



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Modulated rat dendritic cells in renal transplantation models : immune regulation and graft outcome

Stax, A.M.

Citation

Stax, A. M. (2008, December 16). *Modulated rat dendritic cells in renal transplantation models : immune regulation and graft outcome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13395>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13395>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse Samenvatting

Samenvatting

Niertransplantatie

Patiënten met eindstadium nierfalen zijn voor hun overleving afhankelijk van nierfunctievervangende therapie zoals nierdialyse of het ondergaan van een niertransplantatie. Aangezien dialyse niet de gehele nierfunctie kan overnemen en deze behandeling in hoge mate de manier van leven beperkt, wordt in het algemeen de voorkeur gegeven aan een niertransplantatie. Hierbij ontvangt de patiënt een nier van een donor, die in de meeste gevallen genetisch niet identiek is aan de patiënt. Daarom zal het immuunsysteem van de patiënt een specifieke reactie op gang brengen, die ervoor kan zorgen dat het lichaamsvreemde orgaan afgestoten wordt. Om dit te voorkomen is het voor transplantatiepatiënten noodzakelijk om levenslang immuunonderdrukkende medicatie in te nemen.

Witte bloedcellen spelen een belangrijke rol bij de afweer tegen lichaamsvreemde cellen. Van deze witte bloedcellen zijn dendritische cellen (DCs) in staat om lichaamsvreemde cellen te herkennen en vervolgens andere witte bloedcellen, T cellen, te informeren over de aanwezigheid van deze cellen. Zodra T cellen deze informatie krijgen, zijn ze in staat om de lichaamsvreemde cellen te verwijderen.

Dendritische cellen kunnen zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde eiwitten opnemen en afbreken in kleine stukken, peptides. Deze peptides, die in het geval van een transplantatie afkomstig zijn van donorweefsel, worden gepresenteerd op eiwitten, HLA (Human Leukocyte Antigen) moleculen, die aanwezig zijn op het celoppervlak van DCs en voor elk individu uniek zijn. Vervolgens migreren DCs naar een gespecialiseerd lymfoïd orgaan, zoals de milt of lymfeklieren. Dit orgaan bevat T cellen, die de peptides afkomstig van de donor op het HLA-molecuul van ontvanger DCs herkennen. Dit is de indirecte route van antigeen presentatie. Daarnaast, gebaseerd op een vorm van kruisreactie, zijn sommige T cellen ook in staat om de vreemde HLA-moleculen op het oppervlak van donor DCs direct te herkennen. Deze zogenaamde directe route van antigeen presentatie, is specifiek voor transplantatie en lijkt vooral in de eerste periode na transplantatie een rol te spelen. De T cellen raken geactiveerd en vermenigvuldigen zich. Vanuit de lymfoïde organen migreren ze via de bloedbaan naar de getransplanteerde nier. Hier herkennen T cellen de lichaamsvreemde cellen en vernietigen deze, uiteindelijk resulterend in afstoting van de getransplanteerde nier.

De mate waarin T cellen geactiveerd raken, wordt bepaald door DCs en is afhankelijk van de aan- of afwezigheid van signalen. De chirurgische schade en het gebrek aan zuurstof, die ontstaat gedurende de transplantatie, induceert allerlei "gevaar-signalen", welke leiden tot infiltratie van ontvanger DCs en activatie/maturatie van zowel ontvanger als donor DCs. Deze laatst genoemde cellen zijn al in het transplantaat aanwezig op het moment dat de transplantatie uitgevoerd wordt. Maturatie wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van co-stimulatoire moleculen op DCs en productie van cytokinen. De combinatie van co-stimulatoire moleculen, cytokinen en de "directe" herkenning van vreemde HLA-moleculen op donor DCs of de "indirecte" herkenning van vreemde peptides gepresenteerd op HLA-moleculen van ontvanger DCs resulteert in de volledige activatie van T cellen. In tegenstelling tot de reactie op "gevaar-signalen", vindt er geen maturatie plaats wanneer er lichaamseigen eiwitten worden opgenomen

door DCs. Dendritische cellen zijn dan in staat om het immuunsysteem te reguleren. De stimulatorische capaciteit van DCs is laag, T cellen ontvangen geen activatiesignalen en raken niet geactiveerd.

Zoals hierboven genoemd kan een afstotingsreactie grotendeels voorkomen worden door gebruik te maken van immunosuppressiva. Door sterke verbeteringen op dit gebied is tegenwoordig de kans op overleving van het transplantaat in het eerste jaar groter dan 90%. In tegenstelling tot de verbeterde 1^{ste} jaars overleving, is er relatief weinig vooruitgang geboekt op de overleving van het transplantaat op de lange termijn. Verder blijkt ook dat patiënten die langdurig immunosuppressiva gebruiken veel bijverschijnselen vertonen, zoals ontwikkeling van maligniteiten en verhoogde kans op infecties. De ontwikkeling van nieuwe therapieën is daarom van belang om de lange termijn overleving van transplantaties te verbeteren. Een strategie, die zich de afgelopen jaren aangediend heeft, is het gebruik van DCs als cellulaire therapie.

De capaciteit van DCs om het afweersysteem te stimuleren of te reguleren maakt het gebruik van DCs interessant voor cellulaire therapie. In proefdiermodellen is aangetoond dat voorbehandeling van ontvangers met immature DCs, afkomstig van de donor, in staat is om tolerantie te induceren voor een getransplanteerd hart of getransplanteerde eilandjes van Langerhans. Een nadeel van het gebruik van immature donor DCs is dat deze DCs in het lichaam van de ontvanger ook "gevaar-signalen" kunnen tegenkomen. Deze cellen kunnen dus geactiveerd raken, matureren, en uiteindelijk via de directe route T cellen activeren, een proces dat alsnog kan leiden tot een afstotingsreactie. Om dit laatste te voorkomen is het gewenst om de immature staat van DCs te behouden en te voorkomen dat ze matureren.

Studies met humane DCs hebben aangetoond dat in aanwezigheid van de corticosteroid Dexamethason (Dex), DCs immatuur blijven. In het huidige proefschrift worden de studies beschreven waarin een methode is opgezet om rat DCs in vitro te genereren en te moduleren tot regulatoire DCs met behulp van Dex. Vervolgens is het effect van Dex behandelde DCs, afkomstig van de donor, op niertransplantaat overleving bestudeerd in een ratmodel.

Dendritische cellen als therapie tegen het afstotingsproces

Aangezien de hoeveelheid DCs, die direct uit het bloed verkregen kunnen worden, laag is, wordt voor toepassing van deze cellen veel gebruik gemaakt van cellen welke uitgaande van monocytten of beenmergcellen gedifferentieerd zijn tot DCs. In **hoofdstuk 2** wordt het fenotype beschreven van rat DCs, die gegenereerd zijn uit beenmergcellen. Vergelijkbaar met in vitro gegenereerde humane en muis DCs, expresseren de in dit proefschrift gebruikte rat DCs MHC moleculen (Major Histocompatibility Complex), die verwant zijn aan HLA-moleculen. Daarnaast expresseren ze ook de co-stimulatorische moleculen CD80, CD86 en CD40. Andere markers die aanwezig zijn op de rat DC zijn OX62, een molecuul dat op de meeste rat DCs aanwezig is, NKR-P1A en CD11b/c. Stimulatie van humane en muis DCs met Lipopolysaccharide (LPS), een component van een bacteriële celwand, welke een gevaar-signaal nabootst, of CD40L, een molecuul op T cellen dat de maturatie van DCs versterkt, verhoogt de expressie van de co-stimulatorische moleculen en de uitscheiding van cytokinen. Hierdoor neemt de stimulatorische capaciteit van DCs toe. In onze studie konden we geen verhoogde

expressie van de co-stimulatoire moleculen detecteren op rat DCs na stimulatie met LPS of CD40L. Vergeleken met niet geactiveerde cellen waren de gestimuleerde rat DCs echte wel beter in staat om T cellen te activeren. De uitscheiding van cytokinen door rat DCs bleek afhankelijk te zijn van het type stimulus. Zowel LPS als CD40L induceerden de uitscheiding van IL-12 door rat DCs. Opvallend hierbij was dat CD40L in staat was om veel meer IL-12 productie te induceren dan LPS. Verder werd IL-10 alleen geproduceerd wanneer de DCs gestimuleerd werden met LPS en niet met CD40L.

Hoofdstukken 3 en 4 beschrijven het effect van LPS-gestimuleerde Dex-gemoduleerde rat DCs, afkomstig van de donor, in een niertransplantatie model. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven dat Dex de LPS-geïnduceerde maturatie van DCs voorkomt. LPS stimulatie van DCs, gegenereerd in aanwezigheid van Dex (LPS-DexDC), vertoonden een verlaagde productie van het proinflammatoire cytokine IL-12, terwijl de productie van het anti-inflammatoire cytokine IL-10 niet veranderde. Samen met een verlaagde expressie van co-stimulatoire moleculen leidde dit tot een verminderde capaciteit om T cellen te activeren. De in vivo experimenten demonstreerden dat T cellen, afkomstig van LPS-DexDC behandelde ontvanger ratten, in aanwezigheid van donor cellen zich niet vermenigvuldigden en minder IFN- γ produceerden. IFN- γ is een cytokine dat een rol speelt bij de vernietiging van donor cellen. Daarentegen bleken deze T cellen hiertoe wel in staat te zijn wanneer ze gekweekt werden met cellen afkomstig van een andere rattenstam. Dit betekent dat LPS-DexDC, afkomstig van de donor, ook in vivo in staat zijn om T cellen te reguleren en dus een donor-specifieke T cel hyporesponsiviteit induceren. Ondanks de aanwezigheid van deze hyporesponsieve T cellen werd de getransplanteerde nier afgestoten.

Om meer inzicht te krijgen in het afstotingsproces werd deze studie in **hoofdstuk 4** vervolgd door de transplantaten histologisch te bestuderen. Gezonde rattennieren bevatten relatief meer myeloïde cellen dan lymfoïde cellen en het aantal myeloïde cellen verschilt per rattenstam. Getransplanteerde nieren, afkomstig van LPS-DexDC behandelde ontvangers, vertoonden een sterke toename van myeloïde en lymfoïde cellen op het moment dat afstoting werd geconstateerd. Opvallend was dat het aantal infiltrerende CD8⁺ T cellen een stuk lager was in transplantaten van LPS-DexDC behandelde ontvangers vergeleken met controlebehandelingen. Ook dit wijst erop dat LPS-DexDC in staat zijn om in vivo T cellen te reguleren. Andere immuuncellen, zoals macrophagen, DCs en NK cellen, worden daarentegen niet gereguleerd door LPS-DexDC en zouden een verklaring kunnen zijn voor het afstotingsproces dat in de getransplanteerde dieren plaatsvond.

Verbetering van therapieën gebaseerd op dendritisch cellen

Ondanks de inductie van T cel hyporesponsiviteit in twee rattenmodellen door donor immature DCs, vond in beide modellen afstoting plaats. Dit zou ook verklaard kunnen worden door de herkenning van de toegediende donor DexDCs als vreemd door ontvanger DCs. Als gevolg hiervan zullen de ontvanger DCs deze ingespoten cellen opnemen en presenteren en uiteindelijk in staat zijn om T cellen te activeren via de indirecte route van antigeen presentatie. Hierdoor kan afstoting alsnog plaatsvinden. Een belangrijke route waarin ingegrepen kan worden om DC-gebaseerde therapie te

verbeteren, is het voorkomen van T cel activatie via de indirecte route. Een mogelijkheid is het blokkeren van co-stimulatoire moleculen, die noodzakelijk zijn voor een goede T cel activatie. Verschillende transplantatiemodellen hebben aangetoond dat het gebruik van alleen blokkerende antilichamen, gericht tegen co-stimulatoire moleculen, acute rejectie voorkomt en de kans op chronische rejectie met 50% verlaagt. Het gebruik van dit soort blokkerende antilichamen, in combinatie met het toedienen van donor afkomstige DCs, kan een toegevoegde waarde hebben. De beperkte beschikbaarheid van een blokkerend antilichaam tegen rat CD40L, heeft ons doen besluiten een nieuw antilichaam tegen rat CD40L te ontwikkelen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de constructie van een nieuw hamster-anti rat CD40L antilichaam, genaamd AS1. Het monoclonale antilichaam bond aan CD40L en was zowel in vitro als in vivo in staat om activatie van cellen via CD40-CD40L te voorkomen. Het blokkerende karakter van AS1 kan een toegevoegde waarde hebben voor de inductie van tolerantie voor niertransplantaten in combinatie met immature donor DCs. Zoals reeds beschreven, induceerde een behandeling met immature donor DCs donor-specifieke hyporesponsieve T cellen. De mogelijkheid dat ontvanger DCs gematureerd raken door de toegediende donor DCs en op die manier T cellen kunnen activeren zou voorkomen kunnen worden door de ontvanger naast de immature donor DCs ook met AS1 te behandelen.

Conclusie

De huidige therapieën die gebruikt worden tijdens en na transplantatie zijn vaak niet in staat om chronische rejectie te voorkomen en bij langdurig gebruik ontstaan er allerlei bijwerkingen. De ontwikkeling van nieuwe therapieën om dit te verbeteren is daarom van groot belang.

De belangrijke rol van DCs in het stimuleren of reguleren van immuunresponsen en de mogelijkheid om deze cellen regulatoire eigenschappen te geven, maakt ze interessant voor gebruik als cellulaire therapie. In dit proefschrift wordt aangetoond dat gemoduleerde DCs, afkomstig van de donor, zowel in vitro en in vivo in staat zijn om donor-specifieke T cel hyporesponsiviteit te induceren. Daarnaast resulteert deze behandeling in een verlaagde infiltratie van CD8⁺ T cellen in de getransplanteerde nier. Ondanks deze effecten is behandeling met alleen gemoduleerde donor DCs niet genoeg om transplantaat afstoting te voorkomen. Deze therapie zou verbeterd kunnen worden door een extra behandeling met blokkerende antilichamen gericht tegen co-stimulatoire moleculen, zoals AS1. Een andere mogelijkheid is het toedienen van immunosuppressie voor een korte periode vlak na transplantatie. Zoals beschreven in dit proefschrift hebben LPS-DexDC geen effect op infiltrerende macrophagen, DCs en NK cellen. Ook deze cellen kunnen een rol spelen in het initiëren van transplantaatafstoting. Een extra behandeling met immunosuppressiva gericht op deze cellen zou ervoor kunnen zorgen dat er minder macrophagen, DCs en NK cellen het transplantaat infiltreren als gevolg van de transplantatieprocedure en daarmee de kans op afstoting verkleinen. Het is te verwachten dat een behandeling met gemoduleerde donor DCs samen met een blokkerend antilichaam tegen co-stimulatoire moleculen, of met immunosuppressiva de overleving van een transplantaat kan verbeteren.

