

# VU Research Portal

## Immune-mediated enteropathies

van Wanrooij, R.L.J.

2021

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

van Wanrooij, R. L. J. (2021). *Immune-mediated enteropathies: Clinical, diagnostic and pathogenic insights*.

### **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 ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### Introductie

Immuungemedieerde enteropathien zijn aandoeningen van de dunne darm die door een ongepaste en schadelijke (niet-infectieuze) immunologische reactie wordt veroorzaakt. Hierdoor ontstaat schade aan de darmvlokken waardoor de dunne darm zijn taak, absorptie van nutriënten en mineralen, niet meer adequaat kan uitvoeren. Patiënten met een enteropathie ervaren (ernstige) diarree, gewichtsverlies en vitamine deficiënties. In ernstige gevallen moeten patiënten worden opgenomen in het ziekenhuis voor intraveneuze vochttoeslag en parenterale voeding, en kan soms tot de dood leiden.

In **Deel I** van deze thesis wordt het spectrum van immuungemedieerde enteropathien beschreven. In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van immuungemedieerde enteropathien. Van deze aandoeningen is coeliakie de vaakst voorkomende en tevens ook meest bekende. Andere aandoeningen zijn auto-immune enteropathie, gewone variabele immunodeficiëntie, olmesartan-geassocieerde enteropathie, de ziekte van Crohn, eosinofiele gastroenteritis en graft-versus-host ziekte. De ongepaste immunologische reactie kan worden uitgelokt door gluten (coeliakie), olmesartan (olmesartan-gerelateerde enteropathie) of stamceltransplantatie (graft-versus-host ziekte) in genetisch gevoelige patiënten, hoewel er bij de andere aandoeningen (auto-immune enteropathie, indolent lymfoom) vooralsnog geen uitlokkende factoren bekend zijn. In de klinische praktijk blijkt het soms lastig om te differentiëren tussen deze aandoeningen omdat er overlap is tussen de verschillende ziektebeelden. Dit is met name relevant bij patiënten met coeliakie waarbij een klinische en histologische reactie op het glutenvrij dieet ontbreekt, al dan niet na een initiële goede reactie op het glutenvrij dieet. Bij deze patiënten dient nagegaan te worden of de diagnose coeliakie juist gesteld is en of zij dieetrouw zijn, en tevens moet het bestaan van andere enteropathien onderzocht worden. Indien de diagnose coeliakie bevestigd wordt en er worden geen andere enteropathien ontdekt, dan wordt een patiënt gediagnosticeerd met een refractaire coeliakie (RCD). Er wordt onderscheid gemaakt tussen een type 1 en type 2, waarbij er bij RCD type 2 premaligne monoclonale intraepitheliale lymfocyten (IEL) aanwezig zijn met een afwijkend fenotype, terwijl deze cellen ontbreken bij RCD type 1. Ongeveer de helft van de RCD type 2 patiënten ontwikkelt een enteropathie-geassocieerd T-cel lymfoom, wat een zeer sombere prognose heeft. Daarnaast gaat RCD type 2 gepaard met ernstige diarree en malabsorptie waardoor de 5-jaars overleving van deze patiënten met 58% drastisch verlaagd is. Derhalve is het zeer belangrijk om vroegtijdig de juiste diagnose te stellen zodat een eventueel (agressieve) behandeling met chemotherapie en eventueel autologe stamceltransplantatie kan worden geïnitieerd.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we 106 patiënten die in de periode 2006-2012 naar ons centrum zijn verwezen in verband met verdenking op refractaire coeliakie. Hierbij is opvallend dat er bij meer dan 20% van de patiënten nog aantoonbare dieetfouten werden gemaakt. Bij een derde van de patiënten werd een darmaandoening – anders dan (refractaire) coeliakie –

geïdentificeerd. Daarnaast blijkt er een groep patiënten met een langzaam histologisch herstel zonder klachten of deficiënties, die onderscheiden worden van patiënten met een langzaam of ontbreken van histologisch herstel die wel klachten van malabsorptie en/of deficiënties hebben en daardoor als refractaire coeliakie worden geclassificeerd. Dit betreft meestal RCD type 1 en deze patiënten hebben wel een behandelindicatie met (lokaal) immunosuppressieve middelen. Uiteindelijk werd in nog geen kwart van alle patiënten refractaire coeliakie vastgesteld, waarvan iets vaker (13%) RCD type 1 dan RCD type 2 (10%). Om een beeld te krijgen van de prevalentie van RCD in Nederland, werden alle Maag-, Darm-, en Leverafdelingen in Nederland gecontacteerd. Dit toonde dat hoewel RCD type 2 een ernstige ziekte is de prevalentie hiervan ook in Nederland erg laag is.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we 13 patiënten waarbij op volwassen leeftijd een autoimmune enteropathie (AIE) is vastgesteld en dit is de op één na grootste serie beschreven in de wereld. Onze data bevestigt dat AIE een ernstige aandoening is waarbij meer dan de helft van de patiënten moest worden opgenomen om tekort aan vocht en kalium intraveneus te suppleren in verband met ernstige diarree. Ook bleek parenterale voeding bij meer dan twee derde van de patiënten nodig. Histologische afwijkingen bestonden voornamelijk uit actieve chronische ontsteking met apoptotische lichamen en deficiënties van goblet en Paneth cellen. IgA en/of IgG anti-enterocyt antistoffen (AEA) waren aanwezig bij 80% van de AIE-patiënten, maar correleerden niet met de mate van vlokatrofie of klinische presentatie. We hebben AEA's ook getest in andere enteropathien waarbij deze ook werden geïdentificeerd, wat suggereert dat het een secundair fenomeen betreft als gevolg van T-cel gemedieerde weefselschade waardoor (auto)antigenen vrijkomen, en dientengevolge soms (auto)antistoffen worden geproduceerd. Bijna de helft van de patiënten was reeds gediagnosticeerd met een andere auto-immuun aandoening, en bij 85% van de patiënten werden systemische auto-immuun antistoffen gevonden, wat aanleg voor auto-immuniteit suggereert. Voor zover dat betrouwbaar vast te stellen is in een dergelijke kleine groep werd er wel opvallend vaak (79%) aanwezigheid van het HLA-DQ 2.5 genotype gezien.

Steroïden bleken in 62% van de patiënten effectief als inductie-remissie behandeling. Als onderhoudsbehandeling bleken thiopurines en budesonide effectief. In het geval dat steroïden faalden, werden verschillende immunosuppressieve medicamenten geprobeerd, allen helaas met wisselend effect. Eén patiënte was refractair voor meerdere medicamenten waarna zij een autologe stamceltransplantatie onderging en sindsdien is zij in remissie. Drie andere patiënten zijn ook in langdurige klinische remissie (3-7 jaar) zonder het gebruik van medicatie, nadat zij gedurende langere tijd behandeld werden met immunosuppressieve medicatie. Hoewel AIE zeer ernstig kan verlopen en bij drie patiënten (23%) door onbehandelbare malabsorptie ook tot de dood heeft geleid, lijken er ook 4 patiënten (31%) 'genezen' van AIE.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we een RCD type 1 patiënte die uit een uitzonderlijk grote, monoclonale populatie  $\gamma\delta$ -IELs in de dunne darm een extra-intestinaal T-cel lymfoom ontwikkelde. Normaliter ontwikkelen patiënten met RCDII, en niet met RCDI, een enteropathie-geassocieerd T-cel lymfoom waarvan gedacht wordt dat deze ontstaat uit de eerder genoemde aberrante IELs. Derhalve is het niet verrassend dat het lymfoom bij deze patiënte

unieke fenotypische en chromosomale kenmerken vertoont in vergelijking met de lymfomen die worden gezien bij RCD type 2. Deze bevinding toont dat intestinale lymfomen uit verschillende voorloper cellen kunnen ontstaan, en onderstrepen de noodzaak voor een nieuwer, completer classificatiesysteem voor enteropathie-geassocieerde T-cel lymfomen.

In **Deel II** zijn bestaande en nieuw ontwikkelde diagnostische testen geëvalueerd om de diagnosestelling alsmede het vervolg van RCD patiënten te verbeteren. In **hoofdstuk 5** worden technieken, die worden gebruikt om op basis van fenotype de premaligne IEL in de dunne darm te identificeren, met elkaar vergeleken. Immunohistochemie met CD3 en CD8 kleuringen op duodenumbipten wordt in de klinische praktijk het meest gebruikt en wordt vergeleken met de meer nauwkeurige flow cytometrische analyse van levende IELs. Hieruit blijkt dat de immunohistochemische bepaling adequaat 'grote' (indien aberrante IELs > 50% van totaal IELs zijn) aberrante IEL populaties kan identificeren, maar dat bij relatief kleinere populaties aberrante IELs (>20 <50% van totaal IELs) deze techniek slechts de helft correct identificeert. Van belang is dat ook deze kleinere populaties eenzelfde, hoog risico op EATL ontwikkeling hebben. Derhalve is voor differentiatie van RCD type 2 van RCD type 1 in de klinische praktijk immunohistochemische inferieur in vergelijking met flow cytometrische analyse.

Onderscheid tussen RCD type 2 en ongecompliceerde vormen van coeliakie kan tot nu toe alleen gemaakt worden door analyse van duodenumbipten die tijdens een gastroduodenoscopie verkregen zijn. Daarom hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of door middel van expressie van verschillende ontstekings-eiwitten in het perifere bloed onderscheid kon worden gemaakt tussen de verschillende vormen van (gecompliceerde) coeliakie. In patiënten met RCD type 2 bleek expressie van het pro inflammatoire cytokine IL-6 en ook van granzyme B verhoogd, maar bleken niet van waarde voor de klinische praktijk. In **hoofdstuk 7** werd geëvalueerd of er een serologische marker voor histologisch herstel konden worden ontwikkeld. Waar bij patiënten met ongecompliceerde coeliakie anti-tissue transglutaminase antistoffen geassocieerd zijn met histologisch herstel, is dit bij patiënten bij RCD per definitie niet het geval. De enige manier naast een klinische inschatting om herstel van patiënten te evalueren is een (belastende) gastroduodenoscopie met duodenumbipten. We testten de hypothese dat de vorming van antistoffen tegen voedselantigenen zou toenemen bij verminderde intestinale integriteit door mucosale schade. Hoewel de titers van antistoffen tegen voedselantigenen inderdaad hoger waren bij patiënten met coeliakie en RCD in vergelijking met gezonde controles, bleek de hoogte van de antistoffen niet goed te correleren met de mate van vlokatrofie en herstel hiervan.

In **Deel III** werd aandacht geschonken aan de immunopathogenese van (refractaire) coeliakie. In **hoofdstuk 8** werd onderzocht uit welke voorlopercellen de premaligne, aberrante IELs ontstaan door deze cel populatie fenotypisch te karakteriseren en het T-cel receptor (TCR) herschikkingspatroon te analyseren. De aberrante IELs toonde naast T-cel kenmerken fenotypisch ook NK cel eigenschappen. Aberrante IEL populaties waren opvallend heterogeen in welke fase van de TCR ontwikkeling ze waren ontspoord. Op basis van de mate van

ontwikkeling konden we vier groepen onderscheiden. Opvallend was dat alleen (alle) drie de patiënten uit de laatste groep, waarbij de TCR het meest ontwikkeld was later evolueerde tot een enteropathie-geassocieerd T-cel lymfoom. In **hoofdstuk 9** hebben we het cytokineprofiel in de dunne darm vergeleken tussen patiënten met RCD type 2 en coeliakie. We hypothetiseerden dat een glutenonafhankelijke inflammatie zoals bij RCD type 2 zou verschillen van een gluten-gedreven inflammatie bij coeliakie. Het cytokineprofiel van uit duodenumbiopsies geïsoleerde leukocyten van RCD type 2 patiënten was opvallend overeenkomstig met dat van patiënten met coeliakie, waarbij alleen een significant verschil in IL-13 productie werd gezien.

Een van de sterkste genetische associaties van coeliakie is met een polymorfisme gelegen nabij het *IL12A* gen. De interleukine 12 (IL-12) cytokine familie bestaat uit 4 verschillende cytokinen die alle bestaan uit heterodimeren. Sub units worden gedeeld binnen de IL-12 familie. Zo bestaat het pro-inflammatoire cytokine IL-12 uit IL-12p40 en IL-12p35 die respectievelijk worden gecodeerd door de genen *IL12A* en *IL12B*. Het eiwit IL-12p40 vormt samen met IL-23p19 een ander pro inflammatoire cytokine, namelijk IL-23. IL-12p35 kan op zijn beurt ook aan een ander eiwit binden, namelijk EB13, en zo het cytokine IL-35 vormen. Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van genetische associaties in de IL-12 familie met auto-immuunziekten, hebben we in **hoofdstuk 10** vanuit deze genen gekeken naar alle associaties die met de verscheidene auto-immuunziekten geïdentificeerd zijn. Hierbij viel op dat auto-immuunziekten clusteren in een tweetal groepen: een groep vertoont associaties met het *IL12A* gen wat betrokkenheid van T-helpercellen 1 en IL-35 impliceert, en de andere groep met *IL12B* en *IL23R* wat beïnvloeding van T-helpercellen 1 en T-helpercellen 17 suggereert. De grote meerderheid van de geïdentificeerde SNP's bleken in intronen ( $\approx 45\%$ ) of tussen genen in gelegen ( $\approx 43\%$ ) te zijn, en deze niet-coderende delen beïnvloeden de transcriptie van genen op manieren die een stuk lastiger te achterhalen zijn dan wanneer deze zich in een voor een eiwit coderend exon bevindt. In **hoofdstuk 11** hebben we getracht om het effect van SNP rs17810546 te achterhalen omdat deze een van de sterkste (niet-HLA) associaties heeft met coeliakie. Deze SNP bevindt zich in een zogenaamde 'enhancer site' van een aantal immuun regulerende cellen die het *IL12A* locus aflezen: monocyten, macrofagen en neutrofielen waardoor het voorstelbaar is dat deze SNP de herkenningsite van een transcriptie factor kan veranderen. We hebben 500 baseparen rondom deze SNP gekloneerd en hier transcriptie experimenten mee uitgevoerd die inderdaad onthulde dat deze klonen enorme downregulatie van transcriptie induceren. Vervolgens trachtten we de hiervoor verantwoordelijke transcriptie factor te identificeren. Met behulp van fylogenetische voetafdrukken selecteerde we een viertal transcriptiefactoren die we blokkeerden middels microRNA. Echter, bleek het blokkeren van geen van de factoren het down regulerende effect van de kloon ongedaan te maken, waardoor het op dit moment niet duidelijk is welke transcriptie factor verantwoordelijk is voor dit effect. Hierna hebben we onderzocht of *IL12A* een rol speelt in coeliakie. Expressie van *IL12A* in duodenumbiopsies van patiënten met coeliakie bleek significant hoger dan in die van controle patiënten. EB13 bleek de enige bindingspartner die ook in het weefsel aanwezig was (*IL12B*, *IL12-p27* waren niet of amper detecteerbaar), en de hoeveelheid EB13 correleerde ook met die van *IL12A*, wat tezamen suggereert dat IL-35 een rol speelt in coeliakie.