

Nederlandse Samenvatting

Respiratoir syncytieel virus

Het respiratoir syncytieel virus (RSV) is een veroorzaker van luchtweginfecties van de mens. Het komt bij de mens met name in het winterseizoen voor. Infecties met RSV blijven in veel gevallen beperkt tot de bovenste luchtwegen en gaan dan vaak gepaard met milde verkoudheidsverschijnselen. Vooral bij kleine kinderen, personen met een verzwakt afweersysteem of bejaarden kan het virus ook een lagere luchtweginfectie veroorzaken, die gepaard kan gaan met veel ernstiger klinische symptomen. Zo is RSV de belangrijkste veroorzaker van ziekenhuisopnames ten gevolge van ernstige luchtweginfecties bij kinderen onder de zes maanden. Prematuren of kinderen met hartaandoeningen of longproblemen vormen in het bijzonder risicogroepen voor deze ernstige RSV-infecties.

Het menselijk afweersysteem tegen ziekteverwekkers kan worden ingedeeld in twee compartimenten: een niet-specifiek en een specifiek deel. Het niet-specifieke deel is de eerste barrière die ons lichaam moet verdedigen tegen indringers, zoals virussen. Hierbij horen fysieke barrières (onder andere huid, slijmvliezen en maagzuur), afweercellen (onder andere macrofagen en 'natural killer cellen') en moleculen (onder andere interferon, lysozym en complement). Bij herhaalde infecties zal dit niet-specifieke deel van het afweersysteem niet veranderen.

Het specifieke deel van het afweersysteem is in staat om onderscheid te maken tussen 'lichaamseigen' en 'lichaamsvreemde' structuren. Bij infectie met een ziekteverwekker wordt een immunologisch geheugen opgebouwd, waardoor bij herhaalde blootstelling aan dezelfde ziekteverwekker de reactie van het afweersysteem sneller en sterker zal zijn. De belangrijkste cellen van het specifieke afweersysteem zijn twee soorten witte bloedcellen: B-lymfocyten (B-cellen) die, als ze uitgerijpt zijn tot plasmacellen, antilichamen produceren en T-lymfocyten (T-cellen) die virussen in geïnfecteerde cellen kunnen bestrijden.

Veel van de 'klassieke' kinderziekten zoals bof, mazelen of rode hond krijgt een mens slechts éénmalig. Bij een herhaalde blootstelling aan deze virussen zorgt het immunologische geheugen voor een snelle reactie van het specifieke afweersysteem, waardoor geen ziekteverschijnselen zullen optreden. Kinderen die zijn gevaccineerd met het zogenaamde BMR-vaccin zullen immuun zijn tegen deze virusinfecties: door de vaccinatie wordt ook immunologisch geheugen opgebouwd, waardoor al bij de eerste blootstelling aan deze virussen de afweerrespons zo snel en sterk is, dat geen ziekte optreedt. Bij RSV is het immunologische geheugen niet in staat om herhaalde infecties te voorkomen, maar dit geheugen biedt wel in toenemende mate bescherming tegen lagere luchtweginfecties. Gedurende het leven kan men

dus herhaaldelijk een RSV-infectie doormaken, die meestal slechts tot verkoudheidsverschijnselen zal leiden.

Een effectief vaccin tegen RSV bestaat nog niet, al doet men hier reeds lang veel onderzoek naar. Dit onderzoek wordt bemoeilijkt door een aantal factoren. Aangezien ernstige infecties vaak op jonge leeftijd voorkomen, zou een vaccin al op zeer jonge leeftijd toegediend moeten worden, een periode waarin het afweersysteem nog niet volledig ontwikkeld is en kinderen nog maternale anti-lichamen hebben. Daarnaast zijn er in de jaren zestig van de vorige eeuw tijdens vaccin-studies ernstige problemen opgetreden. Bij deze studies vaccineerde men jonge kinderen met een experimenteel RSV-vaccin. Tijdens het daaropvolgende RSV-seizoen bleken deze kinderen niet alleen niet beschermd, maar ging infectie met RSV juist met een veel ernstiger ziektebeeld gepaard en zijn er uiteindelijk zelfs twee kinderen overleden. De door het vaccin geïnduceerde afweerrespons bleek in dit geval de boosdoener: als het afweersysteem zelf de ziekte veroorzaakt noemen we dit 'immuunpathologie'. Het exacte mechanisme waarmee het afweersysteem in dit specifieke geval de ziekte veroorzaakte is echter nog niet volledig begrepen, waardoor de angst blijft bestaan dat ook andere RSV-vaccins vergelijkbare problemen zouden kunnen veroorzaken.

Dit proefschrift

Dit proefschrift beschrijft een aantal aspecten van de specifieke afweerrespons tegen RSV-infecties bij kinderen en volwassenen. Daarnaast zijn de veiligheid en effectiviteit van twee kandidaat RSV-vaccins getest in een proefdiermodel. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richtte zich op de beantwoording van een aantal specifieke vragen:

Is de afweerrespons in kinderen met een milde of ernstige RSV-infectie verschillend?

Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2** van het proefschrift maakte deel uit van het Vigall-project (afkorting van virusgemedieerde allergie), een samenwerkingsproject tussen drie afdelingen van het Erasmus MC. Hoofddoel van dit project was om te kijken of er een verband bestond tussen het doormaken van virale infecties op jonge leeftijd en het ontstaan van allergische ziekten op latere leeftijd. In dit project is een groep kinderen gevolgd tijdens de eerste twee levensjaren en zijn klinische materialen (bloed en cellen van het neusslijmvlies) afgenomen tijdens routineafspraken en na acute luchtweginfecties. Specifieke doelstelling van het in dit proefschrift beschreven deel van het project was om de RSV-specifieke T-cel respons te karakteriseren en vervolgens in verband te brengen met de latere ontwikkeling van allergie. Helaas bleek het aantal gediagnosticeerde RSV-infecties bij deze groep kinderen lager dan verwacht, waardoor het beantwoorden van de oorspronkelijke vraagstelling onmogelijk bleek. De uiteindelijke studie beschrijft het verschil in T-cel respons tussen kinderen met een bovenste luchtweginfectie - al dan niet veroorzaakt door RSV - en

kinderen met een ernstige RSV-geïnduceerde, lagere luchtweginfectie. Hieruit bleek dat het aantal specifieke T-cellen hoger was bij kinderen met een ernstige infectie dan kinderen met een milde infectie, maar nauwelijks verschilde tussen de twee groepen met milde infecties. Tevens bleek het aantal T-cellen dat het cytokine interleukine (IL)-13 produceerde, hoger te zijn bij kinderen met ernstige dan bij kinderen met milde infecties. Dit cytokine zou mogelijk een verband kunnen vormen tussen RSV op jonge leeftijd en het ontstaan van allergische ziekten op latere leeftijd, aangezien IL-13 een centrale rol speelt bij het ontstaan van astma. Om dit nader te kunnen bestuderen zullen grotere prospectieve cohortstudies nodig zijn.

Hoe ziet de RSV-specifieke T-cel respons eruit?

In **hoofdstuk 3** worden twee verschillende manieren beschreven om te kijken naar de RSV-specifieke T-cel respons. In **paragraaf 3.1** zijn cytotoxische T-cel kloons geïsoleerd uit het bloed van twee kinderen na een RSV-infectie. De T-cel kloons herkenden verschillende eiwitten van RSV: het fusie-eiwit (F) en de 1B- en 1C-eiwitten. De F-specifieke kloons werden nader bestudeerd en herkenden minimale epitopen van negen aminozuren in de context van HLA-B*57 of -C*12.

In **paragraaf 3.2** zijn T-helpercel kloons geïsoleerd uit neusslijmvlies en bloed van twee andere kinderen. Eén kloon was gericht tegen het matrix-eiwit van RSV en herkende het minimale epitoom in de context van HLA-DPB1*1601, de andere was specifiek voor het aanhechtingseiwit (G) van RSV en herkende het minimale epitoom in de context van HLA-DPB1*0401 en -0402. Interessant genoeg bleek het minimale epitoom van de laatste T-cel kloon te liggen in het geconserveerde gedeelte van het G-eiwit. Omdat het restrictie-element HLA-DP4 wereldwijd vaak voorkomt, zou een groot deel van de wereldbevolking dit epitoom na iedere RSV-infectie kunnen herkennen. Studies in proefdiermodellen suggereren dat de afweerrespons tegen G mogelijk een belangrijke rol speelt in de uitkomst van de RSV-infectie, daarom is gekeken of de respons tegen dit epitoom een beslissende factor zou kunnen zijn bij het ontwikkelen van ernstige ziekte na RSV-infectie. Hiervoor zijn cellijnen van kinderen met een milde of ernstige, lagere luchtweginfectie gebruikt om het minimale epitoom te presenteren aan de G-specifieke T-cel kloon. Uit de resultaten bleek echter dat de mogelijkheid om dit epitoom te presenteren geen aantoonbare invloed heeft op de uitkomst van de infectie.

Een andere manier om naar de RSV-specifieke afweerrespons te kijken is beschreven in **paragraaf 3.3**. Hiervoor zijn T-cellen van drie gezonde volwassen donoren gestimuleerd met een recombinant gemodificeerd vaccinia virus Ankara (rMVA) dat zorgt voor de expressie van het F- (rMVA-F) of G- (rMVA-G) eiwit van RSV. Hierdoor zullen de eiwitspecifieke T-cellen uitgroeien en kan bepaald worden tegen welke gedeelte van het eiwit deze gericht zijn. Na stimulatie met rMVA-F is een set overlappende peptiden gebruikt om te kijken tegen welk gedeelte van het F-eiwit deze T-cellen gericht waren. Uit de resultaten van deze studie bleek, dat

deze cellen verschillende regio's van het F-eiwit herkenden. In combinatie met een andere studie bleek zelfs dat verspreid over het gehele F-eiwit regio's voorkomen, die herkend kunnen worden door T-cellen. Na stimulatie met rMVA-G bleek dat bijna alle specifiek uitgroeiende T-cellen gericht waren tegen het constante gedeelte van het G-eiwit. Tevens waren alle G-specifieke cellen van het CD4-positieve T-helper fenotype, waarmee een andere vraag ook beantwoord kon worden: in tegenstelling tot het F-eiwit lijkt het G-eiwit geen CD8-positieve cytotoxische T-cellen te stimuleren. Om deze vraag definitief te kunnen beantwoorden moet nog wel een groter aantal donoren getest worden. Hiervoor lijkt de in deze paragraaf beschreven methode zeer geschikt.

Twee kandidaatvaccins tegen RSV: zijn ze veilig en effectief?

In **hoofdstuk 4** zijn twee kandidaatvaccins geëvalueerd met betrekking tot hun veiligheid (veroorzaken ze immunopathologie na infectie met RSV?) en effectiviteit (beschermen ze tegen infectie met RSV?). Deze studies zijn uitgevoerd in een apenproefdiermodel, waarin eerder de immunopathologie veroorzaakt door het in de jaren zestig gebruikte vaccin ('FI-RSV') kon worden gereproduceerd.

In **paragraaf 4.1** werd een subunitvaccin getest, gebaseerd op het G-eiwit van RSV (BBG2Na) en in **paragraaf 4.2** een rMVA dat het F- en G-eiwit van RSV (rMVA-F/G) tot expressie brengt. De vaccinatie met deze twee kandidaatvaccins is getest in vergelijking met FI-RSV-vaccinatie. Na vaccinatie met de twee vaccins konden geen T-cel responsen en slecht in een aantal dieren RSV-specifieke anti-stoffen aangetoond worden. Wel werden IL-13 producerende T-cellen aangetoond na vaccinatie met BBG2Na (bij twee van de vier apen) en FI-RSV (bij beide apen), hoewel deze respons in de BBG2Na-gevaccineerde apen beduidend lager was dan in de FI-RSV-gevaccineerde apen. In een eerdere studie met FI-RSV bij makaken werd productie van IL-13 geassocieerd met een ernstiger ziektebeeld. Na experimentele infectie van de dieren met RSV kwamen RSV-specifieke (neutraliserende) anti-stoffen snel op, wat betekent dat de apen wel immunologisch geheugen hadden opgebouwd tegen RSV. Helaas bleek deze respons niet te leiden tot een aantoonbare bescherming tegen de RSV-infectie: de hoeveelheid virus in gevaccineerde dieren was vergelijkbaar met die in niet-gevaccineerde dieren. In twee van de vier BBG2Na- en beide FI-RSV-gevaccineerde apen werden na RSV-infectie in de longen eosinofiele granulocyten aangetoond, cellen die samenhangen met een allergische reactie. Het ging hierbij om dezelfde dieren waarbij ook IL-13 productie was gezien, maar ook hier waren de waarden lager in de BBG2Na-gevaccineerde apen dan bij de dieren gevaccineerd met FI-RSV. Uit deze studies is gebleken dat beide nieuwe vaccins niet genoeg bescherming boden en dat gezocht moet worden naar betere en veiligere vaccins of andere vaccinatiestrategieën.

Kortom: in dit proefschrift zijn studies beschreven, waarbij de afweerrespons tegen RSV-infecties is bestudeerd in relatie tot het vóórkomen of juist voorkómen van ziekte. De resultaten van deze studies kunnen een bijdrage leveren aan een beter begrip van de processen waarmee RSV-infecties ziekte veroorzaken en aan de verdere ontwikkeling van een RSV-vaccin.

