



Samenvatting proefschrift Ellen Kreijveld

*'Regulation of alloreactivity
Identification of biomarkers and modulation by
immunosuppressive drugs'*

**Promotie: 19 december 2007
UMC St Radboud, Radboud Universiteit Nijmegen**

Promotor:
Prof. Dr. B.E. de Pauw

Co-promotores:
Dr. I. Joosten en Dr. L. Hilbrands



Niertransplantatie is de beste behandelmethode voor patiënten met nierfalen. Transplantatie van een donornier, afkomstig van een levende of overleden donor, verhoogt de overlevingskans en verbetert de kwaliteit van leven voor nierpatiënten en heeft daarom de voorkeur boven dialyse. Een belangrijk probleem bij transplantatie is het optreden van een afstotingsreactie. Ons immuunsysteem, ontwikkeld om op efficiënte wijze lichaamsvreemde indringers, zoals virussen en bacteriën, op te sporen en te vernietigen, herkent het getransplanteerde orgaan ook als lichaamsvreemd en zal een immuunrespons tegen het orgaan in gang zetten. De T cellen, van het immuunsysteem, grofweg te verdelen in CD4⁺ en CD8⁺ T cellen spelen een centrale rol in het afstotingsproces. Activatie van CD4⁺ en CD8⁺ T cellen die specifiek het getransplanteerde orgaan herkennen, zogenaamde alloreactieve T cellen, leidt tot een snelle vermeerdering (proliferatie) van deze cellen, waarna ze hun effector functie verwerven. Dit leidt tot een sterke immuunrespons tegen de donornier wat kan resulteren in verlies van het orgaan.

De introductie van immuunsuppressieve medicijnen heeft de kans op afstoting enorm verkleind. Helaas heeft het (langdurig) gebruik van immuunsuppressieve medicatie een aantal ernstige bijwerkingen. Paradoxaal genoeg kan het gebruik van immuunsuppressiva op de lange termijn bijdragen aan orgaanverlies. Daarom is geprobeerd om op gecontroleerde wijze de immuunsuppressie op een gegeven moment na transplantatie te verminderen maar dit bleek gepaard te gaan met een verhoogde kans op afstoting.



Aan de andere kant heeft de afbouw van immuunsuppressie ook voordelen, want patiënten bij wie de immuunsuppressie zonder afstoting kon worden afgebouwd lieten een verbeterde nierfunctie en verlaagde bloeddruk zien. Derhalve is het zeer gewenst om onderscheid te kunnen maken tussen patiënten met een verhoogd risico op afstoting na afbouw van immuunsuppressie en patiënten bij wie immuunsuppressie succesvol kan worden afgebouwd.

Het ultieme doel in de transplantatie immunologie is de inductie van transplantatie tolerantie, de permanente acceptatie van het orgaan in afwezigheid van immuunsuppressie. De afgelopen jaren is duidelijk geworden dat het immuunsysteem over elegante mechanismen beschikt om tolerantie tegen lichaamseigen eiwitten te behouden. Onderdeel hiervan zijn de regulatoire T cellen; natuurlijk voorkomende suppressor cellen die in staat zijn de effector functie van andere cellen te onderdrukken. Uit recente studies blijkt dat regulatoire T cellen ook de immunerespons tegen een getransplanteerd orgaan kunnen moduleren en mogelijk een cruciale rol spelen in het ontstaan van transplantatie tolerantie. Hierbij is het natuurlijk uitermate belangrijk dat de functie en de ontwikkeling van regulatoire T cellen niet gehinderd wordt door de immuunsuppressieve medicijnen die transplantatie patiënten gebruiken om afstoting te voorkomen.

Het hoofddoel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is de identificatie van een immunologische marker die kan voorspellen bij welke patiënten er een verhoogd risico is op afstoting na afbouw van de immuunsuppressieve medicatie en bij welke patiënten de immuunsuppressiva veilig kunnen worden verminderd. Een belangrijk onderdeel hiervan is het bestuderen van de exacte rol van de regulatoire T cellen in de bescherming tegen afstoting. Om functionele analyse van de Treg mogelijk te maken is een protocol ontwikkeld wat beschreven staat in **hoofdstuk 2**. Voor de identificatie van een marker met voorspellende waarde voor het optreden van afstoting hebben we gebruik gemaakt van een cohort niertransplantatiepatiënten bij wie de immuunsuppressie volgens een standaardprotocol na transplantatie werd verminderd. Als gevolg van dit afbouw regime kreeg een deel van de patiënten een afstotingsreactie, terwijl de therapie bij het merendeel van de patiënten succesvol kon worden gereduceerd. Gelukkig waren vrijwel alle afstotingsreacties goed te behandelen. Omdat de T cellen een zeer belangrijke rol spelen bij de afstotingsreactie, hebben we uitgebreid gekeken naar een aantal T cel markers, waaronder de aanwezigheid van verschillende populaties T cellen, zoals naïeve, effector en memory ('geheugen') T cellen, en de capaciteit van CD4⁺ en CD8⁺ T cellen om te prolifereren en cytokines te produceren.



Ook is de aanwezigheid en de functie van regulatoire T cellen met behulp van het eerder beschreven expansie protocol bestudeerd in rejectoren en non-rejectoren. De resultaten hiervan zijn beschreven in **hoofdstuk 3**. Hieruit werden twee T cel analyses geïdentificeerd waarmee onderscheid kon worden gemaakt tussen non-rejectoren en rejectoren. Zowel een $CD4^+ T_{MEM}: T_{REG}$ ratio <20 als een afname van het percentage naïeve $CD4^+$ T cellen vonden we namelijk alleen bij non-rejectoren. Door deze markers te combineren konden we 16 van de 21 non-rejectoren (76 %) identificeren. Voordat deze methode echter kan worden toegepast om prospectief transplantatie patiënten te identificeren die in aanmerking komen voor afbouw van immuunsuppressie moeten onze bevindingen gevalideerd worden. Naast de T cellen, is ook de rol van 'natural killer' (NK) cellen en HLA antistoffen bestudeerd in het kader van rejectie. Hierbij werd geen associatie gevonden tussen NK cellen of HLA antistoffen en het optreden van rejectie van afbouw van de immuunsuppressie. Deze resultaten staan beschreven in hoofdstuk 4 en 5.

Om een beter beeld te krijgen van de exacte effecten van immuunsuppressieve medicijnen op het immuunsysteem hebben we in **hoofdstuk 6** onderzocht of het immuunsuppressieve medicijn daclizumab een negatieve werking heeft op de regulatoire T cel populatie in het perifere bloed van niertransplantatie patiënten. Daclizumab is een monoclonaal antilichaam gericht tegen CD25, de α -keten van de IL (interleukine)-2 receptor, een receptor die ook door regulatoire T cellen tot expressie gebracht wordt. Analyse van de regulatoire T cellen, nadat daclizumab verdwenen was, liet zien dat daclizumab geen onomkeerbare schade had aangericht aan de grootte en de functie van de regulatoire T cel populatie. Hoewel daclizumab dus geen onomkeerbare schade toebrengt aan de grootte en de functie van de regulatoire T cel populatie, kan het mogelijk wel tijdelijk de regulatoire T cel populatie aantasten en de kans op tolerantie inductie in gevaar brengen.

Tot slot hebben we de werking van het immuunsuppressieve medicijn FK778 onderzocht. FK778 is een immuunsuppressief medicijn dat onderzocht is voor gebruik als anti-rejectie medicijn na transplantatie. Wij vonden dat FK778 niet alleen in staat is om verschillende aspecten van het immuunsysteem te onderdrukken, zoals de meeste immuunsuppressieve medicijnen, maar dat FK778 ook regulatoire capaciteit kan induceren in alloreactieve $CD4^+$ T cellen (**hoofdstuk 7**). Het middel bleek dus in staat om een deel van de 'agressieve' alloreactieve T cellen te converteren naar 'beschermende' regulatoire T cellen. Dit betekent dat het in principe, met gebruik van de juiste immuunsuppressieve medicijnen, mogelijk is om de immuunrespons te sturen in de richting van transplantatie tolerantie.



In **hoofdstuk 8** is beschreven hoe FK778 de alloreactieve CD8+ T cel populatie kan onderdrukken. FK778 bleek niet in staat om regulatoire capaciteit te induceren in CD8+ T cellen, maar kon goed de proliferatie en het verwerven van effector functie van alloreactieve CD8+ T cellen onderdrukken. De functie van reeds gevormde CD8+ effector T cellen kon niet worden geremd door FK778.

De bevindingen beschreven in dit proefschrift ondersteunen dat een correcte balans tussen reactiviteit en regulatie uitermate belangrijk is voor behoud van het getransplanteerde orgaan. Doorslag van de balans richting immuunreactiviteit verhoogt de kans op een afstotingsreactie terwijl bevordering van immuunregulatie zal beschermen tegen afstoting. Ontwikkeling van medicijnen of methoden die de balans laten doorslaan in de richting van immuunregulatie zal bijdragen aan de inductie van langdurige transplantatie tolerantie en het succes van transplantatie verder verhogen. ◀