

# Nederlandse Samenvatting



De incidentie van allergieën in de Westerse Wereld neemt de laatste decennia toe. Er bestaan verschillende soorten allergieën zoals inhalatieallergie en voedselallergie. Deze allergieën zijn te karakteriseren als een Type I overgevoeligheidsreactie van het immuunsysteem. Kenmerkend voor deze allergieën is de productie van bepaalde antistoffen gericht tegen het allergeen. Er zijn verschillende soorten allergenen die deze reacties kunnen veroorzaken, zoals inhalatieallergenen (bijv. boom- en graspollen) en voedselallergenen (bijv. koemelk en pinda's). De antistoffen die specifiek tegen deze allergenen worden gemaakt worden Immunoglobuline E, IgE, genoemd. Wanneer een persoon gesensibiliseerd raakt voor een allergeen, wordt er specifiek IgE aangemaakt wat vervolgens tot schadelijke reacties leidt in daaropvolgende contacten met het allergeen. Klinische symptomen van een allergische reactie kunnen optreden in de huid (eczeem), luchtwegen (hooikoorts en astma) en zijn soms zelfs systemisch van aard (anafylactische shock). Voor inhalatieallergie bestaat er inmiddels een behandelmethode, immunotherapie, waarbij door herhaald inspuiten van het allergeen een bepaalde vorm van tolerantie voor het allergeen ontstaat en de klachten verminderen. Het werkingsmechanisme is echter nog niet opgehelderd. Voor voedselallergie is een dergelijke therapie nog niet goed ontwikkeld. In dit proefschrift wordt beschreven dat T cellen een mogelijk aangrijpingspunt zouden kunnen zijn voor toekomstige behandelmethoden van voedselallergie.

T cellen zijn een belangrijke celpopulatie van het immuunsysteem en kunnen onderverdeeld worden in diverse groepen. De verschillende T cel subsets oefenen hun functie uit door middel van de productie van bepaalde stoffen, ook wel cytokines genaamd (zoals interleukines, IL's en interferonen, IFN's). Een bepaalde subset van T cellen (Th2 cellen, gekarakteriseerd door de productie van IL-4) is verantwoordelijk voor de productie van het allergeen-specifieke IgE door B cellen en speelt dus een belangrijke rol bij voedselallergie. Naast Th2 cellen bestaan er nog andere subsets van T cellen, zoals Th1 cellen (gekaracteriseerd door de productie van IFN- $\gamma$ ) en regulatoire T cellen, die gekenmerkt worden door de productie van regulatoire cytokines als IL-10 en TGF- $\beta$ .

Aangezien het aantal allergeen-specifieke T cellen in het bloed erg laag is, is er in hoofdstuk 2 en 3 gebruik gemaakt van T cel kloneringen. Hierbij worden de koemelk-specifieke T cellen uit bloed geïsoleerd en in een koemelk-specifiek systeem verder opgekweekt. Deze techniek is toegepast om koemelk-specifieke T cellen te verkrijgen uit het bloed van koemelkallergische kinderen, allergische en niet-allergische controles. Deze T cellen zijn vervolgens gekarakteriseerd op de specificiteit van de T cellen voor een bepaald stukje koemelkeiwit, het vermogen om bepaalde cytokines te maken en de expressie van oppervlaktemarkers.

In hoofdstuk 2 is gebruik gemaakt van koemelk-specifieke T cel klonen. De T cel respons in drie verschillende donorgroepen in de leeftijd van 4-12 jaar (kinderen met koemelkallergie, allergische controles met een andere voedselallergie en niet-allergische controles) werd onderzocht. De productie van cytokines door T cellen was een belangrijke parameter. T cellen van allergische kinderen produceren veel Th2 cytokines (IL-4 en IL-13). In kinderen zonder een koemelkallergie zijn ook koemelk-specifieke T cellen te vinden, maar deze verschillen wel degelijk van de T cellen aanwezig bij kinderen met een koemelkallergie. De T cellen van de allergische controle kinderen hebben een zeer hoge IL-10 productie en de T cellen van de niet-allergische controles produceren lagere hoeveelheden cytokines dan de T cellen van de twee allergische groepen. De beschreven resultaten duiden op het bestaan van twee vormen van tolerantie. In de niet-allergische controle kinderen bestaat er een soort 'natuurlijke tolerantie', gekarakteriseerd door T cellen die lage hoeveelheden IL-4 en IFN- $\gamma$  maken. In de allergische controles is een belangrijke rol voor het cytokine IL-10 weggelegd. Hoge concentraties van dit cytokine zijn nodig om een vorm van 'actieve tolerantie' te verkrijgen. Waarschijnlijk staat het cytokine IL-10 centraal bij de instandhouding van een tolergeen milieu voor koemelk in de allergische controles.

In hoofdstuk 3 is beschreven hoe koemelk-specifieke T cellen van zuigelingen en kinderen zonder koemelkallergie gekarakteriseerd kunnen worden en hoe deze veranderen in de tijd. Het blijkt dat de atopische aanleg van een zuigeling zonder koemelkallergie mede bepalend is voor het cytokinenpatroon van de T cellen. T cellen van atopische zuigelingen (zonder koemelkallergie) produceren meer Th1 cytokines (IFN- $\gamma$ ) vergeleken met T cellen van gezonde zuigelingen. Naarmate de atopische zuigelingen ouder worden lijkt de cytokinenproductie van de T cellen op de T cellen zoals gevonden in gezonde controles (richting een Th0 phenotype, gelijke hoeveelheden IL-4 en IFN- $\gamma$ ). Deze resultaten suggereren dat de koemelk-specifieke T cel respons van atopische zuigelingen een Th1-gestuurde respons nodig hebben om te voorkomen dat de koemelkallergie zich gaat ontwikkelen.

Een andere populatie T cellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatoire T cellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs) speelt een belangrijke rol in de regulatie van zowel Th1 als Th2 cellen. Het is nog niet

geheel duidelijk of deze cellen hun suppressieve werking uitoefenen via de productie van regulatoire cytokines als IL-10 of TGF- $\beta$ , of via cel-cel contact. In hoofdstuk 4 is aangetoond dat deze belangrijke T cel populatie, met regulerende werking, aanwezig is in voedselallergische mensen en dat deze cellen *in vitro* ook functioneel suppressief zijn. In hoofdstuk 5 is onderzocht of het effect van immunotherapie bij patiënten met een berkenpollenallergie te verklaren is door een verandering in de Treg populatie. Zowel het percentage als de functie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs was niet veranderd na immunotherapie. Ook de productie van IL-10 door CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs was na immunotherapie niet verhoogd. Helaas was het onderzoek naar CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs beperkt door het feit dat de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs alleen uit bloed en niet uit organen geïsoleerd konden worden en dat hun functionaliteit alleen in een *in vitro* setting is bestudeerd. Het is dus toch mogelijk dat deze cellen *in vivo* tijdens immunotherapie een belangrijke rol spelen in het proces van tolerantie inductie en dat dit niet te meten is in het bloed.

Om te onderzoeken of T cellen van allergische kinderen nog te moduleren zijn door cytokines met een regulerende werking (zoals IL-10 en TGF- $\beta$ ), is in hoofdstuk 6 de activiteit van T cellen onderzocht in aan- en afwezigheid van TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  remt sterk de celdeling van T cellen van zowel allergische als niet-allergische donoren. TGF- $\beta$  blijkt echter niet in staat om de productie van cytokines door T cellen te veranderen of te moduleren in zowel allergische als niet-allergische donoren. Wel lijkt TGF- $\beta$  een verandering te induceren in T cellen, gekarakteriseerd door een toename in de expressie van de activatiemarker CD69. Deze marker is reeds in proefdiermodellen beschreven als mogelijke indicator van de ontwikkeling van een toleroog milieu.

Omdat T cellen, gericht tegen koemelk, niet heel duidelijk te moduleren waren door TGF- $\beta$  is in hoofdstuk 7 gekeken naar andere T cel populaties. Hierbij is er onderscheid gemaakt tussen naïeve en meer gedifferentieerde (memory) T cellen uit perifere bloed van volwassenen en naïeve T cellen uit navelstrengbloed. TGF- $\beta$  was in staat om de proliferatie van deze populaties te remmen maar alleen wanneer de cellen gestimuleerd werden via hun T cel receptor in afwezigheid van costimulatie. Op het gebied van de cytokineproductie waren er wel duidelijke verschillen tussen de drie T cel populaties aan te tonen. T cellen uit perifere bloed (naïef en memory) produceren minder cytokines in aanwezigheid van TGF- $\beta$  in vergelijking tot T cellen geïsoleerd uit navelstrengbloed, die meer IL-10 produceren in aanwezigheid van TGF- $\beta$ . Deze inductie van IL-10 werd niet doorbroken door het toevoegen van IL-12 en anti-IL-4 (Th1-sturende omgeving) maar wel door het toevoegen van IL-4 en anti-IL-12 (Th2-sturende omgeving).

Samenvattend laten deze hoofdstukken zien dat er *in vivo* een zeer belangrijke rol voor het cytokine IL-10 lijkt te bestaan bij het in stand houden van tolerantie. Vervolgens tonen de *in vitro* data aan dat het cytokine TGF- $\beta$  hier in een vroeg stadium van de T cel (naïeve T cellen) een stimulerende rol in zou kunnen spelen. De vraag blijft of meer

## Nederlandse samenvatting

---

gedifferentieerde T cellen (de memory T cellen) *in vivo* ook nog gemoduleerd kunnen worden in hun cytokinenprofiel door cytokines als IL-10 en TGF- $\beta$  en of de activatie van CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs hierbij betrokken is.