



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Identification of minor histocompatibility antigens by reverse immunology

Hombrink, P.

Citation

Hombrink, P. (2014, September 23). *Identification of minor histocompatibility antigens by reverse immunology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/28890>

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/1887/28890>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

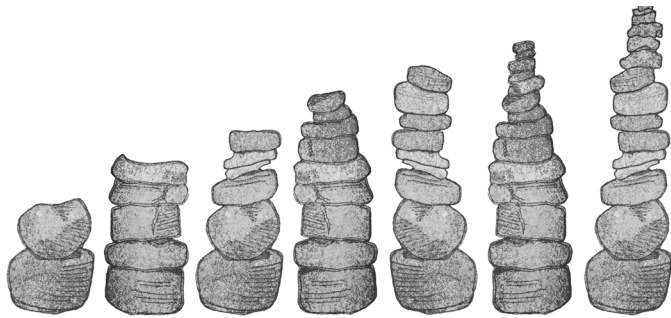


The handle <http://hdl.handle.net/1887/28890> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hombrink, Pleun

Title: Identification of minor histocompatibility antigens by reverse immunology

Issue Date: 2014-09-23





NEDERLANDSE SAMENVATTING
DANKWOORD
LIST OF PUBLICATIONS
CURRICULUM VITAE

&

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Hematopoïese en het ontstaan van leukemie

In het bloed bevinden zich verschillende celpopulaties. Veel van deze populaties hebben een relatief korte levensduur en worden constant vernieuwd door nieuwe cellen die differentiëren uit *hematopoïetische stamcellen* (HSC) in de medula van het beenmerg. Deze constante vorming van nieuwe bloedcellen wordt *hematopoïese* genoemd. HSC's hebben de unieke eigenschap om zichzelf te kunnen vernieuwen. Dit houdt in dat er na iedere celdeling altijd een nieuwe HSC ontstaat naast een voorlopercel die verder kan differentiëren naar een specifiek type bloedcel. Het differentiëren van een 'onrijpe' voorlopercel naar een 'rijpe' functionele bloedcellen gebeurt op specifieke locaties zoals het beenmerg, de thymus, lymfklieren en de milt en staat onder stricte regulatie van groeifactoren. Bloedcellen kunnen in verscheidene groepen worden ingedeeld, waaronder een *myeloïde* groep waarin zich onder andere *erythrocyten* (rode bloedcellen), *granulocyten* en *trombocyten* (bloedplaatjes) bevinden die nodig zijn voor zuurstoftransport, afweer en bloedstolling. Daarnaast de *lymfoïde* groep waarin zich *B-lymfocyten* (B-cellen) en *T-lymfocyten* (T-cellen) bevinden die een belangrijke specifieke rol in ons immuunsysteem spelen. Dagelijks worden er biljoenen nieuwe bloedcellen aangemaakt. Meestal gaat dit goed maar gedurende hematopoïese kunnen er incidenteel op verschillende momenten *DNA mutaties* ontstaan. Deze vorm van DNA schade is een biologisch proces dat kan worden veroorzaakt door normale metabolische processen van delende cellen. Daarnaast kunnen omgevingsfactoren zoals UV- en radioactieve straling en blootstelling aan toxische stoffen hier ook aan bijdragen. Meestal leidt een mutatie tot een abrupte delingsstop van de betrokken cel waarna deze in *apoptose* gaat, een gereguleerde manier van celdood. Wanneer een mutatie leidt tot een ongecontroleerde groei van *abnormale, maligne* cellen in het beenmerg en bloed wordt dit *leukemie* genoemd. Er zijn verschillende verschijningsvormen van leukemie. Bij een opeenhoping van onrijpe snel delende maligne cellen noemt men dit acute leukemie en wanneer het rijpere, meer gedifferentieerde maligne cellen betreft ontwikkelt zich een chronisch leukemie.

Allogene stamceltransplantatie als behandeling van leukemie

Afhankelijk van het type leukemie, de leeftijd van de patiënt en de prognose wordt er een initiële behandeling gekozen die gericht is op het vernietigen van de maligne cellen. Vaak omvat deze behandeling intensieve chemo- en radiotherapie waarbij met behulp van medicijnen of straling zoveel mogelijk maligne cellen worden vernietigd. Omdat een '*remissie*' van de ziekte zelden compleet is, blijven er vaak lage frequenties van maligne cellen achter in het beenmerg of bloed, en is de kans op een *recidief* (terugkomen van

de leukemie) groot. Er is dan ook vaak nog additionele behandeling nodig. Dit kan het uitvoeren van een *allogene stamceltransplantatie* (alloSCT) zijn. Bij een *allogene stamceltransplantatie* (alloSCT) worden stamcellen uit het beenmerg van een gezonde donor naar de patiënt getransplanteerd. De donor kan een verwante donor (directe familie) maar ook een niet-verwante donor zijn met een overeenkomende *HLA-typing*, de genen die coderen voor het *major histocompatibility complex* (MHC). Aan de alloSCT gaat een intensieve pre-conditioning vooraf waarin met behulp van chemo- en radiotherapie naast achtergebleven maligne cellen ook de gezonde HSC in het beenmerg van de patiënt worden vernietigd. Vervolgens worden gezonde HSC van de donor in de patiënt getransplanteerd. De toegediende stamcellen zullen de patiënt herkoloniseren en het hematopoïetische systeem herstellen. Naast het vervangen van potentiële maligne stamcellen heeft een alloSCT ook een aanvullend extra voordeel ten opzichte van een *autologe stamceltransplantatie* waarin de HSC afkomstig zijn van de patiënt zelf T-cellen in het transplantaat kunnen een sterke immuunreactie vormen tegen de achtergebleven hematopoïetische cellen, en wellicht chemotherapie resistente maligne cellen van de patiënt opruimen. Deze zogenoemde *Graft versus Tumor* (GvT ofwel transplantaat versus tumor) reactie ontstaat doordat de toegediende T-cellen de tumorcellen als lichaamsvreemd herkennen. Daarnaast kunnen donor T-cellen in het transplantaat ook een immuunreactie vormen tegen de gezonde weefsels van de patiënt. Deze potentieel levensbedreigende *Graft versus Host Disease* (GvHD) manifesteert zich vooral in de darmen, lever, huid, en longen. Om ernstige GvHD te voorkomen wordt gezocht naar een stamcel donor met een zo identiek mogelijke HLA-typing. Om het risico op GvHD te verminderen kan na alloSCT ervoor gekozen worden om donor T-cellen uit het transplantaat te verwijderen (*T-cel depletie*). Een nadeel van deze T-cel depletie is een vergrote kans op een recidief. Naast een vermindering van het GvT effect leidt verwijdering van T-cellen ook tot een verhoogde kans op opportunistische virale complicaties. Als er geen virus-specifieke T-cellen in het transplantaat van de donor aanwezig zijn, kunnen latent in de immuungecompromitteerde patiënt levende virussen zoals Epstein-Barr virus (EBV) en Cytomegalovirus (CMV) reactiveren en ernstige, potentiële levensbedreigende infecties veroorzaken. Het manipuleren van de immuunrespons na alloSCT om gewenste en ongewenste effecten van elkaar te scheiden vormt de basis van veel immuuntherapieën.

Donor lymfocyten infusie na allogene stamceltransplantatie

Indien er na een alloSCT nog steeds of opnieuw hematopoïetische cellen van patiënt herkomst worden aangetroffen spreekt men van een onvolledig *donor chimerisme*. Deze achtergebleven cellen kunnen leiden tot een recidief van de leukemie en dienen ideaal gezien te worden vernietigd. Om dit te bereiken of te voorkomen (profylactisch) dat een recidief optreedt, kan de patiënt na alloSCT worden behandeld met T-cellen van de oorspronkelijke donor. Deze therapie noemt men een *donor lymfocyten infusie* (DLI). Als

het gewenste effect van een DLI uitblijft, kan meermalig DLI worden toegediend. Als vroeg na alloSCT een recidief optreedt of de kans daarop groot is, is de keuze om DLI te geven vaak lastig. Aangezien in de patiënt, als gevolg van pre-conditioning geïnduceerde weefselschade en infecties, een proinflammatoire cytokine milieu kan zijn gecreëerd is er een verhoogde kans op GvHD. Voor het bereiken van het gewenste therapeutische effect na een DLI is het dus belangrijk om de goede balans tussen de kansen op het optreden van GvT en GvHD te vinden. Veel onderzoek is er op gericht om T-cellen te kunnen selecteren, die uitsluitend antigenen herkennen die specifiek door maligne of patiënt hematopoïetische cellen worden aangeboden. Net zoals het selecteren en toedienen van virus specifieke T-cellen kan helpen bij het voorkomen en terugdringen van opportunistische virale infecties, kan het toedienen van geselecteerde T-cellen die slechts aan GvT bijdragen, leiden tot een langdurige immuunreactie tegen deze kwaadaardige cellen in de afwezigheid van ernstige GvHD.

De basis van T-cel reactiviteit

T-cellen kunnen lichaamsvreemde cellen herkennen met behulp van een *T-cel receptor* (TCR). Het TCR repertoire in onze T-cel populatie is enorm divers en elke TCR is in principe specifiek voor een bepaald antigeen. Een TCR is een heterodimeer die bestaat uit een *TCR α* en *TCR β* keten. In deze ketens vinden willekeurige mutaties en recombinaties plaats in de *complementarity determining regions* (CDR3) die bepalen welke specifieke structuur (epitoom) de betreffende T-cel kan herkennen nadat deze is aangeboden door HLA-moleculen. Deze TCR gen recombinaties vormen de basis voor de diversiteit in ons *TCR repertoire* en vormen evolutionair gezien een belangrijke overlevingsstrategie. Voordat een gematureerde T-cel met zijn unieke TCR de thymus kan verlaten en in de bloedbaan kan worden opgenomen, wordt deze gecontroleerd op zijn vermogen om interacties met eigen HLA-moleculen aan te kunnen gaan. Herkenning van lichaamsvreemde epitopen, zoals die afkomstig van virussen en bacteriën, maar ook die van patiëntenweefsel met een vreemd HLA-type, kan de T-cel doen activeren. Vervolgens zal de T-cel de potentieel geïnfekteerde cel doorboren met perforines om toegang te verschaffen voor de door de T-cel uitgescheiden *cytotoxische moleculen* zoals granzymes en granulysin. Deze zullen vervolgens de geïnfekteerde cel aanzetten tot *apoptose*.

T-cellen zijn op basis van de expressie van het type *coreceptor* molecuul te onderscheiden in twee categorieën. Deze coreceptor kan tijdens het herkennen van een vreemd HLA-peptide complex door de TCR ook aan het HLA van de geïnfekteerde cel binden. Door deze interactie verankert de T-cel zich aan de geïnfekteerde cel en kan er een cascade van intracellulaire signalering ontstaan die noodzakelijk is om de T-cel te activeren. Onderscheid wordt gemaakt tussen T-cellen die een *CD4* of *CD8* co-receptor op hun oppervlak presenteren. In deze studie wordt gefocust op de CD8 positieve T-cellen die beperkt zijn tot het herkennen van epitopen in *HLA klasse I*. HLA klasse I moleculen

komen in tegenstelling tot klasse II constant tot expressie op alle kernhoudende cellen. CD8 positieve T-cellen die in de context van HLA klasse I antigenen kunnen herkennen zijn overwegend effector T-cellen met een cytotoxische activiteit die vreemde cellen kunnen lysisen.

Minor-antigenen

Voor het slagen van een stamceltransplantatie is het relevant om de juiste donor te selecteren. Wanneer er een verschil in HLA-typing bestaat tussen patiënt en donor, een zogenoemde 'major mismatch', zal een groot gedeelte van de geïntroduceerde donor T-cel immuniteit zich richten tegen epitopen die worden gepresenteerd door het vreemde HLA-molecuul. Het T-cel compartiment van een individu bestaat uit T-cellen die alleen lichaamsvreemde en niet lichaameigen epitopen in eigen HLA moleculen mogen herkennen. T-cellen zijn tijdens hun selectie in de thymus in de donor niet zijn geselecteerd om te voorkomen dat zij lichaamseigen epitopen in de context van vreemd patiënt HLA herkennen. Hierdoor kunnen de geïntroduceerde T-cellen de door dit vreemde HLA aangeboden lichaamseigen epitopen herkennen als lichaamsvreemd en zodoende gezonde cellen aanvallen. Als gevolg hiervan kan er een zeer ernstige GvHD optreden. Echter, in de context van een HLA-identieke stamceltransplantatie kan er nog steeds T-cel immuniteit optreden tegen cellen van de patiënt. Deze allo-reactiviteit wordt veroorzaakt door lichaamsvreemde peptiden afkomstig van de patiënt die in hetzelfde type HLA worden aangeboden, en door donor T-cellen kunnen worden herkend.. In dit geval kan de T-cel immuniteit worden verklaard door de herkenning van zogenoemde *minor-antigenen*. Deze potentieel immunogene epitopen zijn het product van polymorfe genen, het gevolg van kleine variaties in het DNA tussen twee individuen. Er zijn talrijke verschillen in het DNA tussen individuen. Verschillen in nucleotide kunnen aminozuurveranderingen opleveren met als gevolg dat andere peptides door het HLA gepresenteerd kunnen worden. Wanneer een polymorf peptide door T-cellen van een ander individu herkend kan worden spreekt men van een minor-antigeen. De zogenoemde *single nucleotide polymorphisms* (SNP) die coderen voor minor-antigenen komen met een bepaalde frequentie in een populatie voor. Afhankelijk van deze frequentie, zal een specifieke T-cel populatie gericht tegen dit minor-antigeen in veel of weinig patiënten te vinden zijn na een alloSCT en DLI.

Wanneer een minor-antigeen breed tot expressie komt op gezonde weefsels (zowel hematopoïetische als niet-hematopoïetische cellen) van de patiënt kan de T-cel reactiviteit van de donor bijdragen aan GvHD omdat de T-cellen deze gezonde cellen als vreemd zullen herkennen en lysisen. Als het minor-antigeen alleen gepresenteerd wordt op alle hematopoïetische cellen of preferentieel op de maligne cellen van de patiënt kan deze echter bijdragen aan GvT. Het elimineren van de hematopoïetische cellen van de patiënt waar de leukemiecellen een onderdeel van zijn, leidt namelijk niet tot problemen aangezien de normale hematopoïese na de transplantatie van donor herkomst is, en dus niet door

donor T-cellen zal worden aangevallen. Therapeutisch relevante minor-antigenen worden daarom preferentiël door hematopoïetische of maligne cellen tot expressie gebracht. Om de weefseldistributie van minor-antigenen te karakteriseren is een uitgebreide genexpressie analyse noodzakelijk. Een infusie van T-cellen die reactief zijn tegen minor-antigenen die uitsluitend worden gepresenteerd door het hematopoïetische systeem van de patiënt, en zodoende reactief zijn tegen de hematopoïetische cellen, inclusief de maligniteit, is een ideale manier om langdurige genezing van leukemie te induceren. Deze *minor-antigeen-specifieke immunotherapie* kan, zoals onderzoek heeft aangetoond, effectief zijn. Er zijn echter nog maar een beperkt aantal minor-antigenen geïdentificeerd die uitsluitend door het hematopoïetische systeem worden gepresenteerd. Om minor-antigeen-specifieke immunotherapie tot een realistische optie te maken voor veel patiënten met leukemie dienen er meer geschikte minor-antigenen te worden geïdentificeerd.

Dit proefschrift

In dit proefschrift zijn methoden onderzocht om op een innovatieve wijze minor-antigeen-specifieke CD8 positieve T-cellen te identificeren. De conventionele, '*voorwaartse methode*' om nieuwe minor-antigenen te identificeren is sinds zijn ontdekking drastisch veranderd en geoptimaliseerd maar is in essentie niet veranderd. T-cellen met een onbekende specificiteit worden geïsoleerd uit het bloed van patiënten die een HLA-identieke stamceltransplantatie hebben ondergaan. Met behulp van verschillende moleculaire methoden kan vervolgens het herkende minor-antigeen geïdentificeerd worden. Met behulp van de voorwaartse methode is er de afgelopen jaren een grote hoeveelheid minor-antigenen met uiteenlopende weefseldistributies geïdentificeerd. Helaas zijn er hiervan veel niet therapeutisch relevant vanwege een ongunstige weefseldistributie van het minor-antigeen coderende gen. Om de identificatie van therapeutisch relevante minor-antigenen efficiënter te maken is in dit onderzoek de mogelijkheid onderzocht om met een '*terugwaartse methode*' minor-antigenen en de bijbehorende specifieke T-cellen te identificeren. Het fundamentele verschil tussen deze en de voorwaartse methode is de keuze voor het epitoom dat herkend dient te worden. Het uitgangspunt van deze methode is gebaseerd op het kunnen voorspellen van perfecte, hematopoïese-specifieke minor-antigenen door het gebruik van *databanken* en *bioinformatica*. Als een voorspeld minor-antigeen op theoretische wijze voldoet aan alle opgestelde criteria kan vervolgens in het bloed van gezonde donoren gezocht worden naar een T-cel die uitsluitend dit epitoom herkend. Het isoleren van deze voorspelde minor-antigeen-specifieke T-cellen is het einddoel van deze methode. Gebleken is dat de kans om dit soort T-cellen te isoleren uit de totale T-cel populatie erg klein is. Daarom moeten verschillende verrijkmethode worden ontwikkeld om tot dit resultaat te komen. Omdat de TCR de specificiteit van de minor-antigeen-specifieke T-cellen bepaalt, kan de TCR worden gekloneerd en worden gebruikt in een immunotherapie waarin deze wordt geïntroduceerd in donor T-cellen van

een ander individu. Door met de terugwaartse methode op grote schaal nieuwe minor-antigeen-specifieke T-cellen te isoleren kan er een *TCR-bank* worden aangelegd die in de toekomst patiënten die een allogene stamceltransplantatie ondergaan mogelijk kan voorzien van een minor-antigeen-specifiek T-cel product met gewenste anti-leukemie reactiviteit.

In **hoofdstuk 2** wordt onderzocht of het haalbaar is om met de op dat moment beschikbare technieken op een efficiënte manier de specificiteit van grote hoeveelheden T-cellen te analyseren. Met behulp van publieke *SNP en genexpressie databanken* en drie verschillende *peptide-HLA-binding algoritmes* kan een groot aantal minor-antigenen worden voorspeld. Vervolgens worden bloedmonsters van patiënten die een succesvolle alloSCT en DLI hebben ondergaan geanalyseerd met complexen van vier recombinante HLA-moleculen (MHC-tetrameren) die een specifiek voorspeld peptide aanbieden. T-cellen die deze zogenoemde '*MHC-tetrameren*' herkennen kunnen op basis van een fluorescent label worden geïdentificeerd. Hoewel het technisch haalbaar blijkt om met de ontwikkelde methode op grote schaal peptide-specifieke T-cellen te isoleren – er worden T-cellen geïsoleerd voor 71 voorspelde minor-antigenen – blijkt geen van deze T-cellen in staat te zijn de door de patiënt van nature gepresenteerde peptiden te herkennen. Op basis van dit hoofdstuk kunnen twee belangrijke conclusies getrokken worden die voor het verdere verloop van het onderzoek relevant zijn. Allereerst blijkt dat het willekeurig analyseren van patiënten op de aanwezigheid van minor-antigeen reactieve T-cellen, in de context van een epitooop-gedreven terugwaartse methode, zonder hun *SNP status* in overweging te nemen, een zeer lage efficiëntie op te leveren. Het grootste deel van de geïsoleerde MHC-tetrameer positieve T-cellen blijkt niet in staat minor-antigeen presenterende cellen te kunnen herkennen. Vermoedelijk komt dit doordat de geïsoleerde T-cellen in de thymus van de oorspronkelijke donor zijn geselecteerd om lichaamseigen epitopen *niet* te herkennen. T-cellen geïsoleerd in deze categorie hebben een overwegend lage aviditeit voor de voorspelde minor-antigenen. Daarnaast worden er ook T-cellen geïsoleerd uit donoren die het voorspelde minor-antigeen *wel* met een hoge aviditeit herkennen. Dit wordt aangetoond door op een artificiële manier dit antigeen door antigeen-negatieve cellen tot expressie te laten brengen. Deze cellen worden alleen dan herkend. Omdat cellen van de patiënt niet herkend worden geeft dit aan dat een groot deel van de voorspelde minor-antigenen niet van nature wordt gepresenteerd door het HLA op de cellen van de patiënt.

In **hoofdstuk 3** wordt onderzocht of het met de ontwikkelde MHC-tetrameer verrijkmethode mogelijk is om laag-frequente peptide-reactieve T-cellen effectiever te isoleren uit perifere bloed en wat hun vermogen is goed hun epitooop te herkennen. Van de geselecteerde virale peptiden is eerder aangetoond dat ze van nature worden gepresenteerd door geïnfecteerde cellen in één van de veel voorkomende HLA allelen; A1, A2, B7, B8 en B40, en dat T-cel immuniteit tegen deze epitopen bestaat. Met de isolatie van laag-frequente

T-cellen uit het 'naïeve' repertoire willen we de gevoeligheid van de isolatiemethode bepalen. Voor dit doeleinde zijn donoren met een negatieve serologische status voor het humane herpesvirus CMV geselecteerd en is met behulp van de MHC-tetrameer verrijkmethode getracht CMV-specifieke naïeve T-cellen te isoleren. Het blijkt mogelijk om in twee opeenvolgende MHC-tetrameer verrijkgstappen duidelijk aantoonbare MHC-tetrameer-positieve T-cel populaties op te kweken voor 8 van de 10 geselecteerde epitopen. Door het V-beta keten gebruik van de TCR van MHC-tetrameer-positieve T-cel populaties te analyseren laten we zien dat deze van een complexe samenstelling zijn. Het meermaals uitvoeren van een zelfde isolatie experiment laat zien dat de frequentie van CMV specifieke voorloper cellen in het naïeve T-cel repertoire een grote invloed heeft op de samenstelling van de expanderende T-cel populaties. Door de verschillende populaties functioneel te testen op de herkenning van cellen die beladen zijn met peptide of die het peptide endogeen presenteren blijkt dat veel geïsoleerde T-cel klonen niet reactief zijn tegen het specifieke CMV-peptide. Blijkbaar correleert de MHC-tetrameer aankleuring van een T-cel populatie niet altijd met *functionele reactiviteit*, zeker wanneer T-cellen worden verkregen uit het naïeve repertoire aangezien deze nog niet zijn geselecteerd op een hoge aviditeit zoals antigeen-ervaren T-cellen. Dit gebrek aan correlatie kan worden verklaard door de manier waarop een recombinant MHC-multimeren complex (MHC-tetrameer) zich aan een T-cel bindt. Door de *associatie- en dissociatiekinetiek* van het MHC-peptide-TCR-complex te bestuderen met behulp van een innovatieve *streptameer* techniek blijkt dat deze kinetiek tussen een TCR en een MHC-tetrameer op een onnatuurlijke wijze verstoord is door de multimerisatie van MHC-peptide moleculen. Met behulp van streptameren, een complex dat sterk lijkt op een MHC-tetrameer maar waarvan de sterptavidine-biotine anker-residuen van het complex na de binding met een T-cel verbroken kunnen worden, tonen we aan dat de dissociatiekinetiek van een TCR met een enkel MHC-peptide molecuul wel correleert met de functionaliteit van de geïsoleerde T-cel kloon. We laten zien dat van vier T-cel klonen met een relatief vergelijkbare hoge MHC-tetrameer aankleuring er maar twee daadwerkelijk functioneel zijn. Door deze analyse kunnen functionele en niet-functionele T-cel klonen in de toekomst van elkaar worden onderscheiden.

In **hoofdstuk 4** wordt een nieuwe methode beschreven die ontwikkeld wordt om minor-antigenen te voorspellen en de bijbehorende T-cellen te isoleren. In deze methode wordt een andere bron van minor-antigenen geïntegreerd in de terugwaartse identificatiemethode. Peptiden die van nature gepresenteerd worden door het HLA van cellen worden door een zuurbehandeling geëluëerd en vervolgens geïdentificeerd op basis van hun *moleculaire massa* met behulp van *massaspectrometrie*. Deze bron van geëluëerde peptiden garandeert dat de peptiden van nature gepresenteerd kunnen worden in het HLA op het celmembraan van cellen. Om minor-antigenen te identificeren die van nature door hematopoïetische cellen kunnen worden gepresenteerd is gebruik gemaakt van *geïmmortaliseerde B-cellijnen* als peptidenbron. De identificatie van de

biologisch relevante en immunogene *LB-NISCH-1A* minor-antigeen-specifieke T-cel uit het bloed van een gezonde donor toont aan dat deze nieuwe methode haalbaar is. Deze nieuwe methode wordt vervolgens in **hoofdstuk 5** op grotere schaal gebruikt om vanuit een nieuwe databank van geëluëerde peptiden minor-antigenen te voorspellen en daar vervolgens immunogene T-cellen voor te isoleren. Dit leidt tot de identificatie van de minor-antigenen *LB-CLYBL-1Y* en *LB-TEP1-1S*. De klinische relevantie van *LB-CLYBL-1Y* wordt aangetoond door de aanwezigheid van MHC-tetrameer-positieve T-cellen in het bloed van een patiënt na alloSCT. Hiermee is de cirkel rond en tonen we aan dat met de in dit proefschrift ontwikkelde terugwaartse methode T-cellen met een gewenst minor-antigeen herkenningspatroon geïdentificeerd kunnen worden.

Tot op heden is het aantal minor-antigen dat geïdentificeerd werd met een voorwaartse methode groter dan die resulteren uit een terugwaartse methode. In dit proefschrift tonen we aan dat het voorspellen van klinisch relevante T-cel epitopen onverwacht complex is. De identificatie van drie nieuwe minor-antigen met de in dit proefschrift ontwikkelde terugwaartse methode geeft de mogelijkheid aan maar de lage efficiëntie maakt deze nog niet tot een volwaardige concurrent van de voorwaartse methode. In de komende jaren kan het gebruik van nieuwe bioinformatische informatie de efficiëntie van terugwaartse epitoom identificatie methoden verhogen. Hierdoor kan een grote collectie van T-cel producten worden aangelegd waardoor het realistischer wordt om patiënten met een minor-antigeen specifieke therapie op maat te behandelen.

