



Samenvatting proefschrift Anne Bouvy

“Immune Modulation after T-cell Depletion Therapy in Kidney Transplant Patients”

**Promotie: 28 juni 2016
Erasmus Universiteit Rotterdam**

Promotor:
Prof. dr. C.C. Baan
Prof. dr. W. Weimar

Om afstoting van een niertransplantaat te voorkomen worden patiënten levenslang behandeld met immunosuppressieve, oftewel afweerderdrukkende therapie. In de loop der jaren zijn de immunosuppressieve medicijnen sterk verbeterd waarmee een steeds betere overleving van het transplantaat werd behaald. Helaas hebben deze medicijnen ook ongewenste bijwerkingen zoals een verhoogde kans op infecties en maligniteiten. Dit proefschrift gaat over immuunsuppressiva die de T-cellen van het afweersysteem verwijdert uit het bloed; T-cel depletie therapie. T-cel depletie therapie wordt gegeven rondom de operatie als inductietherapie en, wanneer een transplantaat wordt afgestoten, als anti-rejectie therapie. Naast het acuut verwijderen van T-cellen, maar ook NK-cellen en soms zelfs B-cellen, geeft deze therapie ook langdurige immuunsuppressieve effecten. We bekeken de mate van depletie van T-, B- en NK-cellen bekeken en onderzochten de repopulatiemechanismen en functies van T-cellen. Tevens hebben we gekeken naar immuunmodulatie; mechanismen die het langdurige immuunsuppressieve effect van T-cel depletie therapie kunnen verklaren.

De meest gebruikte T-cel depletie therapie is rabbit antithymocyte globulin (rATG) en alemtuzumab. Ondanks dat rATG al jaren gebruikt wordt in de kliniek is er geen consensus over de optimale dosering; de dosis waarbij effectiviteit en risico op bijwerkingen in de juiste balans zijn. Wij bekeken het effect van verschillende doses rATG op het aantal T, B en NK cellen. Alle rATG doseringen depteerden T- en NK-cellen, het aantal B-cellen daarentegen was niet aangedaan. De terugkomst van NK- en T-cellen verschilde; na 1 week was het aantal NK-cellen in alle groepen weer op het oude niveau terwijl het terugkomen van de T-cellen verschilde van 1 maand in de ultra laag gedoseerde groep tot meer dan een jaar in de groep met de standaard dosering rATG. Deze resultaten laten zien dat voor T-cel depletie voor een aantal maanden minder hoge doseringen rATG gebruikt kunnen worden dan op dit moment standaard zijn in de kliniek.

T-cellen ontstaan door thymopoïese; de nieuwvorming van T-cellen in de thymus en homeostatische proliferatie; het delen van aanwezige naïeve en geheugen



T-cellen in de circulatie. Na depletietherapie vonden we dat thymopoïese niet verschilde tussen de patiënten groepen. Wel was er een verschil in de mate van homeostatische proliferatie, de eerste maanden na transplantatie was deze hoger na rATG behandeling dan in de andere groepen. Dit effect doofde na 3 tot 6 maanden uit, interessant omdat op dit moment het aantal cellen nog niet op het oude niveau terug was. Proliferatie van T-cellen in het bloed is het gevolg van stimulatie met antigeen of stimulatie met cytokinen, oplosbare factoren die belangrijk zijn voor de activatie, proliferatie en delingsactiviteit van cellen. Onze studie toonde aan dat voor zowel naïeve als geheugen T-cellen stimulatie met cytokinen belangrijk is.

De gerepopuleerde T-cel populatie bestaat voornamelijk uit CD8+ geheugen T-cellen. Naast deze toename in effector cellen wordt na depletie therapie ook een toename gezien in het aantal regulatoire T-cellen (Treg). Treg zijn belangrijk in het reguleren van immuunresponsen; ze onderdrukken effector cellen en voorkomen daarmee onder andere auto-immuunziekten, overbodige immuunreacties tegen lichaamseigen weefsel. In onze studie vonden we dat de toename van Treg na rATG behandeling niet het resultaat was van een verhoogde thymopoïese maar van een toename aan homeostatische proliferatie. Na basiliximab, een niet T-cel depleterend immuunsuppressivum werden minder Treg gevonden. Naast toegenomen homeostatische proliferatie van Treg vonden we ook meer geïnduceerde Treg (induced Treg; iTreg) in het bloed van rATG behandelde patiënten, gedefinieerd door de afwezigheid van Helios; de marker voor natural Treg (nTreg), en een hoog percentage Treg met een gemethyleerd FoxP3 gen. Deze iTreg werden niet gevonden na basiliximab therapie. Op functioneel niveau zagen we na zowel rATG als basiliximab therapie een toename van het cytokine IL-10. Wanneer we de immunosuppressieve capaciteiten van Treg bekeken zagen we tekenen van donor selectieve suppressie na rATG maar niet na basiliximab therapie. Deze bevinding kan ten minste gedeeltelijk de geobserveerde verminderde effector T-cel reactiviteit na T-cel depletie therapie verklaren.

Vanwege de uitgedoofde homeostatische proliferatie bij een nog niet hersteld aantal T-cellen hebben we de hypothese onderzocht dat T-cellen minder goed kunnen reageren op cytokines na T-cel depletie therapie. Hiervoor hebben we de capaciteit van T-cellen om STAT5, een regulator in T cel activiteit en proliferatie, te kunnen fosforyleren bestudeerd. Na rATG bleek deze capaciteit in respons op IL-2 en IL-7 verminderd te zijn, vooral in CD8+ T cellen. Ook na basiliximab inductie therapie vonden we dit effect dan wel met een andere kinetiek. Naast verminderde STAT5 fosforylatie capaciteit lieten T-cellen ook een verhoogde expressie zien van co-inhibitoire receptoren. Voor CD8+ T cellen was deze verhoogde expressie gecorreleerd met de verlaagde STAT5 fosforylatie capaciteit in respons op IL-7. Zowel verminderde STAT5 fosforylatie als de verhoogde expressie van co-inhibitoire receptoren zijn kenmerken van uitgeputte T-cellen; "exhausted T-cells", een status van de cel waarin deze niet meer goed functioneert, veroorzaakt door continue stimulatie met antigeen.

Depletie therapie met rATG wordt ook gegeven als anti-rejectie therapie maar door het gunstigere bijwerkingsprofiel wordt tegenwoordig alemtuzumab veelvuldig gebruikt. Na alemtuzumab anti-rejectie therapie, dus in een geactiveerd



immuunsysteem, kwamen T-cellen ook terug in de circulatie door homeostatische proliferatie. De gerepopuleerde T cellen hadden voornamelijk het CD8+ geheugen

fenotype en ook hier was de fosforylatie capaciteit van STAT5 in respons op IL-2 en IL-7 gestoord. Ook na alemtuzumab werden meer Treg in de circulatie gemeten. Deze cellen toonde goede responsen op hun belangrijkste cytokine IL-2.

Niertransplantatie patiënten hebben levenslange behandeling met immuunsuppressiva nodig. Om toxische bijwerkingen te voorkomen is een minimale hoeveelheid medicatie gewenst. Deze hoeveelheid moet hoog genoeg zijn om het afweersysteem te onderdrukken maar laag genoeg om overmatige immunosuppressie te voorkomen. Een mogelijke nieuwe methode om deze balans te meten is fosfo-specifieke flowcytometrie zoals hier beschreven.

Samenvattend tonen de resultaten beschreven in dit proefschrift aan dat T-cel depletie dosis afhankelijk is en dat de repopulatie van T-cellen het gevolg is van homeostatische proliferatie van zowel naïeve als geheugen T-cellen. Cytokines spelen hierbij een belangrijke rol. In het gerepopuleerde T-cel compartiment komen relatief veel CD8+ geheugen cellen voor. Daarnaast vonden we veel regulatoire T-cellen en waren er aanwijzingen dat deze cellen donor specifieke reacties kunnen onderdrukken. De geheugen cellen vertoonden verminderde delingscapaciteit alsook een verminderde fosforylatiecapaciteit van STAT5. Dit laatste was gecorreleerd aan een verhoogde expressie van co-inhibitoire receptoren, beide eigenschappen van uitgeputte T-cellen. Hieruit concluderen we dat regulatoire T-cellen en uitgeputte cellen beide onderliggende mechanismen zijn van de langdurige immunomoduloire effecten van T-cel depletie therapie. Een mogelijke methode om zowel reactiviteit van het immuunsysteem alsook het effect van immunosuppressieve therapie te kunnen meten is fosfo-specifieke flow cytometrie. In de toekomst kunnen we hiermee wellicht de therapie op het individu afstemmen en zodoende de balans tussen effectiviteit en bijwerkingen verbeteren.