



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Expression of human leukocyte antigens in diffuse large B cell lymphomas

Riemersma, Sietske Annette

Citation

Riemersma, S. A. (2006, March 28). *Expression of human leukocyte antigens in diffuse large B cell lymphomas*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4348>

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/1887/4348>

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

Samenvatting

Eén van de taken van het immuunsysteem is het organisme (mens en dier) te beschermen tegen de ongewenste effecten van het binnendringen van pathogenen, waaronder bacteriën, virussen en parasieten. Daarnaast probeert het immuunsysteem lichaamseigen cellen die allerlei genetische veranderingen hebben ondergaan op te ruimen aangezien deze veranderingen o.a. in het genetische materiaal (DNA) een normale cel kunnen transformeren tot een kwaadaardige cel die uiteindelijk kan uitgroeien tot een kwaadaardig gezwel (tumor). Door o.a. de veranderingen op DNA niveau treden er ook veranderingen op in eiwitten in en met name op de buitenkant van de cel. Antigenen, kleine stukjes afkomstig van deze afwijkende eiwitten worden op het buitenoppervlak van vrijwel alle cellen in het lichaam gepresenteerd door moleculen die humane leucocyte antigenen (HLA) worden genoemd. Het complex van een antigeen gebonden aan een HLA molecuul kan worden herkend door circulerende T cellen, waarbij CD4⁺ T cellen HLA klasse II moleculen herkennen en CD8⁺ T cellen HLA klasse I moleculen. Na herkenning van het complex door CD4⁺ T cellen vindt een cascade van gebeurtenissen plaats waarna de afwijkende cellen uiteindelijk kunnen worden opgeruimd door het immuunsysteem. De expressie van HLA moleculen op het oppervlak van tumorcellen is derhalve cruciaal voor de vernietiging daarvan. Naast T cellen hebben B cellen ook een belangrijke rol in de afweer. B cellen worden geproduceerd in het beenmerg. Net als de T cel brengt ook iedere B cel op zijn celoppervlak een receptor tot expressie die specifieke antigenen herkent. Nadat er een interactie plaats heeft gevonden tussen B cellen en T cellen die specifieke antigenen herkend hebben, produceren B cellen (als plasmacellen) specifieke antistoffen. Indien B cellen zelf gaan woekeren kan een lymfoom ontstaan. Het diffuus grootcellig B cel lymfoom (DLBCL) is het meest frequent voorkomende non-Hodgkin lymfoom. Volgens de laatste WHO classificatie van 2001 betreft het DLBCL één ziekte entiteit. Echter het DLBCL kent een grote variatie met betrekking tot presentatie, beloop en prognose. Ruim 60% van de DLBCL presenteren zich in lymfeklieren, de overige in andere weefsels waaronder een kleine groep (ca. 2%) in de testis (teelbal) of het centrale zenuwstelsel (hersenen). De testis en hersenen, de ogen en door een aantal onderzoekers ook de eierstokken werden sinds decennia beschouwd als weefsels waar een verlaagde of vrijwel geen immuun respons plaatsvindt, de zogenaamde “immune privileged sites”. Deze organen die (al of niet evolutionair gezien) van levensbelang zijn voor het voortbestaan van het organisme moeten tegen ontstekingsreacties die het functioneren van het organisme op het spel zouden zetten, worden beschermd. Diverse mechanismen zouden aan deze remming van ontstekingsreacties ten grondslag liggen, waaronder fysieke barrières en expressie van ontstekingsremmende factoren zoals Fas-ligand, een eiwit dat indringende T cellen kan uitschakelen. Een dergelijke verminderde cellulaire afweer zou er

voor kunnen zorgen dat ook tumoren die op deze plaats groeien minder last van de afweer ondervinden en daarmee dus zeer waarschijnlijk een overlevingsvoordeel zouden kunnen hebben in vergelijking tot tumoren die zich op andere plaatsen ontwikkelen. Hoe het mechanisme ook is, in ieder geval is het 'immune privilege' niet louter te verklaren door een fysieke afwezigheid van afweercellen op deze plaatsen. Tijdens het ontstaan van kwaadaardige tumoren ontwikkelen de tumorcellen allerlei mechanismen om vernietiging door het immuunsysteem te voorkomen. Verlies van HLA expressie is een veelvuldig voorkomend fenomeen in veel verschillende soorten tumoren zoals bijvoorbeeld baarmoederhalskanker, melanoom, borstkanker en kwaadaardige tumoren van de dikke darm en het hoofd-hals gebied. Ook in een relatief klein deel van de lymfomen is verlies van HLA expressie eerder beschreven. De meeste onderzoeken waren gericht op het verlies van HLA klasse I aangezien deze moleculen op vrijwel alle cellen in het lichaam tot expressie worden gebracht en lange tijd de enige target voor celdodende T cellen leken te zijn. HLA klasse II moleculen daarentegen komen onder normale omstandigheden vrijwel alleen tot expressie op antigeen presenterende cellen zoals B cellen, dendritische cellen en macrofagen. Deze moleculen spelen vooral een belangrijke rol bij het initiëren van de afweerreactie. Normale B cellen brengen dus zowel HLA klasse I als II tot expressie. De genen die coderen voor HLA klasse I moleculen zijn HLA-A, -B en -C en voor HLA klasse II moleculen HLA-DR, -DQ en -DP. Al deze genen bevinden zich dicht bij elkaar in een relatief klein gebied op de korte arm van chromosoom 6, het zogenaamde HLA-gebied. In iedere cel bevinden zich twee chromosomen 6 en de genen van beide chromosomen komen tot expressie (de allelen). Alle HLA genen zijn erg polymorf hetgeen betekent dat er op DNA niveau in ieder gen kleine verschillen aanwezig zijn tussen de verschillende individuen. Voor klasse I zijn er inmiddels ruim 900 en voor klasse II ruim 600 verschillende allelen beschreven. De verschillende allelen kunnen een verschillend repertoire aan antigenen binden, hetgeen op evolutionair niveau van groot belang is voor de overleving van de soort. In dit proefschrift wordt het verlies van zowel HLA klasse I als HLA klasse II in DLBCL ontstaan in de testis, hersenen, lymfeklieren, huid en maag bestudeerd. Met behulp van verschillende moleculair biologische technieken werd getracht de onderliggende mechanismen te ontrafelen. Daarnaast werden de aanwezige T cellen in de lymfomen bestudeerd en werd een groep testislymfomen en een groep nodale lymfomen getypeerd voor HLA-DR en HLA-DQ.

In **Hoofdstuk 2** werd op een serie van extra-nodale (testis en hersenen) en nodale DLBCL met behulp van immunohistochemie de expressie van HLA bestudeerd. Er werden opmerkelijke verschillen tussen de groepen gevonden met verlies van klasse I expressie in respectievelijk 61% van de testis-, 55% van de hersen- en 10% van de nodale lymfomen. De

lymfomen afkomstig uit de “immune privileged sites” toonden tevens in 46-61% van de gevallen verlies van HLA klasse II expressie in tegenstelling tot 5% van de nodale lymfomen met expressieverlies. In **Hoofdstuk 2 en 3** wordt beschreven welke genetisch veranderingen ten grondslag lagen aan het verlies van de HLA moleculen waarbij verschillende molculair-biologische technieken werden gebruikt.

In een normale cel zijn altijd twee kopieën van elk gen aanwezig. Met behulp van de “verlies van heterozygositeit” (LOH) techniek kon worden aangetoond dat in de testis en hersen lymfomen op chromosoom 6 in het HLA gebied grote genetische veranderingen hadden plaatsgevonden waaronder het genetisch verlies van één van beide allelen van zowel HLA klasse I als HLA klasse II genen (deletie). LOH kan echter ook veroorzaakt worden door een deletie van één allel gevolgd door duplicatie van het andere allel (recombinatie). Om te bepalen welk van de twee mechanismen LOH veroorzaakt hadden werd gebruikt gemaakt van Fluorescente in situ Hybridisatie (FISH). Door specifieke stukjes DNA te “labelen” met een fluorescent label kan men in elke celkern bepalen of er deleties hebben plaatsgevonden. In de meeste testis en hersenlymfomen werden deleties gevonden waarbij een groot deel of het gehele HLA gebied van één van beide chromosomen 6 verdwenen was. In deze cellen kan dus slechts één allel van ieder HLA gen tot expressie komen hetgeen leidt tot een verminderde hoeveelheid HLA moleculen op het celoppervlak. Het gebied waar de genen voor HLA-DR en HLA-DQ gelegen zijn was in veel gevallen zelfs homozygoot gedeleteerd, hetgeen betekent dat op beide chromosomen de genen verloren waren gegaan. Om deze deleties nauwkeurig in kaart te brengen werd gebruik gemaakt van DNA fiber FISH. Hierbij wordt het DNA vrijgemaakt uit de celkernen en uitgespreid op een microscoopglasje. Vervolgens worden stukjes DNA, gelabeld met rode of groene fluorescentie, hierop geplakt (hybridisatie) waarna een gekleurde draad ontstaat die bekenen kan worden onder de fluorescentie-microscoop. Zodoende kon precies de grootte van de homozygote deleties worden bepaald en welke genen daarbij betrokken waren.

Verlies van HLA expressie op tumor cellen interfereert met de herkenning en de daaropvolgende eliminatie van de tumor cellen door het immuunsysteem. Om het eerder vastgesteld verlies van HLA expressie in DLBCL van de testis en de hersenen te bevestigen werden veel extra gevallen verzameld en werd het repertoire aan antilichamen uitgebreid. Tevens werd bekeken of HLA expressie verlies specifiek is voor testis en hersen lymfomen door ook andere extra-nodale DLBCL te bekijken. In **Hoofdstuk 4** wordt beschreven dat ruim 60% van de testis lymfomen en ruim 30% van de hersen lymfomen verlies van HLA-A laten zien terwijl in nodale, huid en maag lymfomen dit slechts in max. 19% van de gevallen gezien werd. Voor klasse II waren de verschillen nog opvallender, 76% van de

testis en 50% van de hersen lymfomen toonde verlies van HLA-DR in vergelijking tot 0-10% van de andere groepen. Compleet verlies van HLA klasse II expressie werd gezien in 53% van de testislymfomen. Om te onderzoeken of verlies van HLA expressie gecorreleerd is aan de hoeveelheid tumor infiltrerende T cellen werd in een groep testis- en hersen lymfomen het aantal T cellen bepaald. Tevens werd gekeken of dit geactiveerde cytotoxische cellen betroffen. De uitkomsten werden vergeleken met een grote groep nodale en een kleine groep van huid- en maag DLBCL. In de huidlymfomen waren gemiddeld de meeste T cellen aanwezig, echter slechts een klein percentage hiervan was geactiveerd. Opmerkelijk genoeg toonden de testislymfomen de grootste hoeveelheid geactiveerde cytotoxische T cellen gevolgd door de hersenlymfomen. Deze geactiveerde cytotoxische T cellen toonden overwegend co-expressie van CD3 en CD8. Echter in enkele hersenlymfomen was een aanzienlijk deel van deze T cellen positief voor CD4 en niet voor CD8. Eén van de mechanismen voor tumorcellen, buiten verlies van HLA klasse I expressie, om weerstand te bieden tegen cytotoxische T cellen is de expressie van PI-9. Expressie van PI-9 wordt gezien in 25-40% van de nodale DLBCL, maar geen van de testis en hersen lymfomen uit onze serie bracht dit tot expressie.

Het feit dat in de hersen en testislymfomen zoveel geactiveerde cytotoxische T cellen aanwezig zijn, doet vermoeden dat deze lymfomen erg immunogeen zijn. Een van de verklaringen hiervoor is dat in deze lymfomen veel somatische hypermutaties gevonden worden hetgeen waarschijnlijk leidt tot de expressie van veel nieuwe tumorantigenen.

In **Hoofdstuk 5** werd onderzocht of het grote verschil in verlies van HLA klasse II expressie in de testis en de nodale DLBCL verklaard kon worden door het verschil in frequentie van bepaalde HLA-DR en HLA-DQ allelen in de beide patiëntengroepen. De frequenties werden vergeleken met een groep van 2400 gezonde nederlandse bloeddonoren. Er werden meerdere frequentie verschillen gezien. HLA-DR2 kwam statistisch significant vaker voor in beide patiëntengroepen in vergelijking tot de controle groep. In de testislymfomen was HLA-DR11 significant vaker en in de nodale lymfomen HLA-DR7 significant minder vaak aanwezig. Aangezien de verschillende allelen elk verschillende antigenen presenteren werd vervolgens in de groep patiënten met een DLBCL van de testis onderzocht of in de tumor een deletie voorkwam van het HLA-DR/DQ gebied. In 40% van de tumoren werd een homozygote deletie ontdekt en in 30% van de gevallen een hemizygote deletie. Geen van de verschillende HLA-DR en -DQ allelen waren altijd bij een deletie betrokken en ook geen van de allelen was nooit bij een deletie betrokken hoewel er wel verschillen werden gezien. Slechts in 1 tumor van in totaal 8 HLA-DRB1*03 dragers werd een homozygote deletie gezien. Dit in tegenstelling tot de 8 HLA-DRB1*11 dragers waarvan 5 tumoren een homozygote deletie toonden.

In de **Discussie** tenslotte wordt de rol van HLA-DR in het ontstaan van DLBCL van met name de testis en hersenen besproken. Als naïve B cellen op een gegeven moment antigenen herkennen met hun celmembraan gebonden B cel receptor, migreren ze naar het follikelcentrum waar zij allerlei genetische veranderingen ondergaan. Deze veranderingen dienen om een zo specifiek mogelijke B cel receptor te creëren. Tijdens dit proces kunnen soms echter ook oncogenen geactiveerd worden en kunnen translocaties optreden. Als deze genetisch veranderde B cellen gaan delen, kan uiteindelijk een lymfoom ontstaan. Het immuunsysteem zal echter proberen deze aberrante B cellen op te ruimen doordat macrofagen en dendritische cellen stukjes antigen afkomstig van deze B cellen presenteren aan circulerende T cellen. B cellen kunnen dit echter ook zelf via HLA klasse II moleculen. Vroeg in de de activatie fase leidt signaaltransductie via HLA-DR tot groei en RNA synthese van B cellen. In een later stadium kan signaaltransductie via HLA-DR echter ook leiden tot apoptose, geprogrammeerde celdood. Op het moment dat een B cell lymfoom voor verdere groei onafhankelijk is geworden van groeifactoren afkomstig van T cellen, is verlies van HLA-DR expressie dus waarschijnlijk heel belangrijk voor de overleving van de tumorcellen. HLA-DR zou dus beschouwd kunnen worden als een tumor suppressor gen. Uit klinische studies is bovendien gebleken dat verlies van HLA-DR expressie in DLBCL samenhangt met een slechtere prognose. Momenteel worden er vele nieuwe immuuntherapiën ontwikkeld waarbij o.a. radio-actief gelabelde anti-HLA-DR antilichamen gebruikt worden. Deze antilichamen zullen echter geen effect hebben op de meerderheid van DLBCL van de testis en hersenen. Voor deze specifieke groep lymfomen zouden derhalve immuuntherapiën gericht op andere receptoren en oppervlakte eiwitten ontwikkeld moeten worden.