



Samenvatting proefschrift Michiel C. van Aalderen

“The individuality of human (virus-specific) CD8+ T cells”

**Promotie: 28 oktober 2016
Universiteit van Amsterdam**

Promotores:
Prof. dr. R.J.M. ten Berge
Prof. dr. R.A.W. van Lier

Introductie

Gedurende mijn promotieonderzoek hebben wij een tweetal zaken bestudeerd: I. CD8+ T cel differentiatie in respons op virale infecties in gezonde immunocompetente individuen en in zieke immungecompromitteerde niertransplantatiepatiënten in algemene zin; en II. CD8+ T cel differentiatie in respons op reactivatie van polyomavirus BK (BKV) in niertransplantatiepatiënten waarvan sommige patiënten een ernstige BKV-geïnduceerde nefritis (BKVN) ontwikkelden. Daarom is mijn dissertatie opgedeeld in twee delen die samen zeven wetenschappelijke manuscripten bevatten die respectievelijk over de bovenstaande onderwerpen gaan. Hieronder volgt een korte samenvatting van het werk zoals per hoofdstuk beschreven in beide delen. Vier van de zeven manuscripten zijn reeds gepubliceerd in wetenschappelijke tijdschriften (zie referenties), twee manuscripten liggen momenteel ter revisie bij wetenschappelijke tijdschriften en één manuscript zit in de afrondingsfase van het opschrijven van de data en zal spoedig worden opgestuurd naar een wetenschappelijk tijdschrift. Onderstaande tekst is een aanpassing van de Nederlandse samenvatting zoals die ook in mijn dissertatie zal staan.

Deel I

In Hoofdstuk 1, “Blood and Beyond: properties of circulating and tissue-resident human virus-specific $\alpha\beta$ CD8+ T cells” geven we een literatuuroverzicht over humane CD8+ T cel differentiatie in reactie op verschillende virale infecties. In dit hoofdstuk willen we duidelijk maken dat de antivirale CD8+ T cel respons, zoals meetbaar in de circulatie, verschillend is van de respons gemeten in verscheidene gespecialiseerde weefsels zoals longen en hersenen. Bovendien geven we een overzicht van de beschreven, en momenteel vaak gebruikte nomenclatuur waarmee verschillende functionele CD8+ T cel subsets op dit moment gedefinieerd worden (1).



Deze nomenclatuur is van oudsher gebaseerd op de expressie patronen van extracellulaire markers zoals CD45 isovormen, CCR7, CD28 en CD27. Omdat differentiatie op transcriptie niveau gereguleerd wordt door transcriptiefactoren (TFs) en niet door de eerst genoemde extracellulaire markers, wilden we weten hoe de intracellulaire T-bet en Eomes (TFs die in muizen belangrijk zijn gebleken voor respectievelijk, effector en memory differentiatie) expressie levels relateren aan de CD45RA/CCR7/CD28/CD27 oppervlakte fenotypes en aan de expressie levels van markers die voorspellend zijn voor de functie van CD8+ T cellen in mensen. In Hoofdstuk 2, "Infection History Determines the Differentiation State of Human CD8+ T cells" laten we zien dat bepaalde T-bet/Eomes expressie levels geassocieerd zijn met specifieke CD45RA/CCR7/CD28/CD27 fenotypes, maar ook met bepaalde expressie levels van markers voorspellend voor het functionele profiel van CD8+ T-cellen. Verder tonen we aan dat verschillende virus-specifieke CD8+ T-cel populaties in de circulatie van gezonde volwassen mensen bestaan in enkel een beperkte range van zulke fenotypen en dat ze daarmee ten opzichte van elkaar behoorlijk kunnen verschillen met betrekking tot hun expressie van transcriptie factoren en functioneel profiel. Tenslotte laten we zien dat virale infectie geschiedenis, in het bijzonder die met persisterende infecties met humaan immunodeficiëntievirus 1 (HIV-1), humaan cytomegalovirus (hCMV) en Epstein-Barr virus (EBV), een significante impact heeft op de vorming van de totale circulatoire CD8+ T cel populatie. Deze impact strekt zelfs zover dat de associatie tussen de T-bet/Eomes expressie levels, CD45RA/CCR7/CD28/CD27 oppervlakte fenotype en de expressie van markers voorspellend voor de functie van individuele CD8+ T-cellen, anders is in individuen met verschillende virale infectiegeschiedenissen. Bijvoorbeeld, een central-memory cel in een individu geïnfecteerd met HIV-1 is qua T-bet/Eomes expressie niet per se gelijk aan een central-memory cel in een individu die niet HIV-1 besmet is. Tenslotte laten we zien dat de specifieke memory fenotypes van de verschillende antivirale CD8+ T cel populaties al vroeg tijdens de acute fase van de primaire virale infectie 'geprogrammeerd' worden om deze bepaalde differentiatie staat aan te nemen (2). Over dit onderwerp wordt verder uitgeweid in Hoofdstuk 3, "Functional separation of IL7R α /KLRG1-defined CD8+ T cell populations in humans". In dit hoofdstuk onderzochten we of humane CD8+ T-cellen, over het verloop van een primaire virale infectie met persisterende herpesvirussen (EBV en hCMV), vergelijkbare expressie patronen toonden van IL-7R α en KLRG1, zoals die in muismodellen reeds waren beschreven. In muizen zijn deze markers gebruikt om 'kortlevende effectorcellen' (short-lived effector cells (SLECs) of IL-7R α loKLRG1 hi cellen) en memory precursorcellen (MPECs of IL-7R α hiKLRG1 lo cellen) te definiëren. In dit hoofdstuk laten we zien dat herpesvirus-gerichte CD8+ T cel populaties in de circulatie van de mens tijdens de memory fase van de T cel respons vaak een SLEC fenotype hebben terwijl dit fenotype bij muizen vooral tijdens de acute fase van infectie gezien wordt. Dit suggereert dat we voorzichtig moeten zijn met het gebruik van definities zoals SLEC in de mens, aangezien deze cellen alles behalve kortlevend zijn. Verder laten wij in dit hoofdstuk zien dat MPECs inderdaad gevormd worden gedurende het verloop van een herpesinfectie en dat dergelijke cellen vooral accumuleren in humane lymfeknopen. Virus-specifieke CD8+ T cellen in lymfeknopen brengen ook veel minder T-bet, maar



wel veel Eomes tot expressie in vergelijking met de circulerende cellen. Tot slot beschrijven we hoe een bepaalde subset van IL-7R α loKLRG1 $^$ lo cellen een substantiële supersubset van Ki-67-positieve (dus actief delende) cellen bevat gedurende virale latentie. Deze subpopulatie zou misschien wel eens als stamcelpopulatie kunnen fungeren die de anti-herpes respons van 'verse' CD8 $^$ T-cellen voorziet gedurende virale latentie (Manuscript momenteel onder revisie bij een wetenschappelijk tijdschrift).

Recente technische ontwikkelingen hebben ons in staat gesteld om gebruik te maken van hoge resolutie massaspectrometrie (MS) om het CD8 $^$ T-cel proteoom met een 'shotgun' benadering te onderzoeken. In vergelijking met multichannel flowcytometrie biedt deze techniek een nog veel breder overzicht over wat er gebeurt op eiwit niveau in verschillende menselijke CD8 $^$ T cel subsets. In Hoofdstuk 4, "Label-free analysis of the proteomes of CD8 $^$ T cell subsets supports a progressive differentiation model of virus-specific T cells in humans" beschrijven we hoe MS laat zien dat er een duidelijke hiërarchisch spectrum bestaat onder de zeven grootste CD8 $^$ T-cel populaties die reeds waren geïdentificeerd in de volwassen (menselijke) circulatie. Dit spectrum begint met naïeve T cellen (TN), gevolgd door central-memory T cellen (TCM) en vier verschillende effector-memory (TEM) T cel populaties, en eindigt met CD45RA-positieve TEM of TEMRA cellen. Bovendien laten grote groepen eiwitten verschillende maar specifieke patronen van expressie zien over dit CD8 $^$ T cel subset spectrum. Er is een groep eiwitten waarvan de expressie lineair toeneemt vanaf de TN tot aan de TEMRA subset (bijvoorbeeld cytotoxische eiwitten); er is een ander patroon waarbij de expressie lineair afneemt vanaf de TN tot aan de TEMRA subset (veelal eiwitten betrokken bij regulatie van metabolisme); en er zijn nog twee verschillende patronen te zien waarin sommige eiwitten enkel tot expressie (of niet tot expressie) komen in bepaalde subsets op een niet-lineaire wijze. Verder zoomen we in dit hoofdstuk in op alle eiwitten die geassocieerd zijn met metabole regulatie (ofwel het metabooloom), alsook alle eiwitten die geassocieerd zijn met cel-cel adhesie (ofwel het adhesoom) waarbij het duidelijk wordt dat deze in verschillende mate tot expressie gebracht worden door deze zeven grootste CD8 $^$ T cel subsets aanwezig in de circulatie van de mens. Deze bevindingen benadrukken de complexiteit waarmee verschillende CD8 $^$ T cel subsets in staat zijn om verschillende functies uit te oefenen (Manuscript wordt momenteel afgeschreven).

Deel II

In Hoofdstuk 5, "BK virus infection in transplant recipients: Clinical manifestations, treatment options and the immune response" geven we een overzicht van de literatuur over polyomavirus BK (BKV) en zijn associaties met specifieke klinische entiteiten, zoals BKV-geïnduceerde interstitiële nefritis (BKVN), ureter stenose en hemorragische cystitis in transplantatie patiënten (3).

Omdat weinig bekend was over de CD8 $^$ T-celrespons waarmee (BKV) normaliter onder controle gehouden wordt door gezonde immuuncompetente individuen, beschrijven we in Hoofdstuk 6, "Phenotypic and functional characterization of circulating polyomavirus BK VP1-specific CD8 $^$ T-cells in healthy adults" hoe we met



single stainings met fluorescerende MHC-A02 tetrameren BKV-specifieke CD8 + T-cellen hebben geïsoleerd uit het bloed van gezonde volwassenen. Dit hebben we gedaan om vervolgens meer over de fenotypische en functionele aspecten van deze cellen te kunnen leren. BKV VP1 (viraal capsid-eiwit)-specifieke CD8+ T-cellen zijn maar in zeer kleine aantallen aanwezig in de circulatie van gezonde volwassenen (in vergelijking met bijvoorbeeld de hCMV en EBV-specifieke populaties). Deze cellen bleken fenotypisch hoofdzakelijk CD45RA⁻CCR7⁺/CD27⁺ (TCM en CD27⁺ TEM) vroeg-gedifferentieerde cellen te zijn, en waren daarmee verrassend genoeg vergelijkbaar aan het fenotype van circulerende influenza A-specifieke CD8+ T-cellen. Dit is vooral verrassend omdat BKV, in tegenstelling tot influenza een virus is dat in lichaam voor de rest van het leven aanwezig blijft (net zoals hCMV en EBV dat doen). De BKV VP1-specifieke cellen dragen net als influenza A-specifieke cellen geen of zeer weinig granzym B, en lijken daarom weinig directe cytotoxiciteit te kunnen uitoefenen zoals hCMV-specifieke cellen dat over het algemeen wel kunnen. Daarentegen zijn de BKV VP1-specifieke cellen, weer net als influenza A-specifieke cellen zeer efficiënt in het produceren van meerdere cytokinen na stimulatie (4).

Het gebrek aan cytotoxische differentiatie van BKV-specifieke CD8+ T-cellen zou verklaard kunnen worden door het feit dat BKV loads over algemeen niet detecteerbaar zijn in de circulatie van gezonde individuen. Verder lijkt BKV ook geen significante pathologie te veroorzaken in gezonde immunocompetente individuen (voor zover dat nu bekend is). Daarom hebben wij dit onderzoek uitgebreid naar een groep niertransplantatie (NTx) patiënten die verschillende gradaties van in de circulatie meetbare BKV reactivatie ontwikkelden. Enkelen van hen werden zelfs gediagnosticeerd met BKVN. In deze vervolgstudie vroegen wij ons af of BKV reactivatie (en dus disseminatie van het virus naar de circulatie) invloed heeft op de differentiatie van BKV-specifieke CD8+ T-cellen. Verder stelden wij daarbij de subvraag of het proces van BKV-specifieke CD8+ T cel differentiatie verschilde bij patiënten die niet in staat waren om weer controle te krijgen over het virus, versus het proces van CD8+ T cel differentiatie in patiënten wiens immuunsysteem wel in staat bleek om het virus zelf weer onder controle te krijgen. In tegenstelling tot de vorige studie hebben we in deze vervolgstudie BKV-specifieke CD8+ T cellen geïsoleerd met behulp van 'combinatorial encoding' met fluorescent-gemerkte MHC-A02 tetrameren. Deze techniek heeft de sensitiviteit en specificiteit van de kleuring aanzienlijk verhoogd in vergelijking met de enkele tetrameerstaining zoals we die in de vorige studie hadden gebruikt.

In deze studie, beschreven in Hoofdstuk 7, "Clinically relevant reactivation of polyomavirus BK (BKV) in Renal Transplant Recipients is associated with impaired differentiation of BKV-specific CD8+ T cells" vonden we dat BKV-specifieke CD8+ T-cellen in NTx patiënten voorafgaand aan transplantatie niet verschillen van hun tegenhangers zoals die in de circulatie van gezonde volwassenen worden gevonden. Dit suggereert dat er geen predisponerende/voorspellende factoren zijn in patiënten met ernstig nierfalen vóór transplantatie, met betrekking tot het CD8+ T cel compartiment, voor het ontwikkelen van ernstige BKV reactivatie en BKVN na transplantatie. Verder vonden we dat, voorafgaand aan virale reactivatie, CD8+ T-cellen gericht tegen het large T antigen eiwit (LTAG, een viraal niet-structurele eiwit)



een ander fenotype hadden dan CD8⁺ T cellen gericht tegen BKV VP1 (viraal capside-eiwit). Daar waar VP1-specifieke cellen inderdaad veelal een TCM en CD28⁺CD27⁺ TEM toonden, hebben LTAG-specifieke CD8⁺ T-cellen meestal een fenotype dat normaliter naïeve T-cellen definieert behalve dan meer PD-1 tot expressie brengen. In patiënten die zelf in staat waren om het virus weer te controleren na transplantatie bleken zowel VP1- als LTAG-specifieke CD8⁺ T-cellen te differentiëren in de richting van CD28⁻ TEM fenotypes. Bij patiënten die in een ernstige mate van BKV reactivering en zelfs BKVN ontwikkelden, leek deze CD28⁻ TEM differentiatie niet op te treden. Verder wezen de afwezigheid van T-bet en Eomes inductie en het gebrek aan IL-7R α downregulatie ook op een gebrek aan CD8⁺ T cel activatie en differentiatie in respons op BKV reactivatie na transplantatie. Ondanks de afgenomen differentiatie van de circulerende BKV-specifieke CD8⁺ T-cellen, vonden we wel een opeenstapeling van BKV VP1-specifieke CD8⁺ T-cellen in samples van nieren waarin zich BKVN had ontwikkelt. Bovendien bleken deze BKV-specifieke cellen in de nieren een CD69⁺CD103⁺ tissue-resident geheugen fenotype te hebben, maar brachten ze geen granzym B tot expressie. In nieren waarin we geen BKVN konden vinden vonden we lagere aantallen van BKV-specifieke CD8⁺ T-cellen. Desalniettemin bracht een substantieel deel van deze cellen wel granzym B tot expressie. Tezamen wijzen deze bevindingen op een afgenomen BKV-specifieke CD8⁺ T cel differentiatie, een proces dat op zijn beurt weer ten grondslag kan liggen aan het ontstaan van ernstige BKV reactivatie en uiteindelijk ook de ontwikkeling van BKVN. Dit laatste is vooral van belang omdat we tot nu toe eigenlijk niet goed begrijpen waarom een deel van de NTx patiënten uiteindelijk BKVN ontwikkelt en omdat BKVN op zijn beurt weer een hoge kans geeft op verlies van de getransplanteerde nier (Manuscript momenteel onder revisie bij een wetenschappelijk tijdschrift).

Uiteindelijk geven deze bevindingen ons daarom handvatten om verder onderzoek te doen naar bijvoorbeeld therapievormen die zich richten op het behoudt of herstel van de BKV-specifieke T cel respons om zo het verlies van de in vele opzichten kostbare niertransplantaten te kunnen behouden.