



## Samenvatting proefschrift Ramin Vafadari

“Exploring Pharmacodynamics of Immunosuppressive Agents in Transplantation”

**Promotie: 1 maart 2013**  
**Erasmus Universiteit Rotterdam**

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

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

Een persoon met een falend orgaan door ziekte of een aangeboren afwijking komt in aanmerking voor orgaantransplantatie. Om afstoting van het lichaamsvreemde transplantaat te voorkomen wordt de patiënt behandeld met afweerremmende medicijnen. Deze medicijnen dienen het immuunsysteem zo te beïnvloeden dat een afstoting wordt onderdrukt en tegelijkertijd een normale afweer tegen schimmels, bacteriën en virussen intact blijft. De balans tussen werkzaamheid en schadelijkheid luistert dus heel nauw, mede doordat deze medicijnen bij een groot deel van de patiënten ernstige bijwerkingen veroorzaken zoals hart- en vaatziekten, suikerziekte en nierfalen. In dit proefschrift zijn de biologische effecten van afweeronder-drukkende medicijnen op het immuunsysteem onderzocht met als doel een veiligere medicamenteuze behandeling voor orgaanontvangers mogelijk te maken. De calcineurine-remmers, tacrolimus en cyclosporine, zijn de hoeksteen van de behandeling na transplantatie. De dosering van deze afweerremmers wordt op individueel niveau aangepast om de kans op bijwerkingen en afstotingsreacties te verkleinen. De medicijnconcentratie in het bloed van transplantatiepatiënten wordt regelmatig gemeten en binnen bepaalde waardes gehouden door de hoeveelheid in te nemen tabletten per patiënt aan te passen. Desondanks treden nog steeds afstotingsreacties op en krijgt een groot deel van de patiënten ernstige bijwerkingen. Dit komt doordat er geen rekening wordt gehouden met de grote individuele verschillen in gevoeligheid voor de medicijn. Voor een verdere verbetering van de therapie is het nodig om de gevoeligheid van patiënten voor medicijnen te kunnen bepalen. Dit kan door middel van farmacogenetica en door het meten van de biologische effecten van medicijnen op cellulair niveau.

In hoofdstuk 2 wordt een nieuwe methode gebruikt om het effect van tacrolimus op een belangrijk intracellulair signaalmolecuul in T cellen te meten. Het signaalmolecuul dat we hebben gemeten was p38 MAPK. Dit molecuul is in ongeactiveerde toestand



aanwezig en wordt na activatie gefosforyleerd. Met de methode fosfospecifieke flowcytometrie op volbloed, kan de hoeveelheid gefosforyleerd p38 MAPK gekwantificeerd worden. Tacrolimus remde in vitro de p38 MAPK activiteit in zowel de CD4+ helper T cel- als in de CD8+ killer T celpopulatie. Na inname van een tablet met 10 mg tacrolimus door vrijwilligers was de p38 MAPK activiteit in de T celpopulaties omgekeerd evenredig met de medicijnbloedconcentraties. Ook in nierontvangers werd deze omgekeerde relatie aangetoond. Hieruit volgt dat tacrolimus behalve calcineurine ook de p38 MAPK activatieroute in T cellen remt. Bovendien is dit signaalmolecuul dankzij de snelle en gevoelige fosfospecifieke flowcytometrie een veelbelovende marker voor het routinematig meten van de gevoeligheid van patiënten voor tacrolimus. MAPK activiteit is gelieerd aan een ander belangrijk signaalmolecuul in afweercellen, nl. NF-kB. Dit signaalmolecuul kan op een soortgelijke manier geactiveerd worden in T cellen als p38 MAPK en zet na activatie meer dan 150 genen aan tot het produceren van eiwitten die het afweersysteem in de aanvalsmodus zetten. In hoofdstuk 3 hebben we onderzocht of tacrolimus ook NF-kB kan remmen in gewone T cellen afkomstig uit het bloed van vrijwilligers. We vonden dat tacrolimus de NF-kB activiteit in CD4+ T cellen, CD8+ T cellen en regulatoire T cellen remde. Dit werd gemeten door de fosforylatie-graad van NF-kB te bestuderen in geactiveerde T cellen. De mate waarin NF-kB genen aanzet was eveneens door tacrolimus geremd. Na het aanzetten van genen door NF-kB worden ontstekings-eiwitten geproduceerd zoals TNF $\alpha$  welke sterk geremd werd door tacrolimus. Dit onderzoek liet voor het eerst in humane bloed T cellen het effect van klinisch relevante tacrolimus-concentraties op NF-kB zien. De resultaten van hoofdstuk 2 en 3 tonen de brede werking van tacrolimus op de NF-kB en MAPK activatieroutes, terwijl algemeen wordt aangenomen dat het alleen calcineurine remt. Deze bevindingen helpen ons de werkzaamheid en toxiciteit van tacrolimus te verklaren en kunnen ons leiden naar nieuwe medicijnen met een gunstiger werkings-bijwerkingen profiel.

In hoofdstuk 4 hebben wij de invloed van een genpolymorfisme op het biologisch effect van tacrolimus onderzocht in nierontvangers. Het ABCB1 3435 gen is verantwoordelijk voor de expressie van het eiwit ABCB1 dat actief lichaamsvreemde stoffen en ook medicijnen uit cellen pompt. Dit leidde tot de onderzoeksvraag of deze genvariatie het effect van tacrolimus op het afweersysteem beïnvloedt. Onze in vitro experimenten lieten zien dat na het remmen van deze pomp, tacrolimus de T cellen sterker onderdrukte in hun cytokineproductie. In T cellen van nierontvangers die drager zijn van het ABCB1 3435CC genotype kon de pompfunctie worden geremd wat het biologisch effect van tacrolimus op T cellen verhoogde. Dit was echter niet het geval bij de dragers van het 3435TT genotype. Bovendien hadden de transplantaatontvangers met het 3435CC genotype gemiddeld een hogere tacrolimus bloedconcentratie nodig om dezelfde remming van hun afweercellen te krijgen. Dus het ABCB1 3435C>T genpolymorfisme beïnvloedt de gevoeligheid van patiënt-afweercellen voor tacrolimus.

In hoofdstuk 5 en 6 zijn de biologische effecten bestudeerd van een veelbelovend nieuw afweerremmend geneesmiddel, tofacitinib. Dit is een janus kinase (JAK) remmer. De JAK-STAT signaalroute wordt in T cellen aangezet nádat MAPK en NF-kB zijn geactiveerd. In hoofdstuk 5 wordt dit mechanisme beschreven en de



mogelijkheden om de JAK-STAT route in afweercellen te analyseren met behulp van fosfospecifieke flowcytometrie. Met deze methode bestudeerden we in hoofdstuk 6 het effect van tofacitinib op de JAK-STAT activatieroute bij nierontvangers van de recente klinische fase 2B onderzoek. Hiervoor werd het bloed van de patiënten gestimuleerd met een drietal afzonderlijke cytokines, IL-2, IL-7 en IL-15, waarna de STAT5 fosforylatie werd gemeten. In T cellen van patiënten die met tofacitinib en basiliximab werden behandeld was de STAT5-fosforylatie geremd na stimulatie met deze cytokines. In patiënten die behandeld werden met de IL-2 receptor blokker basiliximab zonder tofacitinib, was enkel de STAT5-fosforylatie t.g.v. IL2-stimulatie geremd. In patiënten die noch met basiliximab noch met tofacitinib maar met een calcineurineremmer werden behandeld was de fosforylatie in alle gevallen intact. Bij de tofacitinib-behandelde patiënten was de STAT5-activatie zelfs rond het tweemaaldaagse innamemoment, wanneer de bloedconcentraties laag zijn, sterk geremd. Dit was een aanwijzing voor een te sterke remming van het afweersysteem wat werd bevestigd door een hogere kans op infecties. Dit onderzoek liet zien dat volbloed fosfospecifieke flowcytometrie een unieke, sensitieve methode is om de biologische effecten van afweeronderdrukkende medicijnen te meten.

De studies beschreven in dit proefschrift laten zien dat orgaanontvangers met het ABCB1 3435 CC genotype minder gevoelig zijn voor de biologische effecten van tacrolimus. Daarnaast is het met de snelle en gevoelige fosfospecifieke flowcytometrie mogelijk om de biologische effecten van tacrolimus en tofacitinib in orgaanontvangers te meten. Het voorspellen van de individuele gevoeligheid van patiënten voor de werkzaamheid en toxiciteit van afweerremmende medicijnen met behulp van deze techniek zou de behandeling aanmerkelijk verbeteren. ◀