

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28326> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Dixon, Karen

Title: The IL-12 family and dendritic cells : key regulators of immunity and immunological tolerance

Issue Date: 2014-08-28

Chapter

8

English, Irish & Dutch Summaries

List of abbreviations

Acknowledgements

Curriculum vitae

Bibliography

Summary

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells of the immune system. Their main function is to process antigenic material e.g. from pathogens or malignant cells, and present it on their cell surface to the T cells of the immune system. As such, DCs act as a bridge between the two arms of the immune system; the innate and the adaptive immune responses. DCs belong to the former but play a key role in orchestrating the adaptive immune response, on the one hand to promote immunity to pathogens and on the other to maintain tolerance to self or innocuous antigens. Consequently there is a great deal of interest in how DCs might be exploited as a form of immunotherapy e.g. to induce immunity to cancers or to promote graft acceptance in transplantation.

Soluble factors secreted by DCs are crucial mediators in determining this balance between the immunogenic and regulatory arms of the immune system and one such group of factors is cytokines. These cytokines are small proteins which can be released by cells and subsequently influence the behaviour of other cells. The cytokine network is a highly integrated and complex system which is generated in response to immune challenge. The overall balance between immunogenic and regulatory cytokines is what determines the nature of a particular immune response. Advances in our understanding of the role of cytokines in inflammatory diseases has led to a growing field of cytokine driven therapies aimed to either block or restore the activity of a particular cytokine. We have seen through the use of Anakinra, Etanercept and recombinant IFN α and IFN β that cytokine based therapies have proven successful. However, one of the major pitfalls with cytokine therapy, and what has laboured progress, is that in healthy individuals there is an equilibrium between inflammatory and regulatory cytokines. This balance becomes disturbed in chronic inflammatory states, such as autoimmunity and transplant rejection. However the required action to restore balance is not to just simply block inflammatory cytokines, or treat systemically with anti-inflammatory cytokines. For the latter it is difficult to determine how much and what cocktail of anti-inflammatory cytokines to administer. Additionally, giving too much could render an individual susceptible to viral and bacterial infection and may even promote the development of tumour growth.

Ideally one would not want systemic suppression to treat autoimmunity and transplant rejection, but rather specific regulation directed against the offending antigen at the level of the affected organ or tissue. In this way DCs generated in a tolerogenic manner would be the ideal vehicle, not only have they the ability to directly suppress and induce antigen specific regulatory T cells, but the inducible production of regulatory cytokines e.g. IL-10, would infer tolDCs with a second wave of immunosuppressive potential e.g. through the action of regulatory T

cells.

An individual cytokine can be produced by multiple cell types and can exert a broad array of functions. As a result of this, cytokines are often grouped into different families based on structural similarities rather than cellular origin or function. One family which is gaining increasing attention is the IL-12 family. It is composed of four members; IL-12 and IL-23 are immunogenic and their expression has been very well characterised in DCs. The other two, IL-27 and IL-35, are regulatory, but relatively little is known about their regulation and expression by DC populations. Promisingly, IL-35 has already been proven to be a broad regulatory cytokine with the ability to promote tolerance and immune suppression in an array of disease models including IBD, autoimmune diabetes and arthritis. In this thesis we aimed to give a comprehensive overview of the expression and regulation of IL-12 family members in human DCs, with a particularly emphasis on the IL-12, IL-27 and IL-35.

There has been much speculation as to whether DCs, particularly tolerogenic DCs could produce IL-35. We generated tolerogenic DC in vitro using the immunosuppressive agent Dexamethasone. In **Chapter 2** we presented data regarding the ability of these human tolDCs to produce IL-12p35 and Ebi3, the alpha and beta chain of IL-35, respectively. In this chapter we demonstrated, for the first time, that abrogating the production of IL-12p35 in tolDCs diminished the immunosuppressive capability of these cells and points to IL-35 as being a novel mediator of immune suppression by tolDCs.

Once thought of as a lack of a response, tolerance is now understood to be the result of many complex active processes that take place in order to preserve immune tolerance. This shift in rationale has extended to the field of apoptosis where an increasing body of evidence exists to support the idea that the so termed “silent removal” of apoptotic cells in the body is in fact a series of active processes that culminates in the maintenance of tolerance to self and innocuous antigens. As such, uptake of dying cells by DCs is considered to contribute to induction and maintenance of immunological tolerance in vivo. Many groups in the area of transplantation are striving to identify the best way to induce tolerance in allograft recipients. A promising strategy may be to culture tolDCs of recipient origin and feed them with donor apoptotic cells. Indeed it has been shown in a murine model that targeting of DCs with donor apoptotic material can restrain indirect allorecognition, a major hurdle in the quest for transplant tolerance. In **Chapter 3** we investigated how uptake of dead cells affected the production and expression of different members of the IL-12 family by either immature DC or tolDC. We demonstrated how phagocytosis of apoptotic (cells that die from programmed cell death) or necrotic cells (cells that die in an uncontrolled or

unregulated manner) by immature DCs or tolDCs modulated the release and expression of IL-12 cytokine family members, particularly the IL-12/IL-35 axis. We found that apoptotic cell uptake resulted in diminished production of IL-12p40 and IL-12p70, while simultaneously increasing expression of *IL12A* and *IL27B*. In addition we addressed an important question; which is that tolerogenic DCs are efficient at ingesting apoptotic material and that their regulatory cytokine profile is maintained even when challenged with necrotic material. In this chapter we conclude that ingestion of apoptotic versus necrotic cells by DCs differentially regulates the IL-12 family members thereby playing a role in determining the immune response in such events.

One of the most renowned pathways associated with apoptotic cell clearance is the complement system. The complement system is composed of a number of small proteins found in circulation and was first discovered by its ability to assist or “complement” the bactericidal activity of blood. Since its initial discovery, the complement system has established itself as an important mediator of apoptotic cell and immune complex clearance, pathogen eradication and lowering the threshold of B cell activation and antibody production. Considering the increased and accelerated clearance of dying cells by tolDCs in chapter 3 we began investigating the production and regulation of complement factors by DCs and tolDCs, with a particular focus on the lesser studied of the three complement pathways; the alternative pathway. In **Chapter 4** we described the production of two key regulators of the alternative pathway of complement by DCs and tolDCs. Factor H (fH) and properdin (fP) are at opposite poles in terms of complement regulation with fH being an important negative regulator and fP being the only known positive regulator within the entire system. We showed that IL-27 and members of the Interferon family differentially regulated the expression of fH and properdin. Surprisingly, IFN γ played a dual role, with the ability to markedly reduce fP secretion while simultaneously increasing fH. As such IFN γ appears to support complement regulation as opposed to activation. We further demonstrated how alteration in the balance between properdin and fH affected the allostimulatory capabilities of DCs with reduction of fH leading to increased T cell stimulation and reduction of fP resulting in diminished stimulation of T cells by DCs.

The work demonstrated in chapters 5 & 6 largely stemmed from the pioneering work by Matzinger and colleagues who put-forward the idea that the local organ or tissue in which an immune cell resides can possess enormous influence in determining the fate of that particular immune cell. In the last decade the kidney has come to light as being a hive of immune activity with many renal

cells possessing immunologically active molecules including B7H1, CD40 and MHC class II among others. In view of previous reports that Ebi3 expression is not restricted to haematopoietic lineages we investigated whether Ebi3 and other members of the IL-12 family could be identified within normal human kidney. In **Chapter 5** we analysed the expression of Ebi3 and related partners, IL-12p35 and IL-27p28, within normal human kidney, and found abundant expression of Ebi3 and IL-12p35 within the glomerular region. In-vitro experiments strongly suggested that podocytes were the source of this abundant Ebi3 expression. Analysis of an acute rejection patient cohort demonstrated that compared to the pre-transplant biopsies, Ebi3 transcripts were down-regulated during acute rejection. This data suggests a possible role for Ebi3 and Ebi3-related cytokines in allograft rejection that requires further investigation. Finally in **Chapter 6** we described that generation of DCs in the presence of healthy renal fibroblasts led to the development of a DC population with regulatory properties. These DCs displayed a reduced capacity to produce IL-12 but maintained normal levels of IL-23 and IL-27, while IL-10 production was elevated. Further experiments demonstrated that IL-6 was at least partially responsible for the ability of human renal fibroblasts to generate this regulatory DC population. One could question what happens in organs undergoing chronic inflammation. Considering the central location of fibroblasts within the kidney it is reasonable to postulate that these cells themselves are functionally affected in periods of inflammation or upon injury. This is likely to impair their ability to regulate local and infiltrating DC populations, thereby potentially exacerbating the inflammatory response. Little is known about the expression and responsiveness of renal fibroblast to DAMPs but research into this field could prove invaluable in fully understanding local DC responses.

In conclusion, one could argue that many of the remaining caveats in our understanding of the immune system relate in one way or another to the question of immune regulation and immune tolerance. This thesis highlights that the IL-12 family and DCs together can be harnessed to control and completely direct the adaptive immune response. Much remains to be seen in terms of the potential use for IL-35 therapeutically but in light of its clear immunoregulatory properties it could prove invaluable to expand our current knowledge on immune tolerance in vivo. Furthermore this thesis emphasises that the responsibility of immune homeostasis lies far beyond the professional immune cells (neutrophils, DCs, T and B cells) and that the local cellular and tissue environment should be considered in order to get a true perspective on local immune responses. The IL-12 family and DCs, either as individual entities or together, have the potential to lead to the development of specific immune based therapies, ultimately yielding sustained and targeted immune regulation.

Achoimre

Is iad na cealla dendritic (DC) na cealla a thugann antaigíní faoi deara sa chóras díolúine. Is é a bpríomh fheidhm ná ábhar antaigín a phróiseáil mar shampla ó cealla díobhálacha nó patalgin, agus taispéanann siad ar dhromchla na cealla do dtí na cealla T den gcóras díolúine. Mar sin gníomhann DC's mar droichead idir an dhá ghéag den gcóras díolúine; na freagraí solúbtha díolúine agus dúchasacha. Is cuid den chéad géag dúchasach ach tá ról speisialta acu sa mheádú den freagra solubtha díolúine, ar lámh amháin chun díonacht ar phatalgin a chur chun cinn agus ar an lámh eile chun caoin-fhulaingt a choimeád ar féin nó antigíní neamhúrchóideacha. De bharr sin tá suim ar leith in conas ar féidir leas a bhaint as DC's mar fhoirmde teiripe dhíonachta mar shampla chun díonacht ar ailse a fheidhmiú nó chun glacadh greamacht i nádú a chur chun cinn. Is idir gabháilthe rí thábhachtach na fachtóirí inthuaslagtha atá curtha amach ag na DC's, chun cothromacht a chinneadh idir géaga rialaithe agus immunogenic sa chóras díolúine agus grúpa amháin de na fachtóirí sin is ea cytokines. Is próitéin beaga iad na cytokines seo a féidir a ligeadh amach ag na cealla agus ina dhiaidh sin chun tionchar a bheith acu ar iompair na cealla eile. Is féidir saghasanna éagsúla cealla cytokine singil a thairgeadh agus is féidir réimse leathan feidhmiúcháin a bheith aige. De thoradh ar seo go minic cuirteac na cytokines isteach i ngrúpaí éagsúla bunaithe ar struchtúir ionanais in áit dúchas nó feidhmiú na cealla. Tá aire faoi leith á dhíriú ar ghrúpa IL-12. Tá sé déanta suas de cheithre bhail; IL-12 agus IL-23, is iad sin na cealla immunogenic agus léiríodh an carachtair atá acu ins na DC's. Is rialaitheoirí iad an dá cheann eile IL-27 agus IL-35 ach níl mórán ar eolas faoina rialacháin nó a léiriú daonra DC. Ins an tráchtas seo sé an aidhm a bhí again ná forbhreachnú cuimsitheach de léiriú agus rialú na bail den IL-12 ins na DC's daonna le béim faoi Leith ar an IL-12, IL-27 agus IL-35.

Is iomaí tuairmíocht atá déanta ar na DC's, go háirithe DC's tolerogenic ar an féidir leo IL-35 a thairgeadh. Rinneamar DC tolerogenic a ghiniúnt in-vitro ag baint úsáid as gníomhaire coscáithe imdhíonachta dexamethasone. I gcaibidil 2 léiríomar sonraí maidir le cumas le na tolDC's daonna seo chun IL-12p35 agus Ebi3 a thairgeadh, an slabhra alpha agus beta de IL-35 fách seach. Ins an cáibidil seo thaispeánamar don chéad uair mair a aisgairiú an tairgeadh de IL-12p35 i tolDC's gur laighdigh sé an cumas coscádh imdhíonachta de na cealla agus taispeánann sé gur idirgabhálaí úr é IL-35 de coisceadh imdhíonachta ag tolDC's. Uair amháin ceapadh gur de bharr easpa freagrachta ach anois tuigtear go bhfuil an lamháltas ann de thoradh próiseisí casta gníomhachtaithe a tharlaíonn chun lamháltas imdhíonachta a chaomhnú. Tá an t-athrú seo i réasunaíocht a leathrú go dtí an réimse apoptosis áit a bhfuil corp fianaise atá ag méadú ann chun cuidiú

leis an barúil gur próiséisí gníomhachta iad sin atá ainmnithe mar próiséisí bainte go riúin do na cealla apoptotic sa cholann a chríochnaíonn i gothabháil na caoinfhulaingthe chun féin antaigíní agus antaigíní neamhúrchóideacha. Mar sin tuigtear go gcuidíonn an tabhairt suas de na cealla DC's atá ag dul in éag leis an ionduchtú agus an cothabháil den lámhaltas imdhíoneolaíochta in-vivo. Tá an-chuid grúpaí maidir le nodaíocht ag déanamh iarracht fáil amach an bealach is fear chun lámhaltas a thosnú i bhfaighteoirí allograft. Is straitéis geallúnach é toIDC's de bhfaighteoirí bunúsacha a shaothrú iad a bheathú le cealla apoptotic bronnta. Taispeánadh gur sa samhail murine nuair a díritear ar DC's le ábhar apoptotic bronnta gur féidir srian a chur le allo-recognition indíreach, bac mhór é sin lámhaltas nodaíochta. I gcaibidil 3 scrúdaíomar an tionchar a bhí ag an tabhairt de cealla marbha ar gheiniunt agus léiriú de na baill éagsúla den aicme IL-12 le DC anabái nó toIDC. Léiríomar an tslí a dhéanann phagocytosis de cealla apoptotic nó necrotic trí DC's anabái nó toIDC's athrú ar an scoileadh agus ar an gcur in iúl de IL-12 cytokine, go háirithe den ais IL-12/IL-35. Fuaireamar amach gur laighdaíodh ar thairgeadh de IL-12p40 agus IL-12p70 le tabhairt suas ar na cealla apoptotic agus necrotic ag an am chéanna ag méadú ar chur in iúl de *IL12A* agus *IL27B*. Chomh maith le seo thugamar aghaidh ar heist thábhachtach; sé sin go bhfuil na DC's tolerogenic éifeachtach ag tabhairt ábhar apoptotic isteach sa cholann agus go gcoimeádann siad a bprofil cytokine rialaithe le ábhar necrotic fiú amháin. Sa chaibidil seo tháingamar ar an dtuairim go rialaítear an aicme IL-12 go dfréalach nuair a itheann DC's cealla apoptotic i gcoinne cealla necrotic, dá bhrí sin na baill ag imirt ról ag cinneadh an freagra imdhíonachta ar imeachtaí den sórt sin.

Ceann de na cosáin is cailiúla atá ag baint le imreitiú cealla apoptotic is ea an córas comhlánú. Nuair a mheastar an méadú agus an imreitiú sciopa de na cealla atá ag dul in éag leis an toIDC's i gcaibidil 3, thosuaíomar ag déanamh inscrúdu ar thairgeadh agus rialú na fachtóir comhlánú ag DC's agus toIDC's, le béim faoi leith ar an gcosán is lú a rinneadh staidéar air de na trí cosán comhlánú: an cosán malartach. I gcaibidil 4 rinneamar cur síos ar thairgeadh an dá phríomh rialaitheoir den cosán malartach den chomhlánú ag DC's agus ag toIDC's. Tá fachtóir H (fH) agus properdin (fP) mar chuailí urchomhaireacha maidir le rialú comhlánú ag fH an rialaitheoir tábhachtach diúltach agus fP an rialaitheoir dearfach amháin atá ar eolas taobh istigh den córas ar fad. Thaispeánamar go ndearna IL-27 agus baill eile den aicme interferon (IFN) rialú difréalach ar an dtaispeántas de fH agus properdin. Mar ábhar iontais, bhí ról dúbailte ag IFN γ , agus an cumas aige laghdú suntasach a dhéanamh ar cur amach FP agus san am ceánna, ag méadú fH. Mar sin is cosúil go gcuidíonn IFN γ le rialú comhlánú in ait gníomhachas. Thaispeánamar freisin conas mar a bhfuil tionchar ag athrú an iarmhéid idir properdin agus fH ar chumas allostimulatory de na DC's agus laghdú den fH ag

díriú ar mhéadú gníomhachas T cell agus laghdú de fP agus mar thoradh ar sin go bhfuil laghdú spreagadh ar na cealla T ag na DC's.

Tá an meid oibre i gcaibidil 5,6 tagtha ón saothar oibre atá déanta ag Matzinger agus a chomhghleacaithe a luaigh an barúil gur féidir leis an organ áitiúil nó fíochán áit ar féidir ceall imdhíon conaí tíonchar an-mhór a bheith aige i gcinneadh a chinníunt den ceall imdhíon sin. Le deich mbliana anuas is léir gur látháir gníomhachta díolúine an duán, agus go bhfuil an-chuid moilíní gníomhachtaithe imdhíonealaíochta ins na cealla duáin mar atá B7H1, CD40 agus MHC ranna II agus cuid eile. Nuair a chuirtear reámhthráchtas san áireamh nach bhfuil cur amach Ebi3 srianaithe le línte haematopoeitic rinneamar inscrúdú ar ar féidir Ebi3 agus baill eile den aicme IL-12 a aithniú taobh istigh den ghnáth duán daonna. I gcaibidil 5 rinneamar anailís ar thaispeántas an Ebi3 agus comhpháirtithe gaolmhara, IL-12p35 agus IL-27p28, taobh istigh den ghnáth duán daonna agus fuairamar an-chuid taispeántas de Ebi3 agus IL-12p35 taobh istigh den réigiún glomerular. Thug turgnamh in-vitro faoi deara go láidir gurb iad na podocytes foinse an taispeántas Ebi3 fhúirseach seo. Anailís a rinneadh ar ghrúpa othair a dhiúltaigh go gear a thaispeán i gcomparáid le bithopsí réamh nódaithe, go raibh athscríbhinní Ebi3 rialaithe síos le linn diúltú gear. Léiríonn na sonraí seo gur féidir le Ebi3 agus cytokines gnolaithe Ebi3 rol a bheith aige in diúltú allograft agus go bhfuil stáideár níos faide ag teastáil ar an méid seo.

Ar deireadh i gcaibidil 6, léiríomar nuair a geintear na DC's mair atá fibroblasts dúanacha sláintiúla i láthair gur dhírigh sé seo ar daonra DC a bhfuil tréithe rialachas acu. Thaispeáin na DC's seo cumas laghdaithe IL-12 a thairgeadh ach choinnigh siad leibhéal normálta de IL-23 agus IL-27 ach san am gcéanna nuair a bhí tairgeadh IL-10 ardaithe. Thaispeáin tuilleadh turgnamh go raibh IL-6 ciontach sa pháirt as an gcumas atá ag fibroblasts diánacha sláintiúla an daonra rialaithe DC seo a gheiniúnt. Is féidir ceist a chur faoi mar cad a tharlaíonn in orgáin atá faoi athlasadh ainsealach. Nuair a thugtar faoi deara an ionad lárnach a bhfuil ag na fibroblasts taobh istigh den duán is rud reásúnach é a rá go bhfuil na cealla seo iad féin faoi thionchar feidhmiúl nuair atá réimsí athlasadh ann nó gortú. Mar sin, is dócha go gcuireann sé seo srian lena gcumas chun daonra DC áitiúil agus ón dtaobh amuigh a rialú agus de bharr sin ag cur méadú le freagracht athlasadh. Níl mórán ar eolas faoin freagrúlacht agus taispeántas de fibroblasts dúanacha go DAMPs ach bheadh sí rí-thábhachtach taighde a dhéanamh chun tuiscint ceart a fháil ar fhreagrúlacht DC áitiúil.

Mar fhocail scoir, d'fhéadfadh duine a mhaíomh go mbaineann alán de na caveats atá fágtha inár dtuiscint ar an chóras imdhíonachta ar bhealach amháin ná eile le ceist na rialacháin imdhíonachta agus caoinfhulaingt imdhíonachta. Aibhsíonn an tráchtas seo gur féidir leis an aicme IL-12 agus DC's gafa le chéile chun rialú agus stiúradh iomlán a dhéanamh ar an bhfreagra imdhíonachta oiriúnaitheach.

Tá i bhfad níos mó fós le feiceáil i dtearmaí úsáid féideartha le haghaidh IL-35 teiripeach, ach mar gheall go bhfuil tréithe dearfa rialaithe imdhíonach aige, ba rud an-thábhachtach é an t-eolas atá againn faoi láthair ar chaoifhulaignt imdhíonachta in-vivo a mheadú. Níos mó ná sin, cuireann an tráchtas seo béim ar chúirann de imdhíonacht homeostasis i bhfad lasmuigh de na cealla imdhíonachta profisiúnta (neutrophils, DC's, cealla T agus B) agus gur ceart barúil a dhéanamh den imshaoil cealla agus fíocháin áitiúla chun fíor léargas a fháil ar freagrachtaí imdhíonachta áitiúla. Tá cumas ag an aicme IL-12 agus DC's ag obair ina aonair nó le chéile, treoir a thabhairt do fhorbairt teiripí sonracha, imdhíonachta bunaithe, i na dála ag tabhairt rialachán imdhíonachta leanúnach agus spriocdhírthe.

Nederlandse samenvatting

Dendritische cellen zijn de antigeen presenterende cellen van het immuunsysteem. Hun belangrijkste functie is om antigeen materiaal zoals pathogenen of tumor cellen, op te nemen, te processen en op hun oppervlak te presenteren aan T lymphocyten. Op deze manier zijn DCs de brug tussen de twee armen van het immuun systeem, het aangeboren (innate) en verworven (adaptieve) immuun systeem. DC behoren tot het aangeboren systeem, maar zijn in feite de dirigenten van de adaptieve response, zowel voor het induceren van immuniteit tegen pathogenen, maar ook om tolerantie in stand te houden tegen onschuldige antigenen, bijvoorbeeld die van het eigen lichaam. Als gevolg hiervan is er grote aandacht hoe DCs gebruikt kunnen worden als vorm van immuno therapie, bv om een response tegen tumoren te induceren of juist transplantaat acceptatie te verhogen.

Oplosbare factoren uitgescheiden door DCs zijn cruciale mediators om de balans tussen immuniteit en tolerantie te bepalen, en dan met name de familie van cytokinen. Deze cytokinen zijn kleine eiwitten die geproduceerd door een cel de functie van andere cellen beïnvloeden. Een individueel cytokine kan door meerdere cel typen gemaakt worden en daarnaast ook verschillende activiteiten uitoefenen, kortom ze vormen een complex netwerk. Gebaseerd op de structuur en/of functie kunnen verschillende families van cytokinen onderscheiden worden. Een familie die de laatste jaren veel aandacht heeft gekregen is de IL-12 familie. Het bestaat uit 4 leden; IL-12 en IL-23 zijn immunogeen en hun productie en regulatie in DCs is uitgebreid beschreven. De twee andere leden, IL-27 en IL-35 zijn meer regulerend, en van deze factoren is relatief minder bekend, zeker wat betreft de productie en regulatie in DC populaties. Studies in dit proefschrift concentreren zich met name op de regulatie van de IL-12 familie in menselijke DCs met een nadruk op IL-35.

Er is enige speculatie geweest over de capaciteit van DCs, en dan met name van tolerogene DCs (tolDCs), om IL-35 te kunnen produceren. In onze studies is gebruik gemaakt van tolerogene DCs die met behulp van het immunosuppressieve medicijn dexamethason gemaakt werden van perifere bloed monocyten. In hoofdstuk 2 presenteren we de data betreffende de capaciteit van humane tolDCs om IL-12p35 en Ebi3, de respectievelijk alpha en beta keten van IL-35. We tonen aan dat een blokkade van de IL-12p35 keten in deze cellen de regulerende werking van deze cellen vermindert. Een dergelijke rol in de reguleren de werking van tolDCs is niet eerder aangetoond.

Hoewel vroeger vooral aangenomen werd dat tolerantie staat voor de afwezigheid van een immuun response, is steeds duidelijker geworden dat het behoud van tolerantie een veel actiever en complex proces is. Dit wordt het best geïllustreerd met de kennis over het opruimen van apoptotische cellen (cellen die via een natuurlijk proces dood gaan). Het opruimen hiervan is niet per se een inert proces, maar gaat juist gepaard met het activeren van allerlei regulerende processen en lijkt daarmee van groot belang te zijn om tolerantie tegen eigen cellen/weefsel in stand te houden. In het veld van transplantatie zijn meerdere groepen op zoek naar methoden om experimenteel, maar uiteindelijk ook in patiënten, actief transplantatie tolerantie te induceren. Een veel belovende techniek lijkt hierbij te zijn om tolerogene DCs van de ontvanger te kwekken, bloot te stellen aan donor cellen (en deze te laten opnemen en presenteren) en dan weer terug te geven aan de ontvanger. In hoofdstuk 3 hebben we onderzocht hoe de opname van dood celmateriaal van invloed is op de expressie en productie van verschillende leden van de IL-12 familie door zowel DCs als tolDCs. We vonden dat opname van apoptotische cellen door DCs de productie van IL-12p70, het actieve IL-12 molecuul, sterk verminderde, terwijl tegelijkertijd de expressie van de alpha keten van IL-12 (IL-12p35) en IL-27 beta keten verhoogde. Kortom, normale DCs lijken door deze opname hun immunogene cytokines te remmen terwijl de expressie van de regulerende familie leden juist omhoog gaat. Voor tolDCs, waar de balans al in het voordeel van de regulerende cytokines ligt, had de opname van apoptotische cellen geen verder positief effect, maar belangrijk ook geen remmende werking. Ten slotte werd gevonden dat de manier van celdood ook nog van belang was. Wanneer de studies werden verricht met necrotische cellen, gaf dit juist aanleiding tot de activatie van IL-12 productie, en dus niet de remming zoals gezien met apoptotische cellen. Kortom de balans van immunogene en regulerende cytokine door DCs wordt zowel bepaald door het type DC als door het type celdood.

Een belangrijke proces waarvan al langer bekend is dat dit bij het opruimen van apoptotisch materiaal betrokken is, is het complement systeem. Hoewel de meeste complement eiwitten met name door de lever geproduceerd worden,

wordt steeds duidelijk dat er ook een lokale productie van complement kan plaats vinden, onder andere door antigeen presenterende cellen. Gezien het feit dat we in hoofdstuk 3 ook aantoonde dat tolDCs efficiënter waren in het opruimen van apoptotisch materiaal, hebben we de productie van complement factoren door DCs verder bestudeerd. Daarbij hebben we ons geconcentreerd op twee factoren die van groot belang zijn voor de alternatieve route van activatie. Factor H (fH) en properdine (fP) zijn twee eiwitten die een tegenovergesteld effect hebben op de alternatieve route; fH is een belangrijke remmer van dit systeem, terwijl fP de enige positieve regulator is die de stabiliteit van het C3 convertase complex verhoogt. In hoofdstuk 4 toonden we aan dat beide factoren verschillend gereguleerd werden door IL-27 en leden van de interferon familie, een ander groep cytokinen. Met name IFN-gamma speelde een dubbele rol, waarbij de productie van fP geremd werd, terwijl tegelijkertijd de productie van factor H juist omhoog ging. Dit suggereert dat IFN-gamma een netto negatief effect heeft op de lokale complement activatie. Recent is aangetoond dat tijdens de interactie tussen T cellen en antigeen presenterende cellen, deze lokale alternatieve route activatie positief bijdraagt aan de activatie van de T cellen. Door middel van specifieke remming van de productie van fH of fP door DCs, met behulp van siRNA interferentie, toonden we aan dat verminderde fH expressie resulteerde in een verhoogde T cel proliferatie, terwijl een verminderde fP productie juist aanleiding gaf tot een verminderde proliferatie. Deze data tonen aan dat ook fH en fP een rol spelen bij de alloïmuun respons.

Het werk in hoofdstuk 5 en hoofdstuk 6 bouwt voort op het idee van Matzinger dat de lokale conditie in een orgaan of weefsel van groot belang zijn voor de kwaliteit van een immuunrespons. Wat betreft de nier is intussen aangetoond dat verschillende moleculen met een actieve rol in het sturen van immunologische reacties, zoals B7H1, CD40 en MHC klasse II, op verschillende cellen in de nier voor komen. Gezien het feit dat de expressie van Ebi3, een onderdeel van IL-35, niet beperkt blijft tot hematopoïetische cellen, is de expressie van deze en andere IL-12 familieleden in de nier verder onderzocht. In hoofdstuk 5 toonden we aan dat zowel Ebi3 als de geassocieerde ketens IL-12p35 en IL-27p28 in de nier tot expressie kwamen, en dan met name in de glomerulus van de nier. Zowel dubbelkleuringen als in vitro experimenten met geweekte niercellen suggereerden dat podocyten de meest waarschijnlijk bron waren van deze Ebi3 productie. De expressie van Ebi3 werd ook onderzocht in een cohort van afstotingsbiopten, waarbij de expressie heterogeen was, maar de indruk bestond dat deze expressie verlaagd was ten tijde van afstoting. Deze bevinding zal verder onderzocht moeten worden om de functie van dit Ebi3 nader te onderzoeken.

In hoofdstuk 6 ten slotte hebben we onderzocht in hoeverre in vitro de ontwikkeling en functie van DCs beïnvloed wordt door de aanwezigheid van

nierfibroblasten. Deze DCs vertoonden een verminderde capaciteit om IL-12 te produceren, terwijl de hoeveelheid IL-23 en IL-27 niet beïnvloed werd en de hoeveelheid IL-10 zelfs hoger was. Verder onderzoek toonde dat IL-6 gedeeltelijk verantwoordelijk was voor het ontstaan van deze DCs met een meer regulerende functie. Deze veranderde functie werd bevestigd door het feit dat ook de T cel activatie door deze cellen sterk geremd was. Gezien de uitgebreide aanwezigheid van dit fibroblast netwerk in het interstitium van de nier, de locatie waar ook de DCs zich voornamelijk bevinden, levert vele vragen over hoe in situaties van chronische ontsteking en reactie op weefselschade en dit zal verder onderzocht moeten worden.

In conclusie kan gesteld worden dat de vraag hoe tolerantie gereguleerd wordt nog altijd een belangrijk thema binnen de immunologie is. Het huidige proefschrift heeft zich toegespitst op de IL-12 familie en DCs, twee belangrijke spelers in het aansturen van de adaptieve immuun respons. We toonden een potentiële rol voor IL-35, geproduceerd door dendritische cellen, in dit proces. Verder werd uit het werk in dit proefschrift duidelijk dat naast de cellen van het immuunsysteem, ook andere parenchymale of stromale cellen, direct of indirect, van belang zijn voor het lokale milieu en met elkaar de immuun homeostase bepalen. Het begrip in de functie van DCs en de IL-12 familie zullen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën die kunnen bijdragen aan langdurige en specifieke immuunregulatie en tolerantie, het ultieme doel in orgaan transplantatie.

Abbreviations

Ag	Antigen
AP	Alternative Pathway
APC	Antigen Presenting cell
C3aR	C3a Receptor
C5aR	C5a Receptor
CPM	Counts per minute
CTLR	C-type lectin Receptor
Ctrl	Control
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinamidyl ester
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DAF	Decay accelerating factor (CD55)
DC	Dendritic cell
DC+Fibro Sup	Monocyte derived DC generated in the presence of cell free renal fibroblast supernatant
Dex	Dexamethasone
Ebi3	Epstein Barr Induced Gene-3
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
fH	Complement Factor H
FHL-1	fH like protein-1
FHR	fH related protein
Fibro-DC	Monocyte derived DC generated in the presence of renal fibroblasts
FITC	Fluorescein isothiocyanate
fP	Complement factor P (Properdin)
GAS	Gamma interferon activation site
HMGB1	High mobility group box 1
HRP	Horseradish peroxidase
ISRE	IFN-stimulated response elements
LPS	Lipopolysaccharide
mAb	monoclonal antibody
NLR	NOD-like receptor
OD	Optical Density
PDGFR β	Platelet-derived growth factor receptor beta
PI	Propidium Iodide
PRR	pattern recognition receptors
RLR	RIG-I like receptors
siRNA	silencing RNA
TLR	Toll-like receptor
tolDC	tolerogenic Dendritic cell

Acknowledgements

I would like to thank all the academic and technical staff in the Nephrology Department, with a particular mention to those within the Immunology group, both past and present. I especially want to thank Sandra, Sylvia and Ngaisah. Aside from your excellent technical abilities and experience, you are all thoughtful individuals who have helped me greatly with your encouragement, suggestions and comments, and I am grateful to you all.

I would like to give a special thank you to my fellow colleagues on the D3 floor especially Maaïke, Françoise, Jason, Jeetindra, Rianne, Eytan, Juha, Joseph and Pieter for their helpful discussions and chats in times good and bad. I would particularly like to thank previous students who worked with me during their internships, Denise and Laura, who both dedicated a lot of their time and showed great initiative. In addition, I wish to acknowledge my “weekend colleagues”- Heein, Dae-Hyun, Jeetindra and Joseph. Your dedication and humour always brightened up the lab on an often dull Saturday afternoon!

I would like to thank all the students of the TranSVIR consortium; Mariana, Daniele, Mustafa, Pauliña, Tjerk, Mads, Virginie, Dario, Aurelien, Juha and Joseph. I thoroughly enjoyed getting to know all of you and will fondly remember our adventures in Vienna, Cambridge, Leiden and Dublin. I would also like to thank Prof.dr Andy Rees who coordinated this consortium and gave us all a fantastic platform to engage with one another and renowned immunologists.

I would especially like to thank my friends and family particularly Jenny, Ber, Aidan, Iain and Kym. You have all been a constant support throughout my study years and I am eternally grateful. Finally I owe my deepest gratitude to Joseph. You have always been ready to yield constructive comments and warm encouragement. You have been extraordinarily tolerant and supportive throughout, and for that I would like to express my deepest appreciation and thanks.

Curriculum Vitae

The author of this thesis, Karen Dixon was born on the 30th of June 1986 in Dublin, Ireland. She completed her primary and secondary school education in Scoil Dun Doire and Scoil Mhuire Trim respectively, and completed her Leaving Certificate in 2003. In 2004, she began studying Medical Laboratory Science in the Galway-Mayo Institute of Technology which encompassed a final year internship in the clinical laboratories of the Midlands Regional Hospitals. In September 2007, the author undertook studies in Biomedical Science in the Dublin Institute of Technology focusing on Haematology/Blood Transfusion and Clinical Immunology, achieving a first class honours degree in 2009. Following completion of the Biomedical Science studies, the author started her PhD programme in November 2009 at the Nephrology department of the Leiden University Medical Center (LUMC). This research was performed under the supervision of Prof. Dr. C. van Kooten and was financially supported by the European Union Marie Curie programme (TranSVIR FP7-PEOPLE-ITN-2008 No. 238756).

Bibliography

1. Dixon KO, O'Flynn J, van der Kooij, Kooten van C. Phagocytosis of apoptotic or necrotic cells differentially regulates the transcriptional expression of IL-12 family members in dendritic cells (J. Leukoc. Biol. 2014, in press)
2. Dixon KO, Rossmann L, Kamerling S, Kooten van C. Human renal fibroblasts generate regulatory Dendritic cells with reduced IL-12 production and enhanced IL-10, B7H1 and B7DC expression.(Immunol Cell Biol. 2014, in press)
3. Dixon KO, van der Kooij, Vignali DA, Kooten van C. Human tolerogenic Dendritic cells produce IL-35 in the absence of other IL-12 family members (Under revision)
4. Dixon KO*, O'Flynn*, Klar N, Daha MR, Kooten van C. Properdin and factor H production by human dendritic cells is differentially regulated by IFN γ and has a functional role in the T cell stimulatory capacity of dendritic cells. (Under revision)
5. Dixon KO, van der Kooij, Kooten van C. Non-haematopoietic derived Epstein Barr Virus induced gene 3 expression in normal human kidney. (In preparation)
6. J O'Flynn, K.O Dixon, M.R Daha, C van Kooten. Myeloperoxidase directed alternative pathway activation. J Innate Immun 2013.
7. J. O'Flynn, P. van der Pol, K.O. Dixon, Z. Prohaszka, M. R. Daha, C. van Kooten. CRP as a novel inhibitor of properdin and complement activation. (In preparation.)

