



## Samenvatting proefschrift Thijs K. Hendriks

'The Role of Regulatory T cells in Kidney Transplantation'

**Promotie: 17 december 2009**  
**Erasmus Universiteit Rotterdam**

**Promotor:**  
Promotor: Prof. dr. W. Weimar

**Co-promotor:**  
Dr. C.C. Baan

Het immuunsysteem is een complexe verzameling van cellen en moleculen, die het lichaam laat functioneren in een omgeving vol ziekteverwekkers, zoals bacteriën en virussen. De cellen van het immuunsysteem zijn onder te verdelen in immuun-actieve cellen en immuun-suppressieve cellen. De immuun-actieve cellen zorgen ervoor dat ziekteverwekkers worden aangevallen en opgeruimd en immuun-suppressieve cellen onderdrukken de immuun-actieve cellen. De zoektocht naar een evenwicht tussen beide soorten cellen in ons lichaam is een continu en actief proces. Dit betekent dat er in de praktijk het ene moment sprake kan zijn van immuun-activiteit en op een ander moment, als de immuun-suppressieve cellen het overwicht hebben, er geen respons optreedt tegen dezelfde ziekteverwekker. Dit laatste kan bijvoorbeeld gebeuren wanneer een ziekteverwekker al lange tijd in ons lichaam zit en het lichaam "gewend" raakt aan de aanwezigheid van deze ziekteverwekker. In een dergelijke situatie veroorzaakt de ziekteverwekker vaak geen of weinig schade. Wanneer het immuunsysteem niet (meer) actief reageert op een ziekteverwekker dan noemen we dat non-responsiviteit ofwel tolerantie. Dit zou het geval kunnen zijn bij orgaantransplantatie.

Alle cellen in ons lichaam en ook ziekteverwekkers als bacteriën en virussen hebben op het oppervlak grote molekulen zitten die we antigenen noemen. Wanneer een cel of ziekteverwekker in ons lichaam terecht komt met een antigeen op het oppervlak dat ons lichaam niet kent, dan ziet ons immuunsysteem dat als lichaamsvreemd en zal het aanvallen. Tolerantie voor lichaamseigen en lichaamsvreemde antigenen wordt gereguleerd door de eerder genoemde immuun-suppressieve cellen. Een belangrijke immuun-suppressieve cel is de CD4+CD25<sup>bright</sup>+FoxP3<sup>+</sup> regulatoire T cel (Treg). Over deze immuun-suppressieve cel gaat dit proefschrift. Deze cellen kunnen ook immuun-activiteit reguleren in patiënten voor en na een orgaantransplantatie.



Wanneer Tregs ook nog specifiek de immuunrespons tegen cellen van het donororgaan onderdrukken (donor-specifiek), dan is er sprake van een extra krachtige onderdrukking van immuun-activiteit tegen het donororgaan. In deze situatie zou een patiënt wel eens minder of geen immunosuppressieve medicatie (onderdrukt het immuunsysteem) meer hoeven te gebruiken om afstoting van het donororgaan tegen te gaan. Dat is gunstig, want deze medicijnen zorgen op de lange termijn voor allerlei bijwerkingen. Het probleem is echter, dat de ontwikkeling van donor-specifieke Tregs tijd nodig heeft. Je moet dus na een transplantatie wel gebruik maken van medicatie om afstoting te voorkomen. Mogelijk heeft deze medicatie ook invloed op Tregs en staat daardoor het ontstaan en de overleving van deze suppressieve cellen in de weg. De doelstelling van dit proefschrift was om uit te zoeken of donor-specifieke Tregs daadwerkelijk ontstaan na niertransplantatie in de aanwezigheid van immunosuppressieve medicatie. Om dat vast te stellen hebben wij de uiterlijke (fenotypische) en functionele kenmerken van Tregs van patiënten voor en na niertransplantatie onderzocht.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene introductie over patiënten met chronisch nierfalen (CN) en orgaantransplantatie. Daarnaast beschrijven wij hier de eigenschappen van Tregs en waarom het belangrijk is deze te bestuderen binnen het kader van klinische niertransplantatie.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de resultaten van een onderzoek naar Tregs van patiënten die lijden aan CN en wachten op een niertransplantatie.

Het is bekend dat het immuunsysteem van patiënten met CN minder goed werkt. Dit blijkt onder andere uit een verminderde respons op vaccinaties en een verhoogde kans op de ontwikkeling van infecties of kanker. Een verstoorde balans tussen immuun-actieve en immuun-suppressieve cellen zou dit kunnen verklaren. Om vast te stellen of deze hypothese correct is, onderzochten wij de karakteristieken van Tregs uit het perifere bloed van patiënten met CN en van gezonde controles. Hierbij werd gebruik gemaakt van technieken als flow cytometry, RT-PCR en celkweken. De studiepopulatie bestond uit patiënten met CN die reeds dialyseerden (hemodialyse of peritoneale dialyse) en patiënten die nog geen gebruik maakten van dialyse.

Uit de literatuur is bekend dat immuun-actieve cellen van patiënten met CN, verschillende verschijnselen van activatie vertonen zoals een hoge expressie van IL-2 mRNA. Ook de immuun-actieve cellen van onze patiënten vertoonden een hoge expressie van IL-2 mRNA, wat de bevindingen uit de literatuur bevestigt. Een dergelijke activatie doet vermoeden dat deze cellen ook in staat zijn om hun functie effectief uit te voeren. Onze resultaten lieten echter zien dat na stimulatie in celkweken deze cellen niet zo goed delen (prolifereren) als die van gezonde controles. Analyse van Tregs toonde aan dat het aantal van deze cellen in het perifere bloed van patiënten met CN laag is. Celkweken met Tregs van patiënten toonden aan dat de functie van deze cellen significant slechter was dan van gezonde controles. Dit was extra duidelijk bij Tregs van patiënten die dialyseerden. FoxP3 is een specifieke



marker voor Tregs. In celkweken van patiënten was de expressie van FOXP3 mRNA laag, wat duidt op de een laag aantal en weinig activiteit van Tregs. Samenvattend concludeerden wij dan ook dat het immuun-systeem van patiënten met CN, weliswaar geactiveerd is, maar niet goed functioneert. Daarnaast toonden onze data aan dat ook de functie van Tregs is aangetast.

**Hoofdstuk 3** geeft een overzicht van de literatuur over de effecten van immuno-suppressieve medicatie op Tregs.

In het algemeen kan men stellen dat de resultaten van studies in vitro, met proefdieren en in de kliniek laten zien, dat immunosuppressieve medicatie negatieve maar ook positieve effecten kan hebben op Tregs. Van belang is dat naast de specifieke soort van medicatie, ook de dosering en het tijdstip van starten en stoppen met medicatie invloed heeft op Tregs. Met al deze componenten moet dus rekening worden gehouden bij het bedenken van een strategie om donor-specifiek Tregs te induceren en in stand te houden na transplantatie.

Het probleem is echter, dat er op dit moment vooral resultaten bekend zijn van in vitro- en proefdierstudies. Het effect van medicatie op Tregs bij mensen is veel minder goed onderzocht. Duidelijk is echter wel dat sommige immunosuppressieve medicijnen mogelijk een positief of in ieder geval geen negatief effect hebben op de ontwikkeling van donor-specifieke Tregs bij transplantatiepatiënten. Het is daarom noodzakelijk dat met name het effect van in de kliniek veel toegepaste medicatie op Tregs wordt onderzocht. Ook is er behoefte aan studies die zowel de uiterlijke kenmerken van Tregs als de functie van deze cellen tegelijk bestuderen. Tevens is er gebrek aan prospectief onderzoek dat op basis van duidelijk vastgestelde criteria deze cellen bij niertransplantatiepatiënten onderzoekt. De resultaten van dergelijke studies zijn hard nodig om de condities in kaart te brengen die een rol spelen bij de inductie (aanmaak) en het in stand houden van donor-specific Tregs bij transplantatiepatiënten.

Verscheidende studies hebben aangetoond dat Tregs mogelijk actief immuun-activiteit reguleren in tolerante transplantatiepatiënten die geen immunosuppressieve medicatie gebruiken. Wij voerden een prospectieve studie uit om te onderzoeken of donor-specifieke Tregs ontstaan na niertransplantatie in de aanwezigheid van immuno-suppressieve medicatie.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de resultaten van dit onderzoek gedurende het eerste jaar na transplantatie. Deze toonden aan dat het percentage van Tregs in het perifere bloed van patiënten in dit eerste jaar significant daalt. Functionele experimenten (celkweken) lieten zien dat immuun-actieve cellen gedurende dat jaar steeds beter gaan reageren op lichaamsvreemde cellen, maar niet tegen cellen van de donor. Analyse van de regulatoire capaciteit van Tregs gaf aan dat deze significant toenam in celkweken met cellen van de donor, maar niet in celkweken met andere lichaamsvreemde cellen. Op basis hiervan kon worden vastgesteld dat er sprake was van donor-specifieke regulatie door Tregs. Wij concludeerden dan ook dat in het eerste jaar na niertransplantatie, er sprake is van de



ontwikkeling van potente donor-specifieke Tregs in het perifere bloed van patiënten, ondanks de aanwezigheid van immunosuppressieve medicatie.

**In Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of het blokkeren van de koppeling tussen het cytokine IL-2 en de IL-2 receptor daadwerkelijk de functie van Tregs beïnvloedt. Wat bedoelen we hiermee?

Een cytokine is een eiwit dat door een cel gemaakt wordt en dat een boodschap overbrengt aan een andere cel. IL-2 is zo'n cytokine en belangrijk voor de overleving en functie van Tregs. De IL-2 receptor zit op het oppervlakte van een Treg en bindt met IL-2 om zo de boodschap van IL-2 aan de cel door te geven. De IL-2 receptor wordt ook CD25 genoemd. Op het oppervlakte van Tregs is veel CD25 aanwezig, omdat het voor Tregs belangrijk is om de boodschap van IL-2 te ontvangen.

Er bestaan medicijnen voor transplantatiepatiënten, monoclonale antilichamen genaamd, die zich hechten aan CD25. Eén van deze monoclonale antilichamen is daclizumab. Doordat dacluzimab zich hecht aan CD25, kan IL-2 zich niet meer hechten en ontvangt de Treg dus niet de boodschap van IL-2. De kort durende behandeling met daclizumab in de eerste periode na transplantatie wordt ook wel inductie therapie genoemd. Om te onderzoeken of het blokkeren van de IL-2 receptor daadwerkelijk de functie van Tregs beïnvloedt kreeg de helft van de patiënten inductie therapie met daclizumab gevolgd door therapie met tacrolimus en mycophenolate mofetil. De andere helft van de patiënten werd behandeld met steroïden, tacrolimus en mycophenolate mofetil. De karakteristieken van Tregs werden gemeten voor en 4 tot 6 maanden na transplantatie. Analyse van FOXP3 mRNA, een specifieke marker voor Tregs, liet zien dat in beide groepen de expressie van FOXP3 niet significant werd beïnvloed. Resultaten van celkweken van patiënten uit de daclizumab groep toonden aan, dat de capaciteit van Tregs om immuun-activiteit tegen donor-cellen te onderdrukken niet veranderde na transplantatie. Echter, de regulatoire capaciteit van Tregs van patiënten die behandeld werden met steroïden was significant lager na transplantatie. Op basis hiervan concludeerden wij dat inductie therapie met daclizumab geen negatief effect heeft op de functie van Tregs bij niertransplantatiepatiënten in de eerste 4-6 maanden in combinatie met tacrolimus en mycophenolate mofetil.

In de daclizumab groep waren veel patiënten die last hadden van afstotingsverschijnselen (rejectors). Analyse van de functie van Tregs van rejectors versus non-rejectors stelde vast dat de suppressieve capaciteit van Tregs van non-rejectors significant lager was dan van rejectors. Op basis hiervan concludeerden wij dat rejectie geen negatieve invloed lijkt te hebben op het handhaven van immuunregulatie door Tregs na transplantatie bij patiënten die inductie therapie met daclizumab ondergaan.

**Hoofdstuk 6** beschrijft een prospectief onderzoek met stabiele niertransplantatiepatiënten. Deze patiënten kregen standaard medicatie bestaande uit tacrolimus met mycophenolate mofetil (MMF). Bij inclusie werden patiënten omgezet naar medicatie



met maar één immunosuppressief medicijn namelijk; rapamycine, tacrolimus of MMF. Dit gaf ons de mogelijkheid om voor het eerst het effect van monotherapie met deze medicijnen op Tregs van niertransplantatiepatiënten te onderzoeken.

In enkele recente studies werd aangetoond dat Tregs uit verschillende subsets van cellen bestaan. Op basis van oppervlaktemarkers van deze cellen (CCR7 en CD45RO) werden hierbij de volgende populaties onderscheiden; naïeve Tregs (CCR7+CD45RO-), central-memory (CM) Tregs (CCR7+CD45RO+) en effector-memory (EM) Tregs (CCR7-CD45RO+). Deze verschillende Treg-populaties bleken gezamenlijk essentieel te zijn voor de ontwikkeling en functie van antigeen-specifieke regulatie in de lymfoïde en perifere weefsels. Er was echter geen enkele studie die had onderzocht wat het effect was van verschillende immunosuppressieve medicijnen op deze populaties bij niertransplantatiepatiënten. De resultaten van onze studie lieten zien dat 6 maanden na conversie naar monotherapie met rapamycine, het aantal Tregs significant toenam. Dit was niet zo bij patiënten die geconverteerd waren naar monotherapie met tacrolimus of MMF. De toename van het aantal Tregs van patiënten die rapamycine kregen, werd veroorzaakt door een absolute stijging binnen de CM en EM subsets, maar niet van naïeve Tregs. De regulatoire capaciteit van de Tregs van patiënten met monotherapie rapamycine veranderde niet na transplantatie. Op basis van deze resultaten concludeerden wij dat conversie van therapie met tacrolimus/MMF naar monotherapie rapamycine leidt tot een verhoogde potentie van immuunregulatie door Tregs in patiënten met een niertransplantaat. ◀