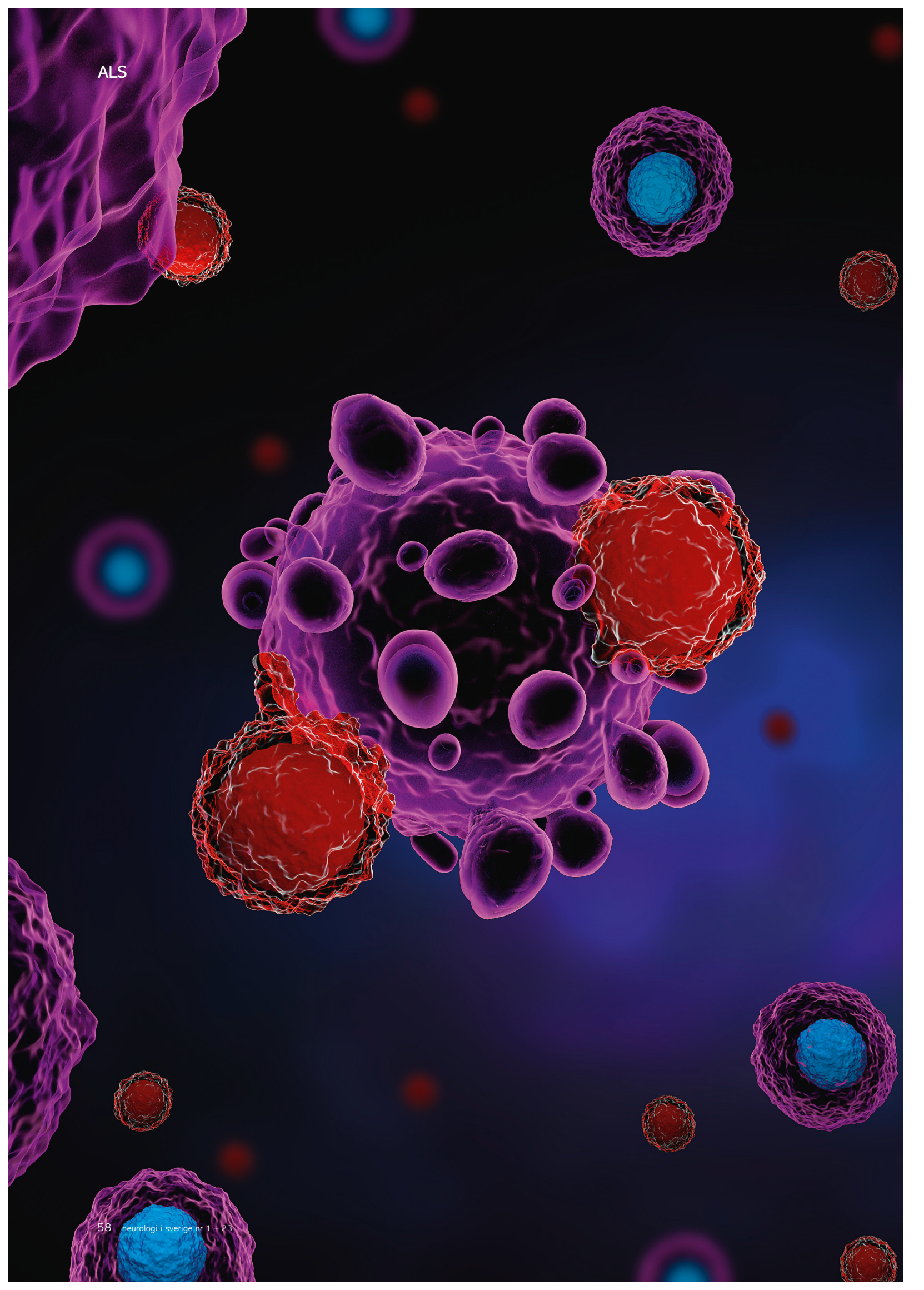
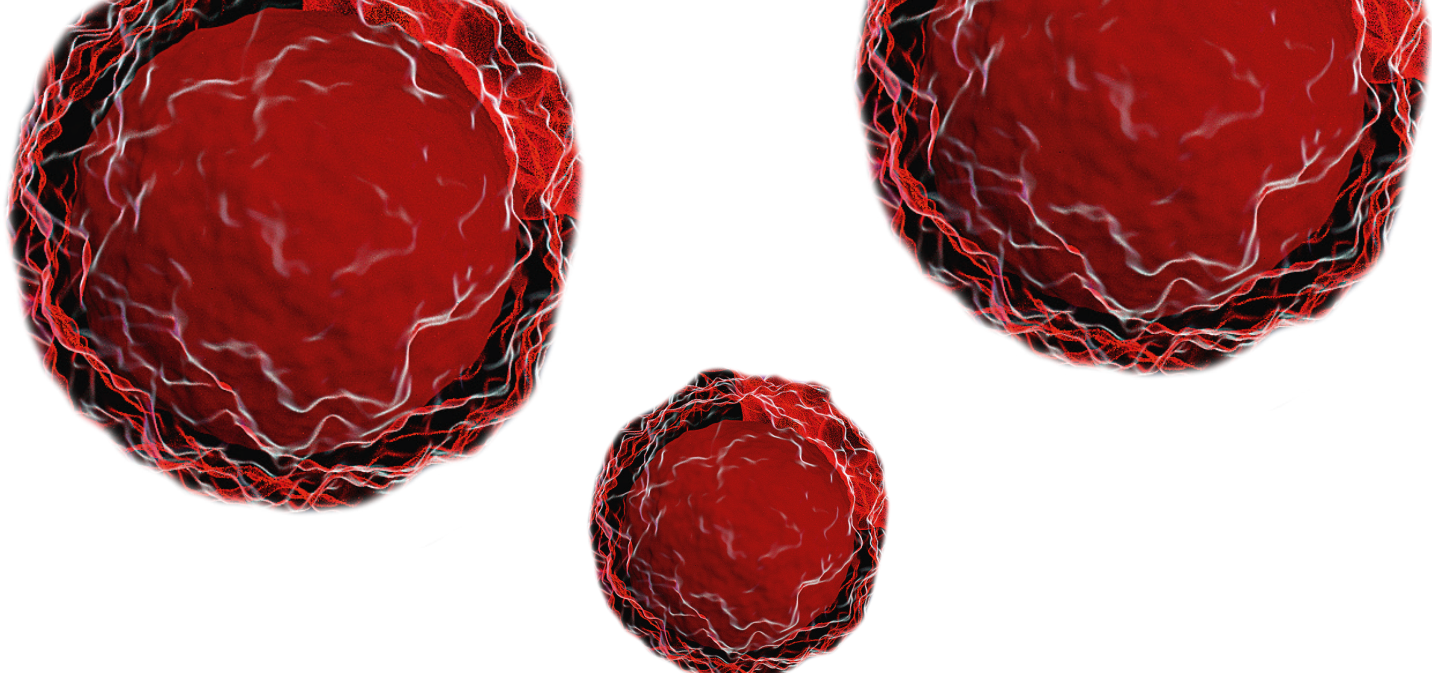


ALS





T-CELLSSVAR

vid diagnos av amyotrofisk lateral skleros förutsäger sjukdomsprogression

Liksom många andra neurodegenerativa sjukdomar förknippas amyotrofisk lateral skleros (ALS) med en rad inflammatoriska processer. Med tanke på det breda spektrum immun-celler som är involverade och hur få studier som gjorts på människor är den exakta rollen av immunsystemet i patogenesen av ALS inte helt klarlagd. Nyligen visade ett forskarteam vid Karolinska Institutet att andelen CD4⁺FOXP3⁻ effektor-T-celler (Teff) är associerad med dålig överlevnad, medan en hög andel aktiverade regulatoriska T-celler (Treg) är fördelaktig. Utöver detta kan sammansättningen av T-cellers undergrupper förutsäga sjukdomsprogression. Slutligen påvisade single cell-RNA-sekvensering närvaro av klonalt expanderande CD4⁺ cytotoxiska lymfocyter hos ALS-patienter, men inte hos kontroller.¹ **Solmaz Yazdani**, doktorand vid Institutet för miljömedicin på Karolinska Institutet och försteförfattare till studien, beskriver fynden i denna artikel.

Immunsystemet styrs genom en känslig balans mellan *proinflammatoriska* komponenter (Teff) som utlöser de inflammatoriska kaskaderna och *antiinflammatoriska* komponenter (såsom Treg) som ansvarar för att dämpa den överdrivna inflammationen och återställa homeostasen i kroppen. I vår senaste studie fokuserade vi på populationen av CD3⁺ T-lymfocyter. Det har tidigare visats att avlägsnande av T-celler i ALS-djurmodeller kan leda till snabbare progression av sjukdomen.^{2,3} Vidare har visats att Treg-cellerna var associerade med en långsammare sjukdomsprogression och förlängd överlevnad i en musmodell av ALS.² Flera kliniska

prövningar har visat lovande resultat för möjligheten att använda Treg-celler hos ALS-patienter.^{4,5}

I analysen inkluderade vi en kohort av 89 patienter med nydiagnostiserad ALS, mellan mars 2016 och mars 2020. Kliniska data hos studiedeltagarna erhöles genom det svenska kvalitetsregistret för motorneuronsjukdomar.⁶ Alla patienter följdes individuellt från diagnosdatum fram till dödsfall, användning av invasiv ventilation eller fram till den 7 oktober 2020, vid ALS Clinical Research Center vid Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm. Färskt blod och cerebrospinalvätska (CSF) samlades in från alla deltagare och med



hjälp av flödescytometri kartlades den fenotypiska repertoaren av vissa pro- och antiinflammatoriska immunceller.

Vad kan immuncellerna berätta om sjukdomsförloppet vid ALS?

ALS är en sjukdom med stor variation av förväntad livslängd. Därför är det en fördel att ha tillgång till prognostiska faktorer som kan ge en bättre insikt om sjukdomsförloppet. Av denna anledning studerade vi först sambandet mellan immunbiomarkörerna och överlevnad vid ALS. Vi fann att andelen CD4⁺ T-celler av totalt levande celler i blod visade ett omvänt samband med överlevnaden för ALS-patienterna (HR=1,49, 95% CI [1,05-2,11]), där den skadliga effekten primärt drevs av CD4⁺-effektor-T-celler (HR=1,58, 95% CI [1,10-2,27]). I motsats till tidigare studier observerade vi inte ett starkt samband mellan totala andelen Treg-celler och risk för död. Vi fann dock att en hög kvot mellan aktiverad Treg (aTreg) och vilande Treg (rTreg) var associerad med en lägre risk för dödsfall (HR=0,63, 95% CI= [0,41-0,98]) vilket tyder på att den skyddande rollen hos Treg-celler som tidigare noterats, sannolikt kan hänföras till aktiveringsstatusen.

Vi studerade vidare sambandet mellan immunceller och sjukdomsprogression med hjälp av ALS functional rating scale-revised (ALSFRS-R) som sjönk kontinuerligt med tiden. Patienterna med högre nivåer av aTreg och aTreg/rTreg-kvot, eller lägre nivåer av rTreg i blodet, hade en långsammare minskning av ALSFRS-R, jämfört med andra ALS-patienter. Å andra sidan uppvisade alla patienter med såväl lägre nivåer av Teff-celler som de med högre nivåer av Treg-celler i CSF en mindre uttalad minskning av

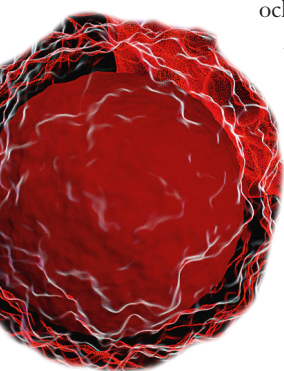
ALSFRS-R jämfört med patienter med motsatta cellmönster. Denna dubbla roll hos T-cellerna vid ALS kan delvis förklara varför kliniska prövningar med immunsuppressiva läkemedel mot ALS har misslyckats, eftersom dessa kan hämma både de gynnsamma och skadliga effekterna hos T-celler.

Kan immunprofilen i blod spegla immunprofilen i den intratekala miljön?

Tidigare studier om immunitet vid ALS har främst fokuserat på sammansättningen av leukocytundergrupper i blod med antagandet att det återspeglar immuniteten i det centrala nervsystemet. Därför testade vi om blod kunde fungera som en bra ersättare till immunprofilen i cerebrospinalvätska. Alla uppmätta T-cellsundergrupper var positivt korrelerade mellan blod och CSF med användning av Spearman-korrelation. Även om det faktum att korrelationskoefficienten varierade från 0,20 till 0,33 antyder att immunprofilen mätt i blod endast delvis förutsäger immunprofilen i den intratekala miljön. Därför bör framtida studier undersöka både blod och CSC för att få en mer omfattande förståelse av immunologiska processer vid ALS och andra hjärnsjukdomar.

Kan sammansättningen av T-celler i blod förutsäga sjukdomsprogression?

Förutom att studera T-cellsundergrupperna individuellt, försökte vi undersöka om sammansättningen av immuncellstyper också kan förutsäga sjukdomsförloppet. För detta ändamål gjorde vi en faktoranalys baserad på 5 faktorer. Dessa faktorer motsvarade 1) cellproliferation, 2) rTreg, 3) total Treg och aTreg, 4) effektor-T-celler och 5) FOXP3-expressionsnivåer. Vår analys visade att 10 procents ökning av poängen för faktor 2) (rTreg) var associerad med 14 procents högre risk för





Sammanfattningsvis visar denna studie att T-cellers sammansättning och funktionella status i blod och CSF kan förutsäga överlevnad och sjukdomsprogressionens hastighet vid ALS.

dödsfall (HR=1,14, 95% CI [1,02, 1,27]), medan faktorerna 1) och 5) visade statistiskt signifikanta samband med progressionen av ALSFRS-R efter diagnos. Vi bedömde vidare om T-cellsundergrupperna kunde hjälpa till att stratifiera unika patientgrupper med hjälp av en klusteranalys. Fyra kluster av patienter identifierades i denna analys, där två av klustren skiljde sig från de andra två med avseende på faktor 2) och sjukdomsprogressionshastighet. Följaktligen kan den sammansatta T-cellsprofilen i blod förutsäga sjukdomsutvecklingen vid ALS.

Hur svarar immunsystemet annorlunda hos ALS-patienter jämfört med kontroller?

Vi utförde single cell-RNA-sekvensering (scRNA-seq) på CSF-celler insamlade från ytterligare fem ALS-patienter och fyra kontroller (två patienter med normaltryckshydrocefalus och två icke-inflammatoriska kontroller, varav en patient med cervikal radikulopati och en frisk kontroll). Påfallande nog uppvisade ALS-patienter T-cellreceptorexpansion i CD4⁺ cytotoxiska lymfocyter såväl som i CD4⁺ och CD8⁺ T-celler med en aktiverad fenotyp, jämfört med kontroller. T-cellsexpansion i CSF verkar vara en egenskap hos ALS, vilket stärker uppfattningen att effektor-T-celler kan styra ett skadligt immunsvär i ALS. Ytterligare undersökningar visade att expanderade celltyper hade ett väsentligt ökat uttryck av speciella transkriptionsfaktorer såsom Eomesodermin, jämfört med icke-expanderade T-celler. Både kliniska studier och djurstudier tyder på att ALS initialt kännetecknas av ett neuroprotektivt Th2-svar som så småningom ersätts av ett proinflammatoriskt Th1/Th17-svar.⁷ Detta fynd kan ge en mekanistisk insikt om hur skiftet från Th2 till Th1 sker. Vi föreslår att styrkan och naturen hos T-cellreceptorigenkänningen under ALS underlättar differentieringen av antigen-specifikt Eomesodermin som uttrycker CD4⁺ cytotoxiska lymfocyter och Th1-celler.

AVSLUTANDE KOMMENTARER

I denna studie ingick en stor grupp patienter diagnostiserade på Karolinska Universitetssjukhuset från vilka både blod- och CSF-prover tagits inom tre månader från diagnosdatumet. Även om vi inte kunde inkludera alla nydiagnostiserade patienter, var de kliniska egenskaperna hos studiedeltagarna jämförbara med den för hela ALS-populationen inom samma region och kalenderperiod.

Sammantaget stärker våra observationer från de olika analyserna ömsesidigt uppfattningen att distinkta T-cellsfenotyper förutsäger sjukdomsprogression efter ALS-diagnos. Detta kan inte bara vara värdefullt för att bestämma hur patient-

vård ska hanteras utan också för att förstå sjukdomens mångfald i kliniska studier.

Studien lägger en grund för framtida forskning inom området. Den flödescytometriska analysen kan utökas till att omfatta fler leukocytundergrupper. Ytterligare studier behövs för att replikera scRNA-seq-analysen i en större mängd prover, inklusive både blod och CSF och en kontrollgrupp med mindre mångfald. Att studera immunsvaret under hela sjukdomen skulle vara av stor vikt för att kartlägga de tidsmässiga förändringarna av immunsvaret under sjukdomsförloppet av ALS. Även om det, med tanke på sjukdomens aggressiva natur, borde finnas ett starkt urval för patienter med långsammare sjukdomsprogression.

Sammanfattningsvis visar denna studie att T-cellers sammansättning och funktionella status i blod och CSF kan förutsäga överlevnad och sjukdomsprogressionens hastighet vid ALS. Observationen av T-cellers klonal expansion i det intratekala utrymmet representerar ett av de starkaste argumenten som hittills erhållits för en autoimmun sjukdomskomponent i ALS. Sammantaget, även om det är svårt att dra slutsatsen en orsakande roll för någon T-cellsundergrupp på ALS-prognosen i denna studie, på grund av dess observationella natur, stärker dessa fynd uppfattningen att T-cellsimmunitet är involverad i att modulera sjukdomsförloppet vid ALS och kan därför utgöra ett terapeutiskt mål. Funktionsundersökningar är dock fortfarande berättigade för att bättre förstå mekanismerna.



SOLMAZ YAZDANI

Doktorand vid Institutet för miljömedicin, Karolinska Institutet
solmaz.yazdani@ki.se

Referenser

1. Yazdani S, et al. T cell responses at diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis predict disease progression. *Nat Commun* 2022; 13:6733.
2. Beers DR, et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2011; 134:1293–1314.
3. Chiu IM, et al. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *PNAS* 2008; 105:17913–17918.
4. Thonhoff JR, et al. Expanded autologous regulatory T-lymphocyte infusions in ALS. A phase I, first-in-human study 5, 2018.
5. Thonhoff, J. R. et al. Combined Regulatory T-Lymphocyte and IL-2 Treatment Is Safe, Tolerable, and Biologically Active for 1 Year in Persons With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* 2022; 9.
6. Longinetti E, et al. The Swedish motor neuron disease quality registry. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* 2018.
7. Jin M, Günther R, Akgün K, Hermann A & Ziemssen T. Peripheral proinflammatory Th1/Th17 immune cell shift is linked to disease severity in amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports* 2020; 10:5941.

