



## **Samenvatting proefschrift Elena Kamburova**

“Anti-B-cell therapy in renal transplantation”

**Promotie: 25 september 2014  
Radboud Universiteit Nijmegen**

**Promotor:**

Prof. dr. I. Joosten  
Prof. dr. L.B. Hilbrands

**Co-promotor:**

Dr. H.J.P.M. Koenen  
Dr. M.C. Baas

Niertransplantatie is de eerste keus behandeling voor patiënten die geen eigen nierfunctie meer hebben. Patiënten die een succesvolle niertransplantatie hebben ondergaan, leven gemiddeld langer dan patiënten die worden behandeld met dialyse. Ook leidt niertransplantatie tot een sterk verbeterde kwaliteit van leven. Een transplantatie heeft het beste kans van slagen als de donornier goed past bij de ontvanger. Hoe beter de match, hoe minder kans op afstoting. Ons afweersysteem (immuunsysteem) is ontwikkeld om op efficiënte wijze lichaamsvreemde indringers, zoals virussen en bacteriën, op te sporen en ze onschadelijk te maken. Het immuunsysteem beschouwt de getransplanteerde nier als iets wat niet in het lichaam thuishoort. Als reactie gaan de witte bloedcellen van het immuunsysteem de nier aanvallen. De T cellen, die onderdeel uitmaken van de witte bloedcellen, spelen een belangrijke rol in de herkenning van lichaamsvreemde indringers. Activering van T cellen die specifiek de getransplanteerde nier herkennen, zogenaamde alloreactieve T cellen, leidt tot een snelle vermeerdering (proliferatie) van deze cellen en differentiatie waarna ze ontstekingswekkers (cytokines) gaan produceren (CD4+ helper T cellen) of direct in staat zijn om andere cellen te vernietigen (CD8+ cytotoxische ‘killer’ T cellen). Helper T cellen geven hulp aan andere witte bloedcellen, zoals de B cellen die antilichamen gaan maken. Antilichamen kunnen een ziekteverwekker of andere lichaamsvreemde indringers herkennen en door er aan te binden vormen ze een belangrijke schakel in het onschadelijk maken ervan. B cellen worden gedurende het hele leven aangemaakt in het beenmerg, waar ze zich ontwikkelen uit bloedstamcellen. Tijdens de voorloper B cel ontwikkeling in het beenmerg creëert elke voorloper B cel een uniek antilichaammolecuul, ook wel immuunglobuline (Ig) genoemd. Vervolgens verlaat deze B cel het beenmerg via de bloedbaan en migreert tussen de verschillende lymfoïde organen, zoals de milt en lymfklieren, op zoek naar antigenen.



Wanneer een B cel zijn specifieke antigeen herkent, zal deze worden geactiveerd en zichzelf vermenigvuldigen. De dochtercellen rijpen vervolgens uit tot plasmacellen, die antilichamen produceren, of tot geheugencellen, die zeer snel in actie kunnen komen zodra hetzelfde antigeen nog een keer het lichaam binnenkomt. Naast de productie van antilichamen zijn B cellen in staat om een immuunrespons op gang te zetten door antigenen aan T cellen te presenteren, waardoor de T cellen geactiveerd raken, of door de productie van verschillende cytokines.

Om activering van het immuunsysteem en afstoting van de nier te voorkomen, moet iemand met een getransplanteerde nier levenslang afweeronderdrukkende middelen (immunosuppressiva) gebruiken. Omdat immunosuppressiva het gehele immuunsysteem onderdrukken, hebben transplantatiepatiënten een verhoogde kans op infecties en het ontwikkelen van tumoren. Om de kans op afstoting te verminderen wordt er gekeken naar bloedgroep en weefseltypering (witte bloedcellen) om vast te stellen of er sprake is van een goede match tussen donor en ontvanger. De kans op afstoting van een donornier is kleiner als de weefselkenmerken van donor en ontvanger meer op elkaar lijken. Die kenmerken zijn erfelijk bepaald en worden Humaan Leukocyten Antigenen (HLA) genoemd. Met de zich steeds weer verbeterende ontwikkeling op het gebied van immunosuppressiva, is de levensduur van een getransplanteerde nier sterk verbeterd. Optimalisering van het gebruik van verschillende immunosuppressiva tegelijkertijd, heeft ertoe geleid dat 90% van de nieren 1 jaar na transplantatie nog steeds functioneert, terwijl dit na 10 jaar ongeveer 60% is. Huidige veelgebruikte immunosuppressiva zijn met name gericht om T cel activering te voorkomen, maar zoals eerder genoemd kan B cel activering en differentiatie ook nadelige gevolgen hebben voor de transplantatoeverleving. De aanwezigheid van anti-HLA antilichamen, die geproduceerd worden door B cellen, voor en na transplantatie, evenals de aanwezigheid van B cellen in de nier ten tijde van een afstotingsreactie, zijn geassocieerd met kortere transplantatoeverleving. Daarom zou het verwijderen (depletie) van B cellen bij niertransplantatiepatiënten mogelijk kunnen helpen om afstoting te voorkomen. Anderzijds, zijn er B cellen met regulerende (afstotingsremmende) functies beschreven bij patiënten die een stabiele nierfunctie hebben ondanks dat ze al meer dan een jaar gestopt zijn met het gebruik van immunosuppressiva. Omdat B cellen een verscheidenheid van functies kunnen hebben bij een immuunrespons, moeten de effecten van het verwijderen van B cellen (anti-B-cel therapie) zorgvuldig geanalyseerd worden. Een voorbeeld van anti-B-cel therapie is het B cel depletierende monoklonale antilichaam rituximab. Rituximab bindt aan het CD20 eiwit, dat zich aan het oppervlak van B cellen bevindt. Na binding van rituximab aan de B cellen worden deze laatste door het eigen afweersysteem herkend en vernietigd. Er worden weer nieuwe B cellen gevormd uit de stamcellen in het beenmerg, maar het kan maanden tot jaren duren totdat weer normale aantallen in het bloed aanwezig zijn. Omdat het CD20-eiwit alleen voorkomt op B cellen zal rituximab niet aan andere cellen in het lichaam binden.

#### B cellen als doelwit bij niertransplantatie

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het verkrijgen van meer kennis over anti-B-cel therapie bij niertransplantatie. De basis werd gevormd door een



gerandomiseerde, dubbelblinde, placebogecontroleerde klinische studie waarin de effecten van rituximab gegeven aan niertransplantatie patiënten werden geëvalueerd (hoofdstuk 2). In deze studie werden twee patiëntengroepen met elkaar vergeleken. De ene groep kreeg rituximab in de operatiekamer gedurende de niertransplantatie, de andere een placebo (nepmiddel, in dit geval zoutoplossing). De toewijzing van patiënten aan één van beide groepen gebeurde willekeurig (gerandomiseerd) en daarnaast wisten zowel de onderzoeker, als de patiënt niet wie welk middel kreeg (dubbelblind). Beide patiënten groepen kregen de standaard immunosuppressieve behandeling bestaande uit tacrolimus, mycofenolaat mofetil en steroïden. Uit de resultaten bleek dat één dosis van rituximab veilig is, maar niet leidt tot verminderde afstoting in de totale populatie niertransplantatiepatiënten. Bij geïmmuniseerde patiënten, zij die een eerdere transplantatie en/of anti-HLA antilichamen vóór transplantatie hadden, lijkt rituximab het aantal afstotingen te verminderen tot een niveau dat vergelijkbaar is met dat bij niet geïmmuniseerde patiënten (geen eerdere transplantatie en geen anti-HLA antilichamen). Een verklaring voor het beschermende effect van rituximab in de geïmmuniseerde patiënten kan zijn dat deze patiënten meer geheugen B cellen hebben vóór de transplantatie in vergelijking met niet geïmmuniseerde patiënten. Na herkenning van het specifieke antigeen, bijvoorbeeld in de nier, kunnen deze geheugen B cellen snel differentiëren in antilichaamproducerende plasma cellen. Door deze B cellen te verwijderen met rituximab kunnen er geen antilichamen geproduceerd worden, waardoor een afstoting voorkomen kan worden.

Om afstoting na niertransplantatie te voorkomen moeten patiënten levenslang immunosuppressiva gebruiken die de functie van T en B cellen remmen. Ondanks het veelvuldige gebruik van immunosuppressiva is er niet veel bekend over de effecten van deze medicijnen op de aantallen en functies van T en B cellen in het bloed van niertransplantatiepatiënten. In hoofdstuk 3 hebben we in een groep niertransplantatiepatiënten een aantal karakteristieken van T en B cellen in het bloed onderzocht. Behandeling met combinatietherapie van tacrolimus, mycofenolaat mofetil en steroïden leidt tot een verandering in de geheugen T en B cellen in vergelijking met vóór de transplantatie. Toevoeging van rituximab naast de standaard combinatie-therapie resulteerde in een langdurige afwezigheid van B cellen in het bloed. Wanneer na verloop van tijd nieuwe B cellen in het bloed terugkomen, zien we een verrijking van CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> transitionele B cellen. In bepaalde situaties wordt de aanwezigheid van relatief meer transitionele en naïeve B cellen na rituximab behandeling geassocieerd met een beter klinisch resultaat, waarschijnlijk omdat er B cellen met regulerende functie aanwezig zijn binnen de transitionele B cellen.

#### Effecten naast B cel depletie

B cellen hebben verschillende functies. Na activering kunnen B cellen prolifereren en differentiëren in cellen die verschillende ontstekingscellen kunnen produceren, antigenen kunnen presenteren aan T cellen of antilichamen produceren. Al deze processen kunnen door rituximab beïnvloed worden. Om de directe effecten van rituximab op B cellen te bestuderen, hebben we in hoofdstuk 4 B cellen geïsoleerd uit bloed van gezonde vrijwilligers en gekweekt met of zonder rituximab. Uit de analyses



bleek dat rituximab de proliferatie van naïeve maar niet van geheugen B cellen remt, waardoor de verhoudingen tussen de verschillende B cellen veranderen. Wanneer de aan rituximab blootgestelde B cellen gebruikt werden om antigenen te presenteren aan T cellen, waren er meer geactiveerde T cellen die het cytokine IL-4 produceerden dan wanneer onbehandelde B cellen antigenen presenteerden aan T cellen. Uit eerder onderzoek was al bekend dat behandeling van rituximab de B cellen in het bloed goed kan depletieren, maar dat er in lymfoïde organen B cellen overblijven. Hoofdstuk 5 beschrijft het effect van rituximab op de B cellen in lymfeknopen van niertransplantatiepatiënten.. De overgebleven B cellen in de lymfeknopen waren met name geheugen B cellen. Na stimulatie van allogene T cellen met B cellen uit lymfeknopen van rituximab-behandelde patiënten, waren er minder geactiveerde T cellen die het cytokine IL-17 produceerden. Er blijven dus na behandeling met rituximab B cellen over die andere functionele eigenschappen hebben. Dit betekent dat het effect van rituximab op de immuunrespons niet alleen bepaald zal worden door de mate van B cel depletie, maar ook door de functionele eigenschappen van de overgebleven B cellen.

Een bijwerking na behandeling met rituximab van patiënten met B cel kanker kan zijn dat er kort na de infusie grote hoeveelheden van bepaalde cytokines geproduceerd worden. Deze verhoging kan tot een immuunreactie kunnen leiden, wat nadelige gevolgen zou kunnen hebben. In hoofdstuk 6 is dit voor niertransplantatiepatiënten geëvalueerd. Toediening van rituximab leidde tot een specifieke cytokine productie, met verhoogde concentraties van het regulerende cytokine IL-10 en het cel-aantrekkende eiwit MIP-1 $\beta$ . Deze eiwitten kunnen de immuunrespons beïnvloeden. In hoofdstuk 7 worden de bevindingen samengevat en bediscussieerd vanuit een breder oogpunt. De resultaten besproken in dit proefschrift tonen aan dat rituximab direct de B cellen kan beïnvloeden. Hierdoor zal het effect van rituximab op het immuunrespons niet alleen bepaald worden door de mate van B cel depletie, maar ook door de functionele eigenschappen van de overgebleven B cellen. De relatieve verhoging van het aantal regulatoire B cellen na rituximab behandeling kan positieve gevolgen hebben op de lange termijn. Uiteindelijk zal het klinische effect van anti-B-cel bepaald worden door de balans tussen effector en regulatoire B cellen. Daarom zou toekomstige therapie zich meer moeten richten op selectieve depletie of verandering van de B cel subtypes.