



Samenvatting proefschrift J.G.H.P. Verhoeven

“Minimally invasive detection of transplant rejection”

**Promotie: 30 november 2022
Erasmus MC**

Promotor:
Prof. dr. C.C. Baan

Copromotor:
Dr. D.A. Hesselink
Dr. ir. K. Boer

Bij patiënten met hart- of nierfalen is een transplantatie de voorkeursbehandeling. Helaas is afstoting van een transplantaat een belangrijke complicatie, welke in 10-20% van de niertransplantatie en in ongeveer 25% van de harttransplantatie patiënten optreedt in het eerste jaar na transplantatie. Afstoting beschadigt het transplantaat en beperkt daarmee zowel de overleving van het transplantaat, als die van de ontvanger. Het is daarom belangrijk dat een afstoting tijdig wordt aangetoond zodat een extra behandeling, de anti-afstotingstherapie, kan worden gegeven. De huidige middelen die worden gebruikt om afstoting aan te tonen hebben belangrijke tekortkomingen: 1) het nemen van een nier- of hartbiopt, waarbij een stukje weefsel van het transplantaat wordt verkregen, is een belastende en kostbare procedure waarbij de diagnose afstoting kan worden gemist. Dit komt omdat slechts een klein gedeelte van het totale orgaan kan worden beoordeeld (sampling error). Daarnaast kan de uitkomst (de diagnose) variëren als gevolg van variatie tussen pathologen (inter-observer variabiliteit) in de beoordeling van weefsel; 2) de huidige minimaal-invasieve testen in bloed of urine, ofwel biomarkers, zijn niet in staat om in een vroeg stadium een afstoting aan te tonen. Tevens kunnen deze testen geen onderscheid maken tussen transplantaatschade veroorzaakt door een afstoting en transplantaatschade door een andere oorzaak. Daarom is het van groot belang dat nieuwe minimaal-invasieve biomarkers worden ontwikkeld. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om te onderzoeken of nieuwe minimaal-invasieve biomarkers kunnen bijdragen aan de (vroeg)diagnostiek van afstoting, te weten het meten van donorspecifiek cel-vrij DNA (ddcfDNA) circulerende cel-vrij nucleosomen (CCFN) en circulerende endotheelcellen (cECs).



Hoofdstuk 1 beschrijft waarom minimaal-invasieve biomarkers nodig zijn, en vat de huidige ervaringen en de eerste bewijzen samen voor ddcfDNA, CCFN en cECs metingen als minimaal-invasieve biomarkers voor afstoting. Bij een afstoting raakt het weefsel van het donororgaan beschadigd. Het gevolg hiervan is dat de inhoud van deze donorcellen, zoals DNA en nucleosomen, vrijkomt in het bloed van de ontvanger (zogenaamd cel-vrij). Het is mogelijk om cfDNA afkomstig van de donor (ddcfDNA) en cfDNA afkomstig van de ontvanger van elkaar te onderscheiden doordat de bouwstenen van het DNA, de zogenaamde nucleotiden, tussen de donor en ontvanger variëren (genetische verschillen). Nucleosomen afkomstig van de donornier kunnen worden gemeten omdat ze over eigenschappen (modificaties) beschikken die specifiek zijn voor een bepaald cel- of weefseltype. Als laatste zijn endotheelcellen, die de binnenste laag van de bloedvaten vormen, onderzocht. Het endotheel van de donornier kan aangetast raken tijdens een afstotingreactie, waardoor endotheelcellen kapot gaan, loslaten en in de bloedbaan komen.

De waarde van ddcfDNA om afstoting te diagnosticeren wordt beschreven in **Hoofdstuk 2**. Hier wordt een niertransplantatie patiënt beschreven die gediagnosticeerd was met een melanoom (huidkanker) en daarvoor werd behandeld met het antilichaam nivolumab, een zogenaamde immuun checkpoint remmer. Nivolumab bindt aan anti-geprogrammeerde celdood 1 (PD1) eiwitten (receptoren) aan de buitenkant van een bepaald type afweercellen, de T cellen. Hiermee blokkeert nivolumab de interactie tussen de PD1 receptor op T cellen en ligand PDL1, aanwezig op melanoomcellen, waardoor een effectieve anti-tumor immuunreactie mogelijk wordt. Een nadeel van de beschreven blokkade is echter dat het leidt tot een overactief immuunsysteem, wat bij orgaantransplantatie patiënten vervolgens kan leiden tot afstoting. De beschreven patiënt ontwikkelde inderdaad een ernstige vorm van afstoting na de start van nivolumab. Op het moment van afstoting was het ddcfDNA verhoogd. Ondanks de behandeling met anti-afstotingstherapie is de nier afgestoten, waarna deze moest worden verwijderd. Immunologische analyse van deze nier liet geactiveerde witte bloedcellen (T cellen) van de patiënt op de donor nier zien. Dit betrof infiltratie van PD1+ CD8+ cytotoxische T cellen, waarbij de PD1 receptor geblokkeerd was door nivolumab. Deze casus toont aan dat nivolumab therapie hoogstwaarschijnlijk leidde tot activatie van T cellen, hetgeen resulteerde in transplantaat afstoting. Concluderend, deze casus laat de waarde van ddcfDNA zien als biomarker voor afstoting en geeft meer inzicht in de ontwikkeling van afstoting tijdens behandeling met immuun checkpoint remmer.

DdcfDNA is een veelbelovende biomarker voor het opsporen van de afstotingsreactie bij hart- of niertransplantatie patiënten. Tot dusver zijn er verschillende (gestandaardiseerde) methodes ontwikkeld die gebruikt kunnen worden voor het meten van ddcfDNA. Echter is het nog niet duidelijk welke methode de voorkeur heeft.



Onderscheid tussen de donor en ontvanger kan gemaakt worden op basis van een verschil in één nucleotide (een zogenaamd single nucleotide polymorphism (SNP)), of op basis van een verschil in meerdere nucleotiden, zogenaamde inserties of deleties (InDels). Normaal gesproken wordt ddcfDNA gemeten met polymerasekettingreactie (PCR)-gebaseerde technieken, waarbij een specifiek stukje ddcfDNA wordt vermeerderd zodat er uiteindelijk genoeg stukjes ddcfDNA zijn om te kunnen meten. Dit specifieke stukje ddcfDNA wordt vermeerderd met behulp van zogenaamde amplicon assays die in lengte, uitgedrukt in aantal baseparen (bp), verschillen. Donorcellen kunnen dit specifieke stukje ddcfDNA in enkelvoud bij zich dragen (heterozygoot, ofwel 50%), maar ook in tweevoud (homozygoot, ofwel 100%). Om heterozygoot ddcfDNA met homozygoot ddcfDNA te kunnen vergelijken in transplantatie patiënten, dient er gecorrigeerd te worden voor het donor genotype.

In **Hoofdstuk 3** zijn twee technische valkuilen geïdentificeerd die de interpretatie van het gemeten ddcfDNA kunnen beïnvloeden. ddcfDNA werd in deze studie vermenigvuldigd gebruikmakend van InDel amplicon assays en gemeten middels een droplet-digital PCR (ddPCR). Ten eerste werd het effect van verschillende lengtes van de gebruikte InDel amplicon assays op de hoeveelheid gemeten ddcfDNA onderzocht in dezelfde bloedmonsters van niertransplantatie patiënten. Hieruit bleek dat bij het gebruik van korte InDel amplicon assays (<167 bp) het gemeten ddcfDNA hoger was dan wanneer lange InDel amplicon assays (>167 bp) werden gebruikt. Ten tweede werden donorcellen gebruikt om het donor genotype te bepalen (**Hoofdstuk 3**) en hieruit bleek dat de specifieke DNA stukjes in heterozygote donoren 9.1-68.2% van het totale DNA was, terwijl specifieke DNA stukjes in homozygote donoren werden gemeten in 79.8-146.2% van het totale DNA. Deze bevindingen laten zien dat het gebruik van korte amplicon assays de voorkeur verdient aangezien lange amplicon assays minder efficiënt zijn wat leidt tot een onderschatting van ddcfDNA waardes. Daarnaast is het met de gebruikte methode onwenselijk om ddcfDNA te corrigeren voor donor genotype met een factor 2 aangezien heterozygote en homozygote donor niet precies 50% en 100% zijn.

Zoals beschreven zijn er verschillende (gestandaardiseerde) methodes die gebruikt kunnen worden om ddcfDNA te meten. Echter is het momenteel nog niet duidelijk welke methode de voorkeur geniet. De ddPCR-gebaseerde InDel methode werd in **Hoofdstuk 4** vergeleken met een commercieel verkrijgbare, op next generation sequencing (NGS) gebaseerde SNP methode. In deze studie werd gevonden dat de hoeveelheid gemeten ddcfDNA tussen beide methodes sterk met elkaar overeenkomen. Dit impliceert dat beide methodes kunnen worden gebruikt om ddcfDNA te meten. Desalniettemin heeft de NGS methode de voorkeur voor het meten van ddcfDNA in het lagere bereik.



Bij harttransplantatie patiënten is een hartbiopsie noodzakelijk om een afstoting vast te stellen. Echter, dit is een ingrijpende procedure waarbij schade aan het transplantaat wordt veroorzaakt wat vervolgens kan leiden tot een verhoging van ddcfDNA in de bloedbaan. Het effect van een hartbiopsie op de hoeveelheid ddcfDNA werd onderzocht in bloedmonsters van harttransplantatie patiënten (**Hoofdstuk 5**). Het ddcfDNA was verhoogd na de biopsie in vergelijking met het gemeten ddcfDNA voor de biopsie. Concluderend leidt de schade die ontstaat door de biopsie zelf tot een verhoging van het ddcfDNA. Het is daarom van het grootste belang dat voor ddcfDNA bepalingen, bloedmonsters altijd worden afgenomen voorafgaand aan de biopsie.

De waarde van ddcfDNA werd onderzocht als minimaal-invasieve biomarker voor afstoting in 223 opeenvolgende niertransplantatie patiënten (**Hoofdstuk 6**). Kort na de transplantatie was het ddcfDNA verhoogd in deze patiënten, waarna het ddcfDNA daalde naar normaalwaardes. Na dag 10 na transplantatie was de concentratie ddcfDNA verhoogd in patiënten die een afstotingsreactie ondergingen ten opzichte van patiënten die niet afstoten. Echter, in de eerste 10 dagen na transplantatie was de concentratie ddcfDNA niet hoger in patiënten met afstoting ten opzichte van patiënten zonder een afstoting. Dit komt waarschijnlijk doordat in deze vroege periode het ddcfDNA al verhoogd was, mogelijk als gevolg van schade die ontstaat aan het orgaantransplantaat rondom de transplantatie, de zogenaamde ischemie-reperfusie schade. Samenvattend kan er worden geconcludeerd dat de concentratie ddcfDNA gebruikt kan worden om afstoting aan te tonen na de eerste 10 dagen na niertransplantatie.

Nucleosomen komen, net als ddcfDNA, vrij in de bloedbaan als gevolg van schade en kunnen daarom een veelbelovende test zijn voor het meten van schade aan het transplantaat. Door het meten van nucleosomen met bepaalde modificaties, zou specifiek schade als gevolg van afstoting kunnen worden gedetecteerd. Daarom werd de waarde van totaal circulerende nucleosomen en circulerende nucleosomen met de modificaties “H3K36me3” of “H3 Citrulline” onderzocht om afstoting aan te tonen (**Hoofdstuk 7**). In deze studie bleek dat de totale concentratie nucleosomen was verhoogd in de eerste dagen na transplantatie, waarna de concentratie daalde naar lagere waardes op dag 180 na transplantatie. Tevens was de totale concentratie nucleosomen verhoogd in patiënten die afstoten, ten opzichte van patiënten die niet afstoten. De hoeveelheid nucleosomen met de modificaties H3K36me3 of H3 citrulline was niet verschillend tussen patiënten met en patiënten zonder een afstoting. Concluderend zou de totale concentratie nucleosomen mogelijk gebruikt kunnen worden om afstoting te detecteren.



Een andere mogelijke biomarker voor afstoting na transplantatie zijn circulerende endotheelcellen aangezien het endotheel de eerste plek is waar cellen van de ontvanger in aanraking komen met het transplantaat. Daarom werden van niertransplantatie patiënten de circulerende endotheelcellen bestudeerd (**Hoofdstuk 8**). In deze studie werd gevonden dat de concentratie circulerende endotheelcellen, evenals ddcfDNA en circulerende nucleosomen, ook verhoogd was kort na transplantatie. De concentratie circulerende endotheelcellen was niet verschillend tussen patiënten met en patiënten zonder een afstoting. De bevindingen in deze studie suggereren dat de transplantatieprocedure een meetbaar effect heeft op het aantal circulerende endotheelcellen, terwijl dit effect niet kan worden gezien ten tijde van een afstoting.