



Donor-Reactive T-cell
Responses after HLA-Identical
Living-Related Kidney
Transplantation



Jeroen H. Gerrits

Samenvatting proefschrift
Jeroen H. Gerrits

‘Donor-reactive T-cell responses after HLA-identical living-related kidney transplantation’

Promotiedatum: 8 januari 2010
Erasmus Universiteit, Rotterdam

Promotor:
Prof.Dr. W. Weimar

Co-promotor:
Dr. N.M. van Besouw

Na HLA-identieke familiertransplantaties (HLA-identieke NTx) zijn alle belangrijke HLA moleculen tussen donor en ontvanger gelijk, maar er kunnen wel verschillen zijn in niet-HLA antigenen, zoals minor histocompatibiliteitsantigenen (mHAGs). mHAGs zijn genetisch overgeërfde peptiden die afkomstig zijn uit polymorfe, intracellulaire eiwitten en worden gepresenteerd in het HLA molecuul, dat zich op het celoppervlak bevindt. mHAGs kunnen worden herkend door patiënten T cellen en zij kunnen daarom een immuunrespons induceren. De klinische relevantie van mHAGs na HLA-identieke NTx is echter nog onbekend en het zou kunnen dat verschillen in mHAGs of andere niet-HLA antigenen bij deze patiënten kan leiden tot afstoting van de getransplanteerde nier. Daardoor ontvangen deze patiënten nog steeds een onderhoudsdosering aan immunosuppressieve medicatie. Vanwege de ernstige bijwerkingen van immuno-suppressie, is het belangrijk om patiënten te identificeren bij wie de immunosuppressieve medicatie op een veilige manier kan worden verminderd. Dit kan door het monitoren van aanwezige immunologische reactiviteit gericht tegen donorcellen m.b.v. niet-invasieve cellulaire testen die gebruik maken van patiënten- en donorcellen (**Hoofdstuk 1**). Het hoofddoel van dit proefschrift was het onderzoeken van de klinische relevantie van donorgesichte T-cel reactiviteit tegen mHAGs na HLA-identieke NTx en tijdens vermindering van immunosuppressie bij deze patiënten (**Hoofdstuk 2**).

In het *eerste deel* hebben we de T-cel reactiviteit gericht tegen donorantigenen gedurende het eerste jaar na HLA-identieke NTx onderzocht. In **Hoofdstuk 3 en 4** wordt aangetoond dat donor-reactieve cytokine producerende cellen kunnen worden gemeten in perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC) van HLA-identieke NTx.



Hierbij daalden de donor- en de 3^e-partij reactiviteit niet gedurende het eerste jaar na transplantatie. Verder laat **Hoofdstuk 4** zien dat het aantal donor-reactieve IL-10 producerende cellen bij de HLA-identieke groep significant hoger was dan de autologe reactiviteit. Deze frequentie was ook hoger dan de frequentie in de niet-HLA identieke groep en gezonde individuen. Er werden geen relatie gevonden met het aantal cytokinen producerende cellen in PBMC van HLA-identieke patiënten en bekende mHAg verschillen (HA-1, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1, ACC-1, ACC-2, HwA-9, HwA-10, UGT2B17 and HY) tussen donor and ontvanger. Studies na HLA-identieke NTx hebben laten zien dat de aanwezigheid van donorreactief IL-10 mogelijk tot tolerantie kan leiden. Omdat hoge aantallen donor-reactieve IL-10 producerende cellen worden gevonden in combinatie met lage aantallen IFN- γ , GrB en IL-13 producerende cellen, wordt aangenomen dat niet Th2 cellen, maar Tr1 cellen een rol kunnen spelen na HLA-identieke familiertransplantatie. Onze resultaten suggereren dat IL-10 een rol speelt bij het actief onderdrukken van immunoreactiviteit gericht tegen donorantigenen tijdens immunologische rust.

In **Hoofdstuk 5** hebben we laten zien dat met een eiwit-array in het supernatant van donorgestimuleerde MLR, 38 van de 42 (90%) eiwitten een hogere donor- dan de autologe reactiviteit. We veronderstellen dat deze responsen zijn gericht tegen mHAg's of andere niet-HLA antigenen.

In de literatuur wordt beschreven dat monitoren van circulerende dendritische cellen [myeloïde DC (mDC) en plasmacytoïde DC (pDC)] en de ratio pDC/mDC in het perifere bloed van transplantatiepatiënten mogelijk patiënten kan identificeren bij wie de immunosuppressieve geneesmiddelen kunnen worden verminderd. Omdat het praktisch en mogelijk ook nauwkeuriger is om sequentiële bloedmonsters van één patiënt in één flowcytometrische meting te bepalen, hebben we onderzocht of de pDC/mDC ratio wordt beïnvloed door cryopreservatie van cellen van gezonde individuen en niertransplantatiepatiënten (**Hoofdstuk 6**). In beide groepen vonden we dat de pDC/mDC ratio en de maturatie status van DC werd beïnvloed door het manipuleren van PBMC, zoals Ficoll isolatie en cryopreservatie. Immunosuppressie had geen invloed op de resultaten. Deze resultaten laten zien dat bij voorkeur verse bloedmonsters moeten worden gebruikt voor het monitoren van DC.

In *deel 2* hebben we het effect van vermindering van de immunosuppressieve medicatie bij ontvangers van een HLA-identieke familiertransplantaat op de donor-reactieve T-cel respons onderzocht.

Het gebruik van immunosuppressieve geneesmiddelen kan leiden tot zeer ernstige bijwerkingen. Daarom is het wenselijk zo weinig mogelijk immunosuppressie te geven zonder dat dit leidt tot afstoting van het donororgaan. Volgens de literatuur leidt vermindering of stoppen van immunosuppressieve medicatie na orgaantransplantatie tot een toename in donongerichte T-cel reactiviteit. Volledig stoppen van de immunosuppressieve medicatie is slechts beschreven in een klein aantal niertransplantatiepatiënten die lang na transplantatie een stabiele nierfunctie hadden en geen klinische tekenen van afstoting vertoonden. Er is echter geen literatuur beschikbaar over de noodzakelijke hoeveelheid immunosuppressieve medicatie bij ontvangers van een HLA-



identieke familiertransplantaat. Tevens is het onbekend of de donorgerichte T-cel reactiviteit wordt beïnvloed na het verminderen van immunosuppressie bij deze patiënten (**Deel II**). Op onze polikliniek wordt een groep HLA-identieke familiertransplantatiepatiënten gecontroleerd die azathioprine (AZA) en corticosteroiden als immunosuppressieve onderhoudstherapie gebruikten. Allen waren meer dan 2 jaar na transplantatie. We hebben eerst de AZA dosering verminderd tot 50% van de originele dosering. Bij deze patiënten werd het effect van vermindering van de AZA dosering op de nierfunctie en de T-cel reactiviteit tegen donorcellen onderzocht (**Hoofdstuk 7 en 8**). De HLA-identieke patiënten bleven vrij van acute afstoting en de nierfunctie bleef stabiel na vermindering van AZA. Zowel voor als na vermindering van AZA bleef het aantal donor-actieve GrB producerende cellen onveranderd. Opmerkelijk was dat vóór vermindering van de AZA dosering slechts 20% van de patiënten reageerde op donorcellen, terwijl dit na vermindering van de AZA dosering 57% van de patiënten besloeg. Het aantal GrB producerende cellen gericht tegen 3^e-partij antigeen nam eveneens toe na vermindering van de AZA dosering (**Hoofdstuk 7**). Er werd echter geen toename geconstateerd in het aantal donor, 3^e-partij en tetanus toxoid (TET)-reactieve IFN- γ en IL-13 producerende cellen (**Hoofdstuk 8**). Daarnaast vonden we geen relatie tussen het aantal donor-actieve cytokinen en het aantal bekende mHAg verschillen tussen donor en ontvanger.

Omdat alle HLA-identieke patiënten vrij bleven van acute afstoting, de nierfunctie stabiel bleef en geen toename in donorreactiviteit werd gevonden na vermindering van de AZA dosering, vroegen wij ons af of de immunosuppressieve medicatie nog verder kon worden verminderd (**Hoofdstuk 9 en 10**). Daarom werden patiënten die tenminste 1 jaar na transplantatie waren eerst op AZA (50 mg/dag) of mycofenolaat mofetil (MMF; 500 mg/dag) therapie gezet in combinatie met 5 mg/dag prednisolon. Het volledig stoppen van AZA of MMF was succesvol bij 85% (23/27) van de patiënten (**Hoofdstuk 9**). Alle patiënten bleven vrij van acute afstoting en de nierfunctie bleef stabiel, ook na 24 maanden follow-up. Daarnaast lieten andere klinische parameters, zoals bloeddruk, serum lipiden (LDL, HDL en triglyceriden) concentraties, glucose, HbA1c en CRP, geen verandering zien vanaf inclusie tot 24 maanden op monotherapie steroïden. Wel ontwikkelde 15% van de patiënten (4/27) terugkeer van hun oorspronkelijke ziekte. Dit percentage was echter vergelijkbaar met de terugkeer van de oorspronkelijke ziekte uit een andere klinische studie bij HLA-identieke familiertransplantatiepatiënten die hun hoge dosering immunosuppressie bleven behouden.

In **Hoofdstuk 10** hebben we aangetoond dat het stoppen van AZA of MMF geen significant effect had op de aantallen donor, 3^e-partij en TET-actieve IFN- γ en GrB producerende cellen. Opmerkelijk was dat het aantal donor, 3^e-partij en TET-actieve IL-10 producerende cellen steeg ten tijde van monotherapie steroïden. Blijkbaar onderdrukt AZA en MMF IL-10. AZA en MMF zijn anti-proliferatieve middelen en kunnen ook een effect hebben op de cytokinenproductie van lymfocyten.



Tevens vonden we dat het stoppen van AZA of MMF geen effect had op de absolute aantallen mDC en pDC en de pDC/mDC ratio. De maturatie status van DC subsets was veranderd naar een meer matuur fenotype, hetgeen suggereert dat AZA en MMF de fenotypische maturatie van DC onderdrukt. *In vitro* studies hebben eveneens aangetoond dat AZA en MMF de fenotypische maturatie van DC beïnvloedt.

Gezien de ernstige bijwerkingen van langdurig gebruik van immunosuppressiva en de goede klinische en laboratorium resultaten na afbouw en zelfs het volledig stoppen van AZA of MMF, stellen wij voor de immunosuppressieve medicatie (calcineurine inhibitors [CNI], AZA of MMF) 1 jaar na transplantatie stapsgewijs te stoppen bij HLA-identieke NTx patiënten. Een lage dosering monotherapie steroïden (5 mg/dag) zou voldoende moeten zijn, op voorwaarde dat de patiënten een stabiele nierfunctie hebben en geen eiwit in de urine vertonen. Hierdoor zullen deze patiënten niet meer langdurig worden blootgesteld aan de ernstige bijwerkingen van immunosuppressiva. Patiënten met een glomerulaire nierziekte als oorspronkelijk lijden, zullen regelmatig poliklinisch moeten worden gecontroleerd om indien nodig de immunosuppressieve therapie aan te passen om terugkeer van de oorspronkelijke ziekte te voorkomen. In de toekomst zou moeten worden onderzocht of het volledig stoppen van de corticosteroïden mogelijk is bij ontvangers van een HLA-identieke NTx. In onze studiepopulatie hebben we inmiddels 2 HLA-identieke patiënten die ook volledig gestopt zijn met hun corticosteroïden medicatie. Deze patiënten zijn nu 3 jaar geheel zonder medicatie, zijn vrij gebleven van afstoting en hebben een stabiele nierfunctie.

Samenvattend hebben we laten zien dat T-cel reactiviteit tegen donorcellen kunnen worden aangetoond na HLA-identieke familieniertransplantatie. Deze responsen bleken echter niet gerelateerd te zijn aan de bekende mHAg verschillen (**Hoofdstuk 3, 4, 8, 10, 11**). Deze resultaten komen overeen met een studie van Heinold *et al.* die laat zien dat bekende mHAg verschillen geen invloed hebben op de 5-jaars transplantaatoverleving na het ontvangen van een overleden of een levende familieniertransplantatie. Andere studies laten een associatie zien met mHAg verschillen en acute afstoting, chronische afstoting en transplantaatfalen. Zij analyseerden deze associaties bij patiënten die een niertransplantaat ontvingen van een overleden donor en niet bij HLA-identieke koppels. Daarom kan er niet worden uitgesloten dat de gevonden associatie werd veroorzaakt door HLA verschillen, zoals HLA-Cw, HLA-DQ en HLA-DP, in plaats van mHAg verschillen tussen donor en ontvanger.

In onze studies konden we m.b.v. de Elispot test, tijdens immunologische rust, donorgesichte T-cel reactiviteit worden gedetecteerd in PBMC van HLA-identieke NTx patiënten (**Hoofdstuk 3, 4, 7, 8, 10**). Opmerkelijk was dat er een negatieve correlatie ($r_s = -0.41$; $p = 0.03$) werd gevonden tussen het aantal donorreactieve IL-10 producerende cellen en tijd na HLA-identieke NTx. Dit was gemeten voor vermindering van immunosuppressie.



Voor IFN- γ en GrB werd dit niet gevonden. Daarna resulteerde het stoppen van AZA of MMF bij deze patiënten in een toename van het aantal donorreactieve IL-10 producerende cellen (**Hoofdstuk 10**). Deze resultaten suggereren dat er immuunreactiviteit aanwezig is gericht tegen donorantigenen tijdens het eerste jaar na

transplantatie en tijdens het stoppen van immunosuppressiva. Dit zou kunnen betekenen dat de aanwezige immuunreactiviteit actief wordt onderdrukt door donorreactief IL-10 bij HLA-identieke NTx patiënten. Een aantal andere studies heeft ook donorreactief IL-10 bij ontvangers van een HLA-identieke NTx aangetoond, dat mogelijk tot tolerantie kan leiden.

Het grote pluspunt van onze studies is dat geen van de HLA-identieke patiënten een acute afstoting heeft doorgemaakt na het stoppen van AZA en MMF therapie. Daarom hebben we de klinische relevantie van de Elispot test in het voorspellen van acute afstoting niet kunnen aantonen voor deze specifieke patiëntengroep.

Concluderend kunnen we zeggen dat in het perifere bloed van ontvangers van een HLA-identieke familiertransplantaat T-cel reactiviteit tegen donorcellen kan worden aangetoond. Deze reactiviteit kan niet worden gerelateerd aan het aantal bekende mHAg verschillen tussen donor en ontvanger. Hoge aantallen donorreactieve IL-10 producerende cellen suggereert een actieve onderdrukking van immuunreactiviteit, gericht tegen mHAgs en andere niet-HLA antigenen. Bij deze patiënten kunnen de CNI, MMF en AZA doseringen stapsgewijs 1 jaar na transplantatie veilig worden stopgezet; een lage dosering corticosteroïden blijkt voldoende voor een stabiele nierfunctie.