



Samenvatting proefschrift Esmé Dijke

'Immune regulation after heart transplantation – Dynamics of regulatory T cells in the transplanted heart and peripheral blood'

Promotie: 14 januari 2009
Erasmus Universiteit Rotterdam

Promotor:
Prof. dr. W. Weimar

Co-promotor:
Dr. C.C. Baan

T cel gemedieerde regulatie van donor-reactieve cellen is één van de mechanismen die mogelijk betrokken is bij het ontstaan en behoud van tolerantie ten opzichte van het transplantaat na orgaantransplantatie. Onderzoek in de transplantatie immunologie richt zich dan ook op de identificatie en karakterisatie van regulatoire T cellen die de immuunreactiviteit gericht tegen donor antigenen kunnen onderdrukken. In proefdierodellen is al aangetoond dat deze cellen een rol kunnen spelen in het voorkomen van afstoting en het induceren van tolerantie. Kennis van de rol van regulatoire T cellen in immunologische processen in orgaantransplantatiepatiënten die behandeld worden met immunosuppressieve medicijnen is echter nog beperkt. Verder is het onduidelijk waar in het lichaam deze cellen een interactie aangaan met de cellen die de afstotingsreactie in gang zetten. In dit proefschrift hebben we de rol van regulatoire T cellen in de controle van immuunresponsen gericht tegen het transplantaat van hart-transplantatiepatiënten onderzocht. Voor het onderzoek hebben we ons gericht op twee plaatsen waar functionele regulatoire T cellen mogelijk aanwezig zijn, namelijk het getransplanteerde hart en het perifere bloed.

Het eerste gedeelte van het proefschrift omvat een algemene introductie en de opzet van het proefschrift. In **Hoofdstuk 1** beschrijven we de verschillende regulatoire T celpopulaties die in de afgelopen jaren geïdentificeerd zijn. Verder bespreken we de huidige literatuur over de aanwezigheid van functionele donor-gerichte regulatoire T cellen in de secundaire lymfoïde organen, het perifere bloed en het getransplanteerde orgaan. Ook wordt het doel van ons onderzoek behandeld.



In het tweede gedeelte van dit proefschrift hebben we de aanwezigheid van regulatoire T cellen in het getransplanteerde hart onderzocht. In **Hoofdstuk 2** vroegen we ons af of de aanwezigheid van deze cellen geassocieerd is met immunologische processen, zoals immunologische rust en acute afstoting. We vonden dat de genexpressie van FOXP3, een gen dat betrokken is bij de ontwikkeling en functie van regulatoire T cellen, hoger was in biopten met histologische tekenen van acute afstoting dan in biopten waarin geen beschadiging aan het hartspierweefsel was waargenomen. Ook de genexpressie van andere regulatoire T cel geassocieerde markers (CD25, GITR, CTLA-4) was hoger in afstotingsbiopten dan in de biopten zonder afstoting. De relatie van hoge FOXP3 genexpressie met acute afstoting, maar niet met immunologische rust, suggereert dat FOXP3+ T cellen in het transplantaat acute afstoting niet voorkomen, maar een respons zijn op anti-donor effector T cel activiteit.

In **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4** onderzochten we of lymfocyten met functionele regulatoire activiteiten daadwerkelijk aanwezig zijn in het transplantaat tijdens acute afstoting. In Hoofdstuk 3 wordt een preliminaire studie beschreven waarin we bekeken hebben of FoxP3+ transplantaat (graft) lymfocyten (GL) gekweekt kunnen worden uit biopten met histologische tekenen van acute afstoting. We vonden dat een gedeelte van de geëxpandeerde GL (2-17%) FoxP3-eiwit tot expressie bracht. In Hoofdstuk 4 werden de geëxpandeerde GL kweken getest op hun regulatoire activiteit op allogene immuunresponsen. We constateerden dat, wanneer GL zelf niet groeiden na stimulatie met donor antigenen, deze cellen de anti-donor T cel proliferatie van lymfocyten uit het perifere bloed onderdrukten, maar niet de T cel proliferatie gericht tegen andere 'vreemde' antigenen (derde partij antigenen). Verdere analyses van GL subsets om te onderzoeken welke subpopulatie verantwoordelijk was voor de suppressie lieten zien dat de CD8+ GL de anti-donor response sterk remden. De CD4+ GL van de geëxpandeerde kweken waren niet suppressief. Fenotypische karakterisatie van CD8+ GL toonde aan dat FoxP3+ cellen aanwezig waren in deze populatie (mediaan: 2.2%). Tijdens een acute afstoting van een getransplanteerd hart bestaan lymfocytenpopulaties in het transplantaat dus niet alleen uit transplantaat-vernietigende effector T cellen, maar ook uit cellen die de potentie hebben om een anti-donor immuunrespons te onderdrukken en zo de schade mogelijk kunnen beperken.

In deel drie van het proefschrift hebben we de frequentie en functie van regulatoire T cellen in het perifere bloed van harttransplantatiepatiënten bestudeerd. In **Hoofdstuk 5** onderzochten we of de FOXP3 genexpressie in het bloed geassocieerd is met anti-donor immuunresponsen. De expressielevel kan dan mogelijk gebruikt worden voor non-invasieve detectie van immunologische processen die in het transplantaat plaatsvinden. We vonden echter, in tegenstelling tot de FOXP3 genexpressie in het transplantaat, geen relatie tussen de perifere FOXP3 genexpressie en de immunologische processen in het transplantaat. Dit gen lijkt daardoor geen potentiële kandidaat voor non-invasieve diagnose van immunologische rust of afstoting.



In **Hoofdstuk 6** bestudeerden we de klinisch relevante rol van perifere regulatoire T cellen in de controle van acute afstoting. Voor dit onderzoek hebben wij ons gericht op de CD4+CD25bright+FoxP3+ regulatoire T cellen. Het fenotype en de immuunregulatoire functie van deze cellen van patiënten die vrij bleven van acute afstoting werden vergeleken met dat van CD4+CD25bright+FoxP3+ T cellen van patiënten die minstens één acute afstotingsreactie doormaakten in het eerste jaar na transplantatie. Fenotypische verschillen werden gevonden in expressie van CD127: de CD4+CD25bright+FoxP3+ regulatoire T cellen van afstoters hadden een hogere eiwitexpressie van deze marker dan dezelfde cellen van niet-afstoters. Functionele analyses lieten zien dat de CD4+CD25bright+ T cellen van afstoters een lagere suppressieve capaciteit hadden vergeleken met de CD4+CD25bright+ cellen van niet-afstoters. Analyses van perifere bloedcellen afgenomen voor de transplantatie toonden dat de CD4+CD25bright+ T cellen van afstoters al een inadequate immuunregulatoire functie hadden voor transplantatie dan dezelfde cellen van niet-afstoters. De bevindingen van deze studie doen vermoeden dat de functie van circulerende CD4+CD25bright+FoxP3+ regulatoire T cellen belangrijk is voor het voorkomen van acute afstotingen na harttransplantatie.

Om te bepalen of harttransplantatiepatiënten enkele jaren na transplantatie een verlaagde immuunrespons gericht tegen donor antigenen hebben, onderzochten wij in **Hoofdstuk 7** de potentiële donor-specifieke proliferatieve en cytotoxische T cel responsen van perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC) die lang na transplantatie verzameld zijn (mediaan: 4 jaar). Daarnaast is de genexpressie van FOXP3, GITR en het immunoregulatoire cytokine IL-10 bestudeerd. Ofschoon de meeste PBMC een proliferatieve response hadden gericht tegen zowel donor als derde partij antigenen, vertoonde een groot gedeelte van de patiënten een verlaagde donor-specifieke cytotoxische responsiviteit dat niet opgeheven kon worden door het toevoegen van IL-2 of IL-15. De genexpressie van IL-10, maar niet van FoxP3 of GITR, was hoger na stimulatie met donor antigenen, dan na stimulatie met derde partij antigenen. Deze hoge IL-10 genexpressie was gerelateerd aan de verlaagde cytotoxische responsiviteit gericht tegen donor antigenen, wat een rol suggereert voor IL-10 producerende regulatoire cellen enkele jaren na harttransplantatie.

In dit proefschrift hebben we aangetoond dat cellen met immuunregulatoire capaciteiten aanwezig zijn in zowel het perifere bloed als in het getransplanteerde orgaan van harttransplantatiepatiënten. Verschil in FOXP3 genexpressie in het hart tussen immunologische rust en een allogene immuunrespons doet vermoeden dat de aanwezigheid van regulatoire T cellen in het transplantaat afhankelijk is van de immunologische staat van de patiënt. De FOXP3 genexpressie in het transplantaat is hoog tijdens een acute afstoting. Dit staat in tegenstelling tot de bevindingen in proefdiermodellen waarin hoge FOXP3 genexpressie in het transplantaat juist geassocieerd is met tolerantie. Functionele analyses van lymfocyten die in het hart



aanwezig zijn tijdens een acute afstoting lieten zien dat deze populatie inderdaad cellen bevat die de potentie hebben de anti-donor immuunrespons te onderdrukken. Dus in patiënten lijkt immuunregulatie in het getransplanteerde orgaan tot uiting te komen tijdens allogene reactiviteit. Cellen met potentiële regulatoire activiteiten spelen in het transplantaat dus waarschijnlijk eerder een rol in het beperken van de schade aan hartspiercellen, dan dat ze acute afstoting voorkomen. Daartegenover vonden we dat de functie van regulatoire T cellen in het perifere bloed mogelijk belangrijk is voor het voorkomen anti-donor immuunreactiviteit. Patiënten die vrij bleven van acute afstoting hadden krachtigere onderdrukkende perifere CD4+CD25^{bright}+FoxP3⁺ regulatoire T cellen dan patiënten die minstens één acute afstotingsreactie doormaken in het eerste jaar na harttransplantatie. Verder was de aanwezigheid van IL-10 producerende cellen in het perifere bloed geassocieerd met een verlaagde cytotoxische responsiviteit.

Gebaseerd op de resultaten van dit proefschrift, en ondersteund door bevindingen beschreven door anderen, stellen wij de volgende hypothese over de rol van regulatoire T cellen in de controle van immuunresponsen gericht tegen het transplantaat. Tijdens immunologische rust circuleren regulatoire T cellen tussen de secundaire lymfoïde organen, het bloed en het getransplanteerde orgaan. Op deze plaatsen onderdrukken de regulatoire T cellen zowel de activatie als de expansie van donorreactieve T cellen, waardoor een immuunrespons gericht tegen donor antigenen voorkomen wordt. Wanneer circulerende regulatoire T cellen echter niet in staat zijn om de activatie van effector T cellen te onderdrukken en de anti-donor immuunrespons uit de hand gaat lopen, wordt er een tweede lijn van regulatie geïnitieerd: regulatoire T cellen migreren naar het transplantaat en adaptieve regulatoren ontstaan mogelijk op deze plaats om zo de schade van transplantaat-vernietigende effector T cellen te beperken. Op deze wijze spelen regulatoire T cellen een rol in de controle van anti-donor reactiviteit tijdens verschillende stadia van een immuunrespons.

In de afgelopen 30 jaar zijn verschillende regulatoire T celpopulaties geïdentificeerd. In orgaantransplantatie heeft de aandacht zich vooral gevestigd op de rol van CD4+CD25^{bright}+FoxP3⁺ regulatoire T cellen in het ontstaan van tolerantie ten opzichte van het transplantaat. Toch blijkt uit klinische studies dat ook andere regulatoire T celpopulaties, zoals CD8+CD28-FoxP3⁺ suppressor T cellen en Type-1 regulatoire T cellen, betrokken zijn bij de controle van anti-donor immuunresponsen. In onze experimenten vonden wij dat perifere CD4+CD25^{bright}+FoxP3⁺ regulatoire T cellen mogelijk een rol spelen in het onderdrukken van anti-donor reactiviteit kort na transplantatie. Enkele jaren na transplantatie zagen we dat IL-10 producerende cellen ook betrokken kunnen zijn in anti-donor immuunregulatie. In het getransplanteerde hart was bewijs gevonden voor CD8⁺ cellen met potentiële immuunregulatoire activiteiten. Deze bevindingen suggereren dat meerdere regulatoire T celpopulaties een rol spelen in de controle van allogene immuunreactiviteit.

De publicatie van dit proefschrift werd in 2008 gesponsord met een bijdrage van de Nederlandse Transplantatie Vereniging.



Wij concluderen dat in harttransplantatiepatiënten verschillende regulatoire T celpopulaties die aanwezig zijn in het perifere bloed en het getransplanteerde hart een rol spelen in immunologische processen, zoals immunologische rust en acute afstoting. ◀

*Deze samenvatting is afkomstig van de website van de Nederlandse Transplantatie Vereniging
www.transplantatievereniging.nl*