderd voor een aanvullende analyse (de Nederlandse SOLARIUM substudie). Bij deze patiënten werd ook bloed geprikt vóór ze begonnen aan de suppletie danwel placebo, en na één jaar. In dit bloed werd gekeken naar de samenstelling van het immuunsysteem bij deze patiënten, met als doel om te kijken of patiënten die vitamine D suppletie kregen een meer gebalanceerd immuunsysteem lieten zien, ten opzichte van patiënten die placebo kregen. Uit de SOLAR studie bleek dat patiënten die vitamine D suppletie kregen, minder MRI afwijkingen lieten zien dan patiënten met een placebo. De SOLARIUM studie toonde geen significant verschil in de samenstelling van het immuunsysteem tussen patiënten die wel of geen vitamine D suppletie hadden gekregen. Om ons te verdiepen in de onderzoeksvragen, hebben we de gegevens van de SOLAR studie en de SOLARIUM studie gecombineerd. Zodoende kijken we of de samenstelling van het immuunsysteem aan het begin van het jaar, iets zegt over de ziekteactiviteit aan het einde van het jaar. Omdat we ons baseren op vitamine D studies, wordt eerst de rol van vitamine D in MS verder uitgediept.

Hoofdstuk 2 beschrijft de relatie tussen vitamine D en een nieuwe marker van ziekteactiviteit: neurofilament lichte keten (neurofilament light chain, NFL). Deze relatief nieuwe biomarker geeft een indruk van de mate van zenuwschade en verhoogde NFL waarden zijn geassocieerd met een ernstiger MS ziektebeloop. Gezien vitamine D suppletie geassocieerd is met een afname van MRI afwijkingen vergeleken met een placebo, werd

onderzocht of eenzelfde gunstig effect op NfL waarden bestaat. Bij onze 40 patiënten werd geen significant verschil in NfL waarden gevonden tussen beide behandelingen. Na correctie voor leeftijd werd bij hogere NfL waarden een trend gezien richting een verhoogd risico op MRI activiteit. Deze uitkomst ondersteunt het gunstige effect van vitamine D suppletie niet. Wel geeft het aan dat we NfL in latere analyses kunnen gebruiken zonder te corrigeren voor vitamine D suppletie.

Hoofdstuk 3 verdiept zich verder in vitamine D en beschrijft de invloed van genetica op het effect van hoge-dosis vitamine D suppletie, zoals in de SOLARIUM studie. In het SOLARIUM cohort werd, waar mogelijk, het dragerschap van vier risico-allelen bepaald welke allen geassocieerd zijn met vitamine D metabolisme. Vervolgens werd onderzocht of dragerschap van deze risicoallelen geassocieerd is met een hogere of lagere hoeveelheid vitamine D in het bloed, vergeleken met niet-dragers. Dit werd gemeten bij de start van het onderzoek en na één jaar hoge-dosis vitamine D suppletie. Bij de start van het onderzoek werd geen verschil gevonden in vitamine D waarden tussen dragers en niet-dragers. Na één jaar suppletie blijken dragers van het rs7041 risico-allel een verhoogde concentratie vitamine D in het bloed te hebben, terwijl dragers van het rs12368653 risico-allel een verlaagde vitamine D concentratie te hebben. Verder onderzoek moet uitwijzen of deze veranderde vitamine D waarden ook klinisch een verschil maken tussen dragers en niet-dragers van de risico-allelen. Ook moet blijken of dit gemeten verschil ook aanwezig is bij suppletie in lagere, meer fysiologische doseringen. In ieder geval zouden deze risico-allelen moeten worden meegenomen in toekomstige (hoge-dosis) vitamine D suppletie studies om te kunnen corrigeren voor genetische opmaak.

Na de verdieping in vitamine D, wordt de focus verlegd richting afweercellen en hun klinische waarde.

Hoofdstuk 4 is een overzicht van onze huidige kennis over NK cellen. NK cellen zijn relatief recent beschreven als sleutelspelers in het MS ziekteproces. Er wordt ingegaan op de functie, subtypering en werking van NK cellen, waarin we met name stilstaan in het unieke activatiemechanisme van NK cellen. NK cellen dragen een verzameling activerende en inhiberende receptoren bij zich, welke gebruikt worden om gezonde cellen van ongezonde cellen (bijvoorbeeld geïnfecteerd met een virus, of een kankercel) te onderscheiden. Door dit mechanisme heeft de NK cel geen andere cel nodig die hem activeert, zoals wel het geval is bij B en T cellen. Na deze algemene beschrijving wordt ingegaan op de rol van NK cellen in MS. Eerst wordt ingegaan op het bestaande bewijs voor de rol van NK cellen in MS, waarna de (veranderde) functie van NK cellen in MS besproken wordt. De bekendste rol voor NK cellen in MS lijkt een regulerende rol te zijn, waarbij NK cellen de capaciteit hebben om geactiveerde T cellen (en vooral diegene die

het eigen lichaam aanvallen) te doden en zo auto-immuniteit tegen te gaan. Echter lijken NK cellen ook betrokken bij de schade die veroorzaakt wordt door de ontstekingsreactie in het centrale zenuwstelsel. Ondanks hun voornamelijk beschermende rol, is het dus te kort door de bocht om te zeggen dat NK cellen alleen maar beschermend zijn in MS. Vervolgens wordt gekeken naar de effecten van de meest bekende MS omgevingsfactoren en NK cellen. Hier wordt gezien dat de meeste omgevingsfactoren een directe of indirecte relatie met NK cellen hebben. NK cellen hebben bijvoorbeeld een vitamine D receptor en reageren dus op een verlaagd vitamine D niveau. Daarnaast zijn NK cellen, als een van de eerste beschermingen tegen virusinfecties, nauw betrokken bij infecties met EBV. Als laatste worden de effecten van verschillende MS medicamenten op de NK cel populatie benoemd. Hoewel ze bijna allemaal niet ontwikkeld zijn met het doel om NK cellen te beïnvloeden, hebben de meeste therapieën direct of indirect invloed op de NK cel populatie, vaak in gunstige zin. Het is dus mogelijk dat deze therapieën een deel van hun succes te danken hebben aan een, nog onderkend, effect op NK cellen. Samenvattend zijn NK cellen nauw betrokken in het MS ziekteproces, voornamelijk als regulerende entiteiten, welke veelbelovend is om het MS ziekteproces beter te begrijpen en uiteindelijk beter te kunnen behandelen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de prognostische waarde van NK cellen en T cellen in het bloed, uitgedrukt als de NK/T cel ratio. Zoals beschreven in hoofdstuk 4 is de veronderstelde beschermende functie van NK cellen in MS toe te schrijven aan hun mogelijkheid om geactiveerde T cellen te remmen. Derhalve lijkt met name hun relatieve aanwezigheid ten opzichte van T cellen relevant, in plaats van hun absolute aantal. In dit retrospectieve onderzoek met 50 patiënten wordt een relatieve toename van NK cellen geassocieerd met een relatieve afname van bepaalde T cellen, namelijk T helper cellen en in het bijzonder T helper 17 (Th17) cellen. Zoals eerder genoemd zijn T helper cellen kernspelers in het MS ziekteproces en Th17 cellen in het bijzonder zijn gemerkt als schadelijke cellen in MS. Dit ondersteunt de notie dat NK cellen deze schadelijke cellen kunnen onderdrukken. Vervolgens werden de patiënten verdeeld in patiënten die na één jaar tekenen van ziekteactiviteit lieten zien en patiënten die dat niet hadden. Dit gebeurde op basis van MRI scans, klinische relapsen en NfL waarden. Bij deze patiënten werd onderzocht hoe hun NK/Th17 cel verhouding was aan het begin van de studie. Na correctie voor vitamine D suppletie hebben patiënten met nieuwe MRI afwijkingen na één jaar gemiddeld een lagere NK/Th17 cel ratio aan het begin van de studie dan patiënten zonder ziekteactiviteit. Dit fenomeen wordt ook gevonden als wordt gekeken naar klinische relapse en NfL waarden. NK/Th17 cel ratio's werden niet beïnvloed door vitamine D suppletie. We concluderen dat patiënten die binnen één jaar ziekteactiviteit ontwikkelen over het algemeen een ongunstiger NK/Th17 cel ratio hebben in hun bloed dan patiënten die geen ziekteactiviteit ontwikkelen. Deze ratio is dus een mogelijke

biomarker voor ziekteactiviteit en zou met verder onderzoek gebruikt kunnen worden om het risico op ziekteactiviteit binnen een jaar beter in te schatten.

Hoofdstuk 6 verdiept zich in de interactie tussen NK en T cellen. Eén van de grote doorbraken op het gebied van NK cellen in MS is gekomen door een MS geneesmiddel genaamd daclizumab. Dit middel blokkeert een onderdeel van de interleukine-2 (IL-2) receptor (IL-2R), namelijk de alfa keten van de receptor, ook wel bekend als CD25. Door deze receptor te blokkeren hoopte onderzoekers geactiveerde T cellen te remmen, aangezien deze IL-2 nodig hebben om te kunnen overleven. Hoewel T cellen niet geremd leken te worden door blokkade van CD25, zorgde het wel voor een toename van NK cellen, welke uiteindelijk T cellen remde en dus zorgde voor een afname van ziekteactiviteit in behandelde MS patiënten. Het IL-2 – IL-2R pad lijkt dus belangrijk in de balans tussen NK en T cellen, welke bijdraagt aan de kans op ziekteactiviteit zoals beschreven in hoofdstuk 5. Om dit te onderzoeken zijn onderdelen van het IL-2 – IL-2R pad gemeten in 50 MS patiënten en vergeleken met hun NK/Th17 cel ratio's, om een mogelijk verband aan te tonen. De onderdelen van het IL-2 – IL-2R pad zijn de oplosbare vorm van CD25, zowel gemeten in bloed als in supernatant na T cel stimulatie, CD25 expressie op T cellen, en uitdrukking van het *IL2RA* gen, welke codeert voor CD25. Er is bloed afgenomen op week 0 en week 48 van het onderzoek. Allereerst werden IL-2 – IL-2R markers op week 0 en week 48 vergeleken, welke een hoge mate van correlatie toonde. Door deze hoge correlatie konden metingen van week 0 en week 48 samengenomen worden, om zo een grotere onderzoeksgroep te krijgen. Vervolgens werd gekeken naar de correlatie tussen IL-2 – IL-2R markers en NK/Th17 cel ratio's. Oplosbaar CD25, zowel in bloed als in supernatant, alsook CD25 expressie op niet-regulatorische T cellen, zijn negatief gecorreleerd met NK/Th17 cel ratio's. Dit ondersteunt een relatie tussen het IL-2 – IL-2R pad en NK cel – T cel interactie. Het verband tussen verhoogde IL-2 – IL-2R markers en een verlaagde NK/Th17 ratio kan op twee manieren geïnterpreteerd worden. Enerzijds kan een verlaagde ratio een gevolg van de verhoogde markers zijn, wat zou betekenen dat de markers ervoor zorgen dat T cellen geactiveerd worden of NK cellen juist geremd worden, bijvoorbeeld door IL-2 weg te vangen van NK cellen. Anderzijds kan de verlaagde ratio een oorzaak zijn van de verhoogde markers, wat zou betekenen dat er door een slechtere balans tussen geactiveerde T cellen en regulerende NK cellen, er een situatie ontstaat waarin het IL-2 – IL-2R pad meer geactiveerd wordt en meer markers meetbaar zijn. Welke interpretatie de juiste is zal moeten blijken uit toekomstig onderzoek.

Hoofdstuk 7 betreft een nieuw celtype, namelijk de B cel, in het proefschrift. Net zoals de NK cel zijn B cellen relatief recent ontdekt als hoofdrolspelers in het MS ziekteproces. Dit komt voor een groot deel door het goede klinische effect van ocrelizumab, een MS medicament welke CD20 blokkeert, een marker die zich op de meeste B cellen bevindt

en deze cellen remt. B cellen zijn het meest bekend als de cellen die antistoffen produceren, echter is er recent meer aandacht gekomen voor hun antistof-onafhankelijke functies, welke juist van grote invloed lijken in het MS ziekteproces. Een eerder genoemde omgevingsfactor bij MS is besmetting met het Epstein-Barr virus (EBV). Dit virus blijft na initiële infectie sluimerend aanwezig in B cellen. Op deze manier zijn B cellen dus ook betrokken in het MS ziekte proces. In dit hoofdstuk wordt de voorspellende waarde van B cellen en B cel subtypes onderzocht, net zoals dit bij NK/Th17 cel ratio's is gedaan. Daarnaast worden afweerstoffen tegen EBV gemeten en vergeleken met de aanwezigheid van B cellen en B cel subtypes, alsook het risico op nieuwe MS ziekteactiviteit. Allereerst hebben patiënten met nieuwe MRI afwijkingen binnen één jaar over het algemeen lagere proporties transitionele B cellen, en hogere proporties isotype geswitchte B cellen, dan patiënten zonder nieuwe MRI afwijkingen. De transitionele B cel is een jonge vorm van de B cel welke immuun regulerende capaciteiten heeft. De isotype geswitchte B cel is een geheugen B cel die in eerder onderzoek benoemd is als een schadelijke cel in het MS ziekteproces. De proporties transitionele B cellen en isotype geswitchte B cellen kunnen gezien worden als een marker voor MS ziekteactiviteit, welke kan helpen een inschatting te maken van het risico op MRI activiteit binnen één jaar. De proporties van B cellen worden niet beïnvloed door vitamine D suppletie. Antistoffen tegen EBV zijn niet geassocieerd met B cel proporties. Patiënten zonder nieuwe MRI afwijkingen lieten een daling van antistoffen tegen EBV zien over één jaar, terwijl patiënten met nieuwe MRI afwijkingen geen afname lieten zien. Dit betekent dat een daling van EBV antistoffen of het gebrek aan daling ook een mogelijk marker voor toekomstige ziekteactiviteit is.

Tijdens de analyse van deze markers viel een interessant verdelingspatroon op. Zo waren er patiënten met nieuwe MRI activiteit die juist gunstige waardes van transitionele B cellen in het bloed hadden, terwijl er ook patiënten waren zonder nieuwe MRI activiteit die ongunstige waarden hadden. Deze verdeling werd ook teruggezien bij de analyse van NK/Th17 cel ratio's. Verdere verdieping toonde dat patiënten zonder nieuwe MRI afwijkingen en een ongunstige waarde van transitionele B cellen, vaak wel gunstige waarden van andere markers voor ziekteactiviteit, zoals NK/Th17 cel ratio's hadden. Patiënten met nieuwe MRI activiteit binnen één jaar hadden vaak ongunstige waarden van meerdere markers van ziekteactiviteit. Dit impliceert dat patiënten met één ongunstige waarde in hun immuunsysteem geen MRI afwijkingen hoeven te ontwikkelen, zolang ze dit kunnen compenseren met andere regulatoire mechanismen. Het echte risico op MRI afwijkingen ontstaat dus bij meerdere afwijkingen in het immuunsysteem, waardoor dit compensatiemechanisme wegvalt. Deze theorie wordt ondersteunt door een laatste analyse, waarbij we patiënten scoren op vier markers voor ziekteactiviteit, namelijk NK/Th17 cel ratio, proportie proportionele B cellen, wel of geen afname van EBV antistoffen, en het wel of niet ontvangen van vitamine D suppletie. Alle patiënten met nieuwe MRI

afwijkingen hadden een ongunstige waarde op minstens twee van deze onderdelen. Alle patiënten die vier ongunstige waarden hadden, hadden nieuwe MRI afwijkingen, en dit gold ook voor nagenoeg alle patiënten met drie ongunstige waarden. Van alle patiënten die drie of vier gunstige waarden hadden, had geen enkele nieuwe MRI afwijkingen. Concluderend hebben transitionele B cellen, isotype geswitchte B cellen en de afname van EBV antistoffen prognostische waarde voor MS ziekteactiviteit. Er lijkt een meervoud aan ongunstige afwijkingen in het immuunsysteem nodig te zijn om nieuwe MRI activiteit uit te lokken.

Hoofdstuk 8 geeft een overzicht van de eerdere hoofdstukken en stelt de bevindingen ter discussie. Er wordt bij MS onderzoek uitgebreid gezocht naar markers voor toekomstige ziekteactiviteit, hoewel dit opvallend weinig wordt onderzocht in de context van circulerende afweercellen. Onze bevindingen tonen dat de samenstelling van het immuunsysteem een mogelijke marker is voor het risico op nieuwe ziekteactiviteit. Daarnaast geven onze bevindingen aanleiding om te speculeren dat MS ziekteactiviteit wordt veroorzaakt door een gebrek aan compensatiemechanismen in het immuunsysteem. Hier worden de bevindingen in de huidige wetenschappelijke context geplaatst, alsook suggesties voor vervolgonderzoek aangedragen.