



Samenvatting proefschrift A.C.J. van der List

“T cell alloreactivity to the kidney transplant
Lessons from the elderly”

Promotie: 13 februari 2024
Erasmus Universitair Medisch Centrum
Rotterdam

Promotor:
Prof. dr. C.C. Baan

Co-promotors:
Dr. N.H.R. Litjens
Dr. M.G.H. Betjes

Het risico op een acute T-cel-gemedieerde afstoting (TCMR) in niertransplantatiepatiënten is het grootst in het eerste jaar na transplantatie. Om dit risico te verminderen nemen patiënten immunosuppressieve (IS) medicatie, hoewel dit de gevoeligheid voor infecties, kanker en hart- en vaatproblemen verhoogt. Na verloop van tijd neemt het risico op acute TCMR af, deels toegeschreven aan een vermindering in de T-cel-activiteit tegen donor antigenen, ook wel bekend als donor-specifieke hypo-activiteit (DSH). De mechanismen die ten grondslag liggen aan DSH zijn echter onbekend.

De incidentie van acute TCMR in het eerste jaar na de transplantatie is lager in oudere (>54 jaar) vergeleken met jongere (<45 jaar) niertransplantatiepatiënten. Dit verminderd risico op acute TCMR kan te wijten zijn aan een versnelde of meer uitgesproken ontwikkeling van DSH in ouderen na transplantatie. Het vergelijken van de donoractiviteit van T cellen in verschillende leeftijdsgroepen kan licht werpen op de ontwikkeling van DSH en helpen bij het afstemmen van IS-medicatie.

In hoofdstuk 1 hebben we de klinische relevantie beschreven van het bestuderen van de donor-actieve T-cel-immuniteit in oudere niertransplantatiepatiënten. Ons doel om het fenotype en de functie van donor-actieve T cellen in jonge en oude niertransplantatiepatiënten te karakteriseren, werd beschreven, evenals ons overkoepelende doel om DSH-ontwikkeling na transplantatie beter te begrijpen. CD137, een activatie geïnduceerde marker (AIM), stelde ons in staat om donor-actieve T cellen op het niveau van de individuele cel te identificeren en te bestuderen in het perifere bloed van niertransplantatiepatiënten.

Eerst hebben we donor-actieve T cellen in stabiele niertransplantatiepatiënten gekarakteriseerd, omdat van hen wordt verwacht dat ze hyporesponsief zijn geworden op het getransplanteerde orgaan. We hebben de hypothese getest dat DSH werd veroorzaakt doordat donor-actieve T cellen uitgeput of verouderd waren na chronische stimulatie met donor-antigenen in hoofdstuk 2. We voerden een cross-sectioneel onderzoek uit naar



donorreactieve T cellen, door gebruik te maken van perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC) van niertransplantatiepatiënten vóór en 3-5 jaar na transplantatie, en hebben de expressie van markers voor uitputting en veroudering gemeten met behulp van flowcytometrie. In dit onderzoek is ongeleide clustering gebruikt om een leeftijdsonafhankelijke afname in CD137+CD4+TIGIT+ (meer uitgesproken in ouderen) te ontdekken. Deze CD137+CD4+TIGIT+ T cellen waren voornamelijk van het geheugenfenotype, hadden een hoger percentage CD27+CD28+ T cellen en hadden expressie van drie pro-inflammatoire cytokines (IL-2, TNF- α , IFN- γ). Onze gegevens ondersteunden echter niet de rol van uitputting bij DSH.

Andere mechanismen die mogelijk leiden tot DSH werden bestudeerd in hoofdstuk 3, waar we het fenotype en de functie vóór transplantatie en 3-5 jaar na transplantatie in stabiele niertransplantatiepatiënten in meer detail karakteriseerden. We ontdekten een significante afname van polyfunctionele (dat wil zeggen, meerdere pro-inflammatoire cytokine producerende) CD4+ donor-reactieve T-geheugencellen. Hun afname lag aan de basis van de ontwikkeling van DSH in niertransplantatiepatiënten en deze afname werd waarschijnlijk gemedieerd door activatie-geïnduceerde celdood (AICD). De afname in polyfunctionele CD4+ donor-reactieve CD137+ T-geheugencellen ging gepaard met een afname in proliferatie van CD4+ T cellen. Een nader onderzoek naar AICD als mogelijk mechanisme voor DSH ontwikkeling onthulde een toename van donor-antigen-geïnduceerde apoptose, met name binnen CD4+ donor-reactieve T-geheugencellen. Tevens werden tijdintervallen van meer dan 5 jaar getest en bleven de frequenties van de donor-reactieve T cellen laag. Interessant genoeg waren CD4+ donor-reactieve T cellen niet langer meetbaar in de bloedsomloop meer dan 5 jaar na transplantatie, terwijl CD8+ donor-reactieve T cellen pas 10 jaar na transplantatie afnamen. In conclusie, DSH werd gekenmerkt door een afname van polyfunctionele donor-reactieve (geheugen) CD137+ CD4+ T cellen en een afname van proliferatief potentieel gericht tegen donor-antigen. De afname in CD4+ ging vooraf aan die van CD8+ donor-reactieve T cellen en was waarschijnlijk vanwege een toename van AICD.

De relevantie van de afname in polyfunctionele CD4+ donor-reactieve T cellen na transplantatie werd verder geëvalueerd door de hypothese te testen dat de proporties van deze cellen vóór de transplantatie geassocieerd waren met het risico op een acute TCMR in hoofdstuk 4. Vóór transplantatie waren de proporties van CD4+ en CD8+ donor-reactieve T cellen met hogere CD137-expressie en polyfunctionaliteit significant hoger in ontvangers met een met biopt bewezen acute TCMR versus patiënten zonder afstoting in het eerste jaar na transplantatie. Deze cellen waren voornamelijk effectorgeheugen fenotype en coëxprimeerden CD28, overeenkomend met het profiel van 'risicovolle' cellen die eerder waren geïdentificeerd. Deze populatie van polyfunctionele donor-reactieve CD137++ CD4+, (maar niet CD8+) T cellen waren specifiek afgenomen op het moment van biopt in zowel niertransplantatie patiënten als op vergelijkbare tijdsintervallen in niertransplantatiepatiënten zonder bewezen rejectie. Daardoor kan geconcludeerd worden dat de proporties van polyfunctionele donor-reactieve CD4+ evenals CD8+ T cellen vóór transplantatie geassocieerd zijn met het risico op een acute TCMR in het eerste jaar na niertransplantatie.

Vervolgens hebben we de bijdrage van de leeftijd van de ontvanger bij transplantatie aan de ontwikkeling van DSH te geëvalueerd in hoofdstuk 5. Een longitudinale studie werd



uitgevoerd naar donor-reactieve T cellen in PBMC verkregen vóór transplantatie en op verschillende tijdstippen na transplantatie van stabiele jongere en oudere niertransplantatiepatiënten. Vóór transplantatie hadden oudere niertransplantatiepatiënten al een lagere frequentie van CD4+ T cellen die IL-2 en TNF- α produceerden en lieten CD8+ T cellen een significant lager proliferatief vermogen zien na stimulatie met alloantigen. Interessant genoeg werd dit verminderde vermogen van CD8+ T cellen om te prolifereren in reactie op antigen-stimulatie niet hersteld door de toevoeging van exogeen IL-2. In het eerste jaar na transplantatie nam de frequentie van polyfunctionele CD4+ T cellen evenals het proliferatief vermogen tegen donor-antigen gericht af, ongeacht de leeftijd van de ontvanger. Echter, ouderen bereikten lagere niveaus van polyfunctionele donor-reactieve CD4+ T cellen in vergelijking met jongere ontvangers.

Naast het karakteriseren van donor-reactieve T cellen in stabiele niertransplantatiepatiënten voor wat betreft eiwitexpressie, hebben we ook messengerRNA (mRNA) gemeten. mRNA expressie was gemeten door middel van een recent ontwikkelde single-cell RNA sequencing methodologie die analyse van het transcriptoom en het T cel receptor (TCR) repertoire van TRA/TRB clonotypes op individueel celniveau combineert. Een uitdaging van deze techniek is dat donor-reactieve T cellen een zeer klein percentage (~1%) van de totale perifere T cellen uitmaken. Dit betekent dat zeer beperkte aantallen cellen beschikbaar zijn in vergelijking met wat traditioneel gebruikt wordt voor single-cell RNA sequencing. In hoofdstuk 6 valideerden we dat het ICELL8 Single Cell System in staat was om gecombineerde ondervraging van zowel de TRA/TRB-clonotype-repertoire als het transcriptoom van heterogene, paucicellulair klinische monsters mogelijk (100-200 cellen/monster) te maken. Echter, klinische monsters met een scheve TRA/TRB-repertoire konden niet worden onderscheiden van monsters met een breder repertoire op individueel celniveau. Vanwege hun heterogene aard (meerdere T-celsubsets en niveaus van functionaliteit) en diversiteit met betrekking tot het TRA/TRB-repertoire zijn grotere aantallen (antigen-specifieke) T cellen nodig om groepering van cellen met een vergelijkbaar TRA/TRB-repertoire waar te nemen. Wel was de methodologie in staat om onderscheid te maken tussen transcriptoomprofielen. Er waren verschillen tussen CD4+ en CD8+ T cellen met cytotoxische effectorfunctie en het transcriptoom van cytomegalovirus (CMV)-seropositive en CMV-negatieve klinische monsters.

Door gebruik te maken van deze methodologie werd het transcriptoom en TCR repertoire van CD137-expresserende donor-reactieve T cellen van stabiele niertransplantatie patiënten in kaart gebracht. In hoofdstuk 7 onthulde single cell RNA-sequencing van donorreactieve T cellen van stabiele ontvangers van een niertransplantaat dat post-transplantatie donor-reactieve CD4+ T cellen een specifieke downregulatie hadden van genen die betrokken zijn bij T-cel cytokine-gemedieerde routes en apoptose. Er werden geen veranderingen in het profiel van CD8+ donor-reactieve T cellen waargenomen. In conclusie, waarnemingen die gedaan zijn bij stabiele ontvangers van niertransplantaten op eiwitniveau werden bevestigd op RNA-niveau, namelijk het verlies van geactiveerde donorreactieve T cellen met een zeer pro-apoptotisch karakter.

In hoofdstuk 9 worden de bevindingen en implicaties van het onderzoek beschreven in dit proefschrift besproken, conclusies getrokken en aanbevelingen voor toekomstig onderzoek gedaan.