



## **Samenvatting proefschrift Angela U. Engela**

“On mesenchymal stem cells and regulatory T cells in organ transplantation”

**Promotie: 17 december 2013  
Erasmus Universiteit Rotterdam**

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

**Co-promoters:**  
Dr. C.C. Baan  
Dr. M.J. Hoogduijn

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op het bestuderen van het potentieel van mesenchymale stamcellen (MSC) geïsoleerd uit vetweefsel en regulatoire T cellen (Treg) om als celtherapie de reactiviteit van geactiveerde donor T cellen na orgaan transplantatie te controleren. Behandelingen met de huidige immunosuppressieve medicijnen hebben op de lange termijn nadelige bijwerkingen, bijvoorbeeld een toenemend risico op het ontwikkelen van tumoren, een hogere incidentie van suikerziekte en een grotere ontvankelijkheid voor infecties. Er is dus behoefte aan de ontwikkeling van alternatieve behandelingen om de blootstelling van patiënten aan de medicijnen te verminderen. Cellen met immunomodulatoire eigenschappen worden beschouwd als potentiële behandelingsopties en hun veiligheid en haalbaarheid als celtherapieën voor verschillende indicaties wordt momenteel onderzocht in klinische studies zoals beschreven in hoofdstuk 1. Ondanks het toegenomen begrip van immunomodulatie door immunosuppressieve cellen in de afgelopen jaren, is er veel meer basale kennis nodig om de capaciteiten van deze cellen optimaal voor de preventie van transplantaat rejecties te kunnen toepassen. Met name interacties van de toegediende cellen met de geactiveerde cellen en de immunosuppressieve cellen van de ontvanger behoeven verder onderzoek.

In hoofdstuk 2 wordt de interactie tussen MSC en natural Treg (nTreg) geëxploreerd. MSC worden gekarakteriseerd aan de hand van hun expressie van oppervlakte markers en hun differentiatie vermogen. MSC brachten de moleculen CD90, CD105, CD166 en HLA-I tot expressie terwijl de expressie van CD14, CD34, CD45 and HLA-II ontbrak. MSC waren in staat om in vetcellen en botcellen te differentiëren. Zowel MSC als nTreg onderdrukten op een dosisafhankelijke manier de proliferatie van allo-gestimuleerde CD25-/dim T effectorcellen. MSC remden de proliferatie van allo-gestimuleerde CD25-/dim T cellen vanaf een concentratie van 1:160 (ratio MSC/effectorcellen). nTreg remden CD25-/dim effectorcel proliferatie vanaf een concentratie van 1:10 (ratio nTreg/effectorcellen). In gecombineerde kweken hadden



MSC en nTreg geen invloed op elkaars immunosuppressieve functies. Om de interactie tussen MSC en nTreg in een in vitro transplantatie situatie te onderzoeken, werden MSC (1:40; ratio MSC/effectorcellen) afkomstig van nierdonoren gekweekt met nTreg (1:10) verkregen van de bijbehorende ontvanger 6 maanden na niertransplantatie. Vergelijkbaar met de situatie waar nTreg van gezonde donoren werden gebruikt, verhinderden beide celtypen elkaars suppressieve capaciteiten niet. De immunosuppressieve effecten van MSC en nTreg hadden invloed op CD4+ T cellen en CD8+ T cellen; binnen deze populaties waren naïve T cellen meer ontvankelijk voor de remmende werking van MSC en nTreg dan geheugen T cellen. MSC bewerkstelligden hun immunosuppressieve functies onder andere door de expressie vanIDO dat zorgt voor de afbraak van tryptofaan. Verder, MSC zorgden voor een anti-inflammatoir milieu middels hun invloed op de secretie van TNF- $\alpha$  and IL-10 door immuuncellen.

Andere mechanismen die MSC gebruiken voor hun immunosuppressieve functies werden bestudeerd in de studie uitgevoerd in hoofdstuk 3. Terwijl MSC (1:40; ratio MSC/effectorcellen) de proliferatie van CD25-/dim T effectorcellen met 59% verminderden, medieerden zij een 2-voudige toename van het percentage CD25+CD127-FoxP3+ cellen binnen de CD4+ T cel populatie. Deze CD4+CD25+CD127-FoxP3+ iTreg waren functioneel en even potent als nTreg in het onderdrukken van de allogene reactiviteit van effector T cellen. Om te bevestigen dat deze iTreg nieuw werden gevormd werd de methylatie status van de Treg-specifieke niet-gemethyleerde regio (TSDR) binnen het Foxp3 gen geanalyseerd. Deze specifieke positie in het Foxp3 gen is volledig gemethyleerd in iTreg en gedemethyleerd in nTreg afkomstig vanuit de thymus. De nTreg fractie bevatte 32,7% cellen met een gemethyleerde TSDR. In tegenstelling, de iTreg fractie bevatte 83,7% TSDR-gemethyleerde cellen en dit resultaat bekrachtigt dat zij niet in de thymus worden gevormd. De verdere karakterisatie van iTreg demonstreerde dat zij CTLA-4, GITR en Helios tot expressie brengen. Aangezien IL-2 essentieel is voor de expansie en functie van nTreg, werd de rol van IL-2 in de generatie van iTreg door MSC bepaald. Ondanks verminderde T cel proliferatie in een gecombineerde MSC-MLR kweek, waren IL-2 concentraties onder deze condities 15,1 keer hoger dan in MLR alleen. IL-2 wordt niet tot expressie gebracht door rustende of geactiveerde MSC. De IL-2 was dus afkomstig van effectorcellen. Inderdaad, geactiveerde CD4+CD25+FoxP3- T cellen waren de populatie met het hoogste percentage IL-2-producerende cellen. Inhibitie van de IL-2 route met de IL-2 receptor antagonist basiliximab reduceerde het percentage iTreg in MLR en voorkwam de MSC-gemedieerde generatie van iTreg. Deze bevinding toont de betrokkenheid van IL-2 in de inductie van de novo Treg door MSC aan.

Hoofdstuk 4 presenteert onderzoek naar het effect van MSC op CD8+CD28- T cellen. Na allogene stimulatie toonden CD8+CD28- T cellen proliferatieve capaciteiten vergelijkbaar met die van CD8+CD28+ T cellen. Dit resultaat geeft aan dat CD8+CD28- T cellen het vermogen hebben om alloreactiviteit in transplantaat patiënten te veroorzaken. Prolifererende CD8+CD28- T cellen hadden een immuun-activerend en cytotoxisch phenotype; ze brachten IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  en granzyme B tot expressie. Het CTLA-4 immunoglobuline (Ig) belatacept bindt aan CD80/CD86 op de



oppervlakte van antigeen-presenterende cellen (APC). Daardoor blokkeert belatacept de CD28-CD80/86 co-stimulatie route die nodig is om T cellen te activeren en te laten prolifereren. Dientengevolge ontkomen CD8+CD28- T cellen aan de immunosuppressieve functie van belatacept. Om te bekijken of MSC de cellen die ontkomen aan belatacept remmen, werd het gecombineerde effect van belatacept en MSC op effectorcellen gebestudeerd. Zowel belatacept als MSC remden effectorcel proliferatie op een dosisafhankelijke manier. De combinatie van beide immunosuppressieve middelen had geen negatieve invloed op elkaars functie. Lage concentraties van belatacept en MSC hadden een additief remmend effect. Belatacept onderdrukte de alloreactiviteit van CD8+CD28+ T cellen, maar beïnvloedde CD8+CD28- T cel proliferatie niet. In tegenstelling, MSC remden de proliferatieve capaciteit van zowel CD8+CD28- als CD8+CD28+ T cellen. Het gelijktijdig kweken van MLR met belatacept en MSC zorgde voor inhibitie van de proliferatie van CD8+CD28- en CD8+CD28+ T cellen, wat betekent dat belatacept de functie van MSC niet belemmert. MSC induceerden geen apoptose in CD8+CD28- T cellen en evenmin beïnvloedden MSC de CD28 expressie van CD8+ T cellen. Deze bevinding bekrachtigt dat MSC een anti-proliferatief effect op CD8+CD28- T cellen hebben.

In hoofdstuk 5 wordt een retrospectieve studie beschreven die de uitwerking van een FOXP3 (GT)n dinucleotide repeat polymorfisme op de transplantaat overleving van 599 primaire nier transplantatie patiënten evalueert. Zes verschillende FOXP3 allelen werden geïdentificeerd die varieerden van (GT)12 tot (GT)18. Omdat beschreven is dat de promotor van het (GT)15-allel een hogere activiteit heeft dan de promotor van het (GT)16-allel, werden alle allelen  $\leq$ (GT)15 geïnccludeerd in de korte (S) klasse, terwijl alle allelen  $\geq$ (GT)16 werden geïnccludeerd in de lange (L) klasse. Aangezien het Foxp3 gen is gesitueerd op het X chromosoom, bezitten mannelijke patiënten slechts één FOXP3 allel. Deze hemizygote patiënten werden gecombineerd met de respectievelijke homozygote genotype groep. Patiënten werden dus gegroepeerd over drie groepen; S/SS, SL en L/LL. Transplantaat overleving gecensureerd voor overlijden was vergelijkbaar tussen de SL en de S/SS genotype groepen, terwijl de SL groep een voordeel had over de L/LL genotype groep. De SL groep en de S/SS groep werden daarom samengevoegd en vormden de S-genotype groep (SG).; de L-genotype groep (LG) bestond uit de L/LL genotypen. In een Kaplan-Meier analyse hadden SG patiënten een voordeel in transplantaat overleving vergeleken met de LG patiënten. Multivariant Cox regressie analyse bevestigde deze analyse. Acute rejectie was niet geassocieerd met FOXP3 polymorfismes; in beide genotype groepen maakten evenveel patiënten tenminste een acute rejectie episode door. Daarentegen, na een acute rejectie hadden patiënten van de SG group een voordeel in orgaan overleving over de LG patiënten. Deze associatie werd niet gevonden in patiënten zonder acute rejectie en dit resultaat demonstreert een voordelig effect op transplantaat overleving van de S-, SS-, and SL-genotypen.