



Samenvatting proefschrift N.M. Kannegieter

“Monitoring Signal Transduction after Kidney Transplantation”

**Promotie: 1 mei 2018
Erasmus Universiteit Rotterdam**

Promotoren:
Prof. dr. C.C. Baan

Copromotor:
Dr. D.A. Hesselink

Sinds de eerste succesvolle niertransplantatie in 1954 zijn de uitkomsten na niertransplantatie sterk verbeterd. Dit is mede te danken aan de ontwikkeling van afweerremmende geneesmiddelen. Deze geneesmiddelen zorgen ervoor dat de donornier niet wordt afgestoten en worden ook wel immunosuppressiva genoemd.

Afstoting kent vele vormen en mechanismen. Cellen van het aangeboren afweersysteem herkennen de lichaamsvreemde eiwitten (antigenen) wat bijdraagt aan het ontstaan van een ontstekings- en afstotingsreactie. Deze reactie leidt vervolgens tot activatie van de cellen van het verworven immuunsysteem, waartoe T en B lymfocyten worden gerekend. T cellen worden geactiveerd door 3 verschillende signalen: 1) antigeen presentatie aan de T cel receptor (TCR) op de T cel door een antigeen-presenterende cel (APC); 2) een co-stimulatie signaal en 3) cytokine binding aan specifieke cytokine receptoren. Zodra een T cel deze signalen heeft ontvangen, zullen er binnenin de cel verschillende signaaltransductieroutes worden aangezet. Deze signaaltransductieroutes bestaan uit allerlei soorten signaalmoleculen die elkaar kunnen activeren. Zo wordt het signaal versterkt en doorgegeven tot aan het DNA in de celkern. Deze signaaltransductieroutes beheersen de functie van de T cel en zorgen ervoor dat er uiteindelijk cytokines worden geproduceerd. Ook in monocyten (cellen van het aangeboren immuunsysteem) zijn signaaltransductieroutes terug te vinden. Monocyten kunnen, zodra zij geactiveerd zijn, antigenen presenteren aan T cellen. Vanwege de centrale rol van monocyten in het afstotingsproces, is dieper inzicht in de effecten van immunosuppressiva op deze cellen van belang.

De meest voorgeschreven immunosuppressieve geneesmiddelen na niertransplantatie zijn tacrolimus, mycofenolaat mofetil (MMF) en prednison. Tacrolimus is een calcineurine-remmer en blokkeert de calcineurine signaaltransductieroute in T cellen. Hierdoor wordt het T cel-activatie signaal geblokkeerd en wordt de vermeerdering van T cellen en de productie van cytokines geremd. Er kleven echter ook nadelen aan het gebruik van tacrolimus. Patiënten moeten dit geneesmiddel iedere dag gebruiken en daarbij is het verschil tussen de minimale effectieve dosering van tacrolimus en de



dosering waarbij bijwerkingen (toxiciteit) ontstaan, erg klein. Daarnaast zal eenzelfde dosering tacrolimus bij verschillende patiënten leiden tot sterk verschillende concentraties in het bloed (inter-patiënt variabiliteit). Het is daarom essentieel dat de tacrolimus dosering wordt bijgesteld op geleide van de bloed concentraties. Dit staat ook bekend als farmacokinetisch therapeutisch drug monitoring. Helaas is er slechts een beperkte correlatie tussen deze volbloed concentraties en het optreden van bijwerkingen of een afstoting. Wellicht is het beter om de biologische effecten (farmacodynamiek) van tacrolimus te meten en hier de dosering op aan te passen. In verschillende onderzoeken werden dergelijke farmacodynamische methodes ontwikkeld en getoetst maar tot op heden is geen een van deze methoden goed genoeg gebleken om in de kliniek te worden toegepast.

In dit proefschrift worden twee nieuwe farmacodynamische methodes getest voor het monitoren van immunosuppressiva bij niertransplantatie patiënten, namelijk I) de fosfo-specifieke flowcytometrie assay en II) het meten van NFATc1 amplificatie. Het doel van dit onderzoek was om deze relatief nieuwe farmacodynamische methodes te testen en te bestuderen of deze potentieel hebben voor het doseren van tacrolimus en eventuele andere immunosuppressiva. Daarnaast hebben we onderzocht of deze nieuwe testen gebruikt kunnen worden voor het monitoren van de effecten van immunosuppressieve geneesmiddelen op cellen van het verworven immuunsysteem (T cellen en de verschillende subgroepen) als ook van cellen van het aangeboren immuunsysteem (monocyten).

Fosfo-specifieke flowcytometrie meet de fosforylering (activatie) van signaalmoleculen in een cel die een rol spelen bij het overbrengen van activatie signalen naar het DNA. Immunosuppressiva zullen deze fosforylering beïnvloeden en met behulp van de assay kan worden bepaald in welke mate dit gebeurt. Naast fosfo-specifieke flowcytometrie kan ook het meten van de hoeveelheid NFATc1, een signaalmolecuul uit de calcineurine route, een indicatie geven over de biologische effecten van tacrolimus. Tacrolimus remt deze route en de hypothese was dat de productie van NFATc1 in de celkern door dit geneesmiddel wordt geremd.

In dit proefschrift kwamen we tot de volgende conclusies:

- De huidige immunosuppressiva hebben slechts een beperkt effect op signaaltransductieroutes die leiden tot monocyten activatie. Er is derhalve behoefte aan nieuwe afweerremmende medicijnen die aangrijpen op monocyten.
- Fosfo-specifieke flowcytometrie is een veelbelovende farmacodynamische methode voor het monitoren van tacrolimus therapie in niertransplantatiepatiënten en kan zowel voor T cellen als monocyten worden gebruikt.
- Het meten van NFATc1 amplificatie is een specifieke volbloed test voor het monitoren van de biologische effecten van tacrolimus in T cellen van niertransplantatie patiënten.
- De fosforylering van ERK in zowel monocyten als T cellen is een veelbelovende marker voor de risico inschatting van afstoting na transplantatie.
- De gebruikelijke farmacokinetische manier van tacrolimus monitoren kan het beste worden gecombineerd met de farmacodynamische fosfo-specifieke



flowcytometrie, zodat het aanpassen van de tacrolimus dosis kan worden geoptimaliseerd.

- De fosfo-specifieke flowcytometrie assay en de NFATc1 amplificatie assay kunnen beiden de activatie van signaalmoleculen in de verschillende CD4+CD28+, CD8+CD28+ en CD8+CD28- T cel groepen meten.
- Het farmacodynamisch monitoren van immunosuppressieve therapie na transplantatie kan de effectiviteit en de veiligheid van (nieuwe) immunosuppressiva, zoals de JAK-remmer tofacitinib verbeteren.
- Fosfo-specifieke flowcytometrie is een relatief nieuwe methode om de effectiviteit en de veiligheid van (nieuwe) immunosuppressiva, zoals de JAK-remmer tofacitinib, te beoordelen.

Uit het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift blijkt dat het meten van de fosforylering van intracellulaire signaalmoleculen veel voordelen met zich meebrengt. Zo is de tijd die nodig is voor deze meting relatief kort, kan de assay worden uitgevoerd in bloedmonsters van patiënten en kan de fosforylering van signaalmoleculen per individueel cel type worden bepaald. Ook kunnen de biologische effecten van immunosuppressiva op zowel het verworven immuunsysteem (T cellen) als op het aangeboren immuunsysteem (monocyten) worden onderzocht. Tacrolimus remt echter niet volledig de signaaltransductieroutes en functies van monocyten. Hierdoor bestaat de kans dat monocyten, ondanks het gebruik van immunosuppressiva, nog steeds verantwoordelijk kunnen zijn voor een afweerreactie na transplantatie.

Het meten van NFATc1 amplificatie is een tweede methode die geschikt lijkt te zijn voor het monitoren van de biologische effecten van tacrolimus op verschillende T cel populaties. De assay vertoont een correlatie met de bloedconcentraties van tacrolimus en kan, net als fosfo-specifieke flowcytometrie, ook gemeten worden in bloedmonsters van patiënten.

Een beperking is echter wel dat voor zowel de fosfo-specifieke flowcytometrie als voor de NFATc1 amplificatie assays geldt dat zij tot op heden alleen zijn bestudeerd in een kleine studiepopulatie en in één transplantatiecentrum. Voor vervolgstudies is het belangrijk dat er grotere studiepopulaties worden geselecteerd, bij voorkeur afkomstig uit verschillende medische centra. Wanneer de assays gevalideerd zijn kunnen zij als farmacodynamische test gecombineerd worden met de huidige farmacokinetische methode.