



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **MHC class II antigen presentation by B cells in health and disease**

Souwer, Y

### **Citation**

Souwer, Y. (2009, December 1). *MHC class II antigen presentation by B cells in health and disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14474>

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/1887/14474>

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

## **Nederlandse samenvatting**

In de mens speelt MHC klasse II antigeen presentatie een tweezijdige rol bij ziekte en gezondheid. Aan de ene kant activeert antigeen presentatie via MHC klasse II moleculen CD4<sup>+</sup> T cellen om cytokines te produceren en CD40L tot expressie te brengen zodat B cellen gestimuleerd worden om antistoffen te produceren. In dit proefschrift hebben we de rol van MHC klasse II antigeen presentatie door B cellen bestudeerd in de antistof respons bij bacteriële infecties. Aan de andere kant geven na MHC klasse II antigeen presentatie de geactiveerde CD4<sup>+</sup> T cellen hulp aan CD8<sup>+</sup> T cellen. De geactiveerde CD8<sup>+</sup> T cellen kunnen nu hun cytotoxische activiteiten uitvoeren om defecte/getransformeerde of geïnfecteerde cellen te elimineren. Verstoring van MHC klasse II antigeen presentatie zou een rol kunnen spelen bij het ontduiken van het immuunsysteem door kankercellen, daarom hebben wij de MHC klasse II antigeen presentatie route bestudeerd bij leukemie. Het belang van MHC klasse II antigeen presentatie wordt duidelijk in patiënten met een defect in MHC klasse II antigeen presentatie. Deze zeldzame primaire immuundeficiëntie ziekte, genaamd Bare Lymphocyte Syndrome type II (BLSII), wordt gekenmerkt door de afwezigheid van MHC klasse II eiwit expressie. De MHC klasse II genen zelf zijn onveranderd in deze patiënten, maar hun expressie is verstoord door mutaties in transcriptiefactor genen die de transcriptie van MHC klasse II genen initiëren. Het resultaat is dat patiënten een ernstig defect hebben in zowel de cellulaire als humorale immuniteit en een extreme gevoeligheid voor infecties laten zien. Infecties beginnen in het eerste levensjaar, er is een dramatische progressie van verschillende soorten infectieuze complicaties en patiënten sterven doorgaans voor de leeftijd van 10 jaar. Dit laat zien dat een defect in MHC klasse II antigeen presentatie slecht gecompenseerd kan worden door de andere onderdelen van het aangeboren en verworven immuunsysteem.

## **Fagocytose van bacteriën door B cellen**

Klassiek gezien omvatten professionele fagocyten de neutrofielen, monocyt, macrofagen, dendritische cellen (DCs) en mast cellen. Professionele fagocyten hebben receptoren op hun oppervlak die schadelijke objecten kunnen detecteren die normaal niet in het lichaam gevonden worden, zoals pathogene bacteriën. Fagocyten zijn daarom cruciaal bij het bestrijden van infecties en in het behouden van de gezondheid van weefsels door het verwijderen van dode en stervende cellen die het einde van hun levensduur bereikt hebben.

Kenmerken van fagocytose zijn de internalisatie van grote partikels (meestal > 500 nm in diameter) met reorganisatie van het actine cytoskelet en de extensie van pseudopodia (vorming van een fagocytische cup). Het dogma is dat B cellen geen fagocytische capaciteiten hebben, maar recent is aangetoond dat B cellen van zeer vroege gewervelden (teleost vissen en amfibieën) potente fagocyten zijn. De auteurs suggereerden dat de fagocytische capaciteit van B cellen al aanwezig was in een gezamenlijke voorouder op het moment van de fylogenetische splitsing van teleosten en amfibieën, maar dat B cellen van zoogdieren deze aangeboren immuun capaciteit verloren lijken te hebben. Inderdaad, hoewel beschreven is dat humane B cellijnen antigenen gebonden aan deeltjes presenteren in de context van MHC klasse II en antigenen van een niet-internaliseerbaar oppervlak kunnen onttrekken, werden primaire B cellen niet gedacht in staat te zijn om grote partikels te fagocyteren omdat zij weinig ruimte hebben in het cytoplasma en een relatief grote kern.

Aangezien humane primaire B cellen niet als fagocytische cel gezien worden, hoe verkrijgen zij dan antigenen van bacteriën? Het dogma is dat B cellen antigeen verkrijgen van folliculaire dendritische cellen (FDCs) in lymfoïde follikels van de milt, lymfe knopen (LNs) en mucosale lymfoïde weefsels. Een andere manier zou via normale DCs kunnen zijn, waarvan is aangetoond dat ze geïnternaliseerde antigenen recycleren naar hun cel oppervlak en deze in onaangepaste vorm aan B cellen presenteren. Recent zijn subcapsulaire macrofagen geïdentificeerd in LNs als belangrijke plaats waar B cellen aan deeltjes gebonden antigenen tegen komen. Aangezien aangetoond is dat B cellen antigenen kunnen oppikken van een niet-internaliseerbaar oppervlak, zou het vangen van antigeen van het oppervlak van andere cellen een manier kunnen zijn om bacteriële antigenen te internaliseren. Een alternatief is dat bacteriën naar regionale LNs zouden kunnen verplaatsen of naar B cel gebieden in de milt en mucosa-geassocieerd lymfoïd weefsel (MALT), waar B cellen direct antigenen van de bacteriën zelf zouden kunnen oppikken. In **Hoofdstuk 2** is de humane B cellijn Ramos gebruikt in combinatie met anti-IgM gecoate beads om aan te tonen dat humane B cellijnen inderdaad zeer capabele fagocytische cellen zijn als de beads via de B cel receptor (BCR) herkend worden. Ramos cellen internaliseren anti-IgM gecoate beads compleet, maar irrelevant gecoate beads worden niet geïnternaliseerd. Als een meer fysiologisch model hebben we de *Salmonella* bacterie gebruikt. In tegenstelling tot het huidige dogma, hebben we laten zien dat ook naïeve en memory primaire B cellen in staat zijn hele,

levende *Salmonella* te fagocyteren. Verder onderzoek liet zien dat dit via de BCR plaats vindt en dat fagocytose via de BCR resulteert in activatie van de B cel en secretie van immuunglobulinen. De antistoffen die geproduceerd worden door B cellen die *Salmonella* hebben geïnternaliseerd zijn reactief tegen *Salmonella*, dat wederom betrokkenheid van de BCR aantoont. Het relatief hoge percentage circulerende B cellen dat *Salmonella* herkent via de BCR kan verklaard worden door de expressie van een polyreactieve BCR (ook reactief tegen andere bacteriën) op CD27<sup>+</sup> circulerende marginale zone B cellen. Net als IgM<sup>+</sup> memory B cellen, is er ook een subset van mature naïeve B cellen in perifere bloed die een polyreactieve BCR tot expressie brengen. Naast antistof productie, hebben we in **Hoofdstuk 2** laten zien dat fagocytose van *Salmonella* ook leidt tot snelle antigeen presentatie via MHC klasse II moleculen aan CD4<sup>+</sup> T cellen. De activatie van CD4<sup>+</sup> T cellen is bacterie-specifiek, aangezien we hebben aangetoond dat T cellen die opgewekt zijn tegen *Staphylococcus* niet reageren op restimulatie met B cellen die *Salmonella* hebben gefagocyteerd.

### **De B cel als transportmiddel voor *Salmonella***

Aangezien *Salmonella* een facultatief intracellulaire bacterie is, rijst de vraag wat het lot is van *Salmonella* eenmaal binnen in de B cel. **Hoofdstuk 3** beschrijft de mogelijke rol van B cellen in de verspreiding van *Salmonella* na orale infectie. We hebben laten zien dat (anders dan macrofagen, neutrofielen en in mindere mate DCs) B cellen niet in staat zijn om *Salmonella* te doden na opname via de BCR. De replicatie van *Salmonella* wordt echter onderdrukt in levende B cellen, terwijl in apoptotische B cellen *Salmonella* weer begint te vermenigvuldigen. We hebben gezien dat uren na fagocytose levende bacteriën uit B cellen vrij kwamen en dat deze uitgescheiden bacteriën *in vitro* opnieuw andere cellen konden infecteren. Om de rol van B cellen als verspreider van *Salmonella in vivo* te bestuderen, hebben we experimenten gedaan in muizen. Deze experimenten hebben laten zien dat adoptieve overdracht van *Salmonella*-specifieke B cellen in wild-type muizen de mortaliteit significant verhoogt na orale toediening van een sub-lethale dosis *Salmonella*. Bovendien werden verhoogde aantallen *Salmonella* bacteriën gevonden in de lever van muizen die *Salmonella*-specifieke B cellen hadden gekregen.

### **Cross-presentatie van *Salmonella* antigenen door B cellen**

B cellen behoren vooral tot de groep van “professionele antigeen presenterende cellen” om hun zeer efficiënte manier van internaliseren van antigeen. Andere leden zijn DCs en macrofagen, die net als B cellen fragmenten van antigenen tonen via MHC klasse II moleculen op hun cel oppervlak. Naast presentatie via MHC klasse II moleculen, zijn DCs in staat om exogene antigenen te cross-presenteren via MHC klasse I moleculen aan CD8<sup>+</sup> T cellen. In **Hoofdstuk 4** hebben we aangetoond dat B cellen ook in staat zijn om *Salmonella* antigenen te cross-presenteren en CD8<sup>+</sup> T cellen te activeren. Niet verbazingwekkend is dat deze activatie van CD8<sup>+</sup> T cellen afhankelijk is van CD4<sup>+</sup> T cel hulp, aangezien het incuberen van B cellen die *Salmonella* hadden gefagocyteerd met alleen CD8<sup>+</sup> T cellen niet resulteerde in activatie van de CD8<sup>+</sup> T cellen. Na activatie wordt IL-2 geproduceerd door CD4<sup>+</sup> T cellen en het toevoegen van IL-2 samen met CD8<sup>+</sup> T cellen herstelde de activatie van CD8<sup>+</sup> T cellen door B cellen. Alleen activatie en proliferatie is niet voldoende om geïnfecteerde cellen te elimineren, CD8<sup>+</sup> T cellen moeten ook degranuleren na interactie met een geïnfecteerde cel. We hebben cytotoxiciteits proeven gedaan om te laten zien dat *Salmonella* geprimeerde CD8<sup>+</sup> T cellen degranuleren (gemeten door CD107a expressie op het oppervlak van CD8<sup>+</sup> T cellen) en werkelijk geïnfecteerde cellen doden (gemeten door het vrijkomen van <sup>51</sup>Chroom uit het cytoplasma van geïnfecteerde B cellen). Ook hebben we in **Hoofdstuk 4** laten zien dat de CD8<sup>+</sup> T cel respons geïnduceerd door geïnfecteerde B cellen een memory respons is, aangezien naïeve CD8<sup>+</sup> T cellen niet geprimeerd konden worden door B cellen. Dit in tegenstelling tot de CD4<sup>+</sup> T cel respons, waarin zowel naïeve als memory CD4<sup>+</sup> T cellen werden geactiveerd door B cellen die *Salmonella* hadden gefagocyteerd (ongepubliceerde resultaten).

### **De rol van B cellen in *Salmonella* infectie**

Na orale opname doorkruist *Salmonella* het darmepitheel en treedt het de Peyer's patches binnen via gespecialiseerde antigeen-sampling M cellen of opname door DCs aan de luminale zijde van de darm. Na het binnentreden in de Peyer's patches, komt *Salmonella* direct B cellen tegen die de bacteriën kunnen fagocyteren, CD4<sup>+</sup> T cellen activeren en anti-*Salmonella* antistoffen uitscheiden. B cellen zijn nodig voor efficiënte bescherming tegen zowel primaire als secundaire infecties door *Salmonella* en vorming van antistoffen met hoge affiniteit is niet de enige functie van B cellen in salmonellosis, aangezien passieve overdracht van *Salmonella*-

immuun serum de immuniteit van muizen tegen *Salmonella* niet kan bewerkstelligen. B cel deficiënte muizen hebben een verstoorde Th1 T cel response in het vroege begin van een *Salmonella* infectie, wat laat zien dat B cellen een essentiële rol spelen in het initiëren van T cel gemedieerde bescherming. Humane B cellen kunnen naïeve CD4<sup>+</sup> T cellen primen en ook memory CD4<sup>+</sup> cellen activeren, maar zijn niet in staat om *Salmonella* te doden en dus verspreiden B cellen de bacterie door het lichaam. Desalnettemin, B cellen die *Salmonella* hebben opgenomen kunnen memory CD8<sup>+</sup> T cellen activeren die vervolgens de geïnfecteerde cellen doden. Tijdens een primaire infectie zijn nog steeds andere APCs (zoals DCs) nodig voor het activeren van naïeve CD8<sup>+</sup> T cellen. *Salmonella* gebruikt dus het immuunsysteem van de gastheer om te overleven en zich te verspreiden door het lichaam via antigeen-specifieke B cellen, maar het zich ontwikkelende immuunsysteem maakt anti-*Salmonella* antistoffen en activeert CD4<sup>+</sup> T helper en CD8<sup>+</sup> CTLs. Dit is een voorbeeld van interactie tussen bacterie en gastheer welke voor de mens moeilijk in balans te houden lijkt en de pathogeniciteit van *Salmonella* zou kunnen verklaren.

Dode bacteriën worden ook herkend via de BCR, maar niet gefagocyteerd door B cellen. In **Hoofdstuk 2** hebben we aangetoond dat, hoewel ze niet helemaal opgenomen worden, antigenen van dode bacteriën door B cellen gepresenteerd worden aan CD4<sup>+</sup> T cellen en dat de CD4<sup>+</sup> T cellen ook geactiveerd worden. Op deze manier kunnen B cellen door CD4<sup>+</sup> T cellen geactiveerd worden om te differentiëren in antistof producerende plasma cellen, wat resulteert in een effectieve immuunrespons tegen volgende infecties. **Hoofdstuk 4** laat zien dat B cellen geen antigenen van dode bacteriën presenteren aan CD8<sup>+</sup> T cellen, wat aantoont dat *Salmonella* zelf bijdraagt aan de cross-presentatie van zijn eigen antigenen. Levende *Salmonella* injecteert eiwitten in het cytosol van de gastheercel via zijn Type 3 secretie systeem (TTSS) om zijn intracellulaire overleving veilig te stellen. Deze eiwitten worden onoverkomelijk gedegradeerd door het proteasoom. Peptides kunnen dan getransporteerd worden naar het endoplasmatisch reticulum (ER), op nieuw gesynthetiseerde MHC klasse I moleculen geladen worden en gepresenteerd aan CD8<sup>+</sup> T cellen. Dode *Salmonella* hebben geen functioneel TTSS meer, wat zou kunnen verklaren waarom dode bacteriën niet gecrosspresenteerd worden. De bevinding dat B cellen die dode *Salmonella* bij zich dragen geen *Salmonella*-specifieke CTLs activeren zou kunnen kloppen met het idee dat dit

immunologisch gezien ook niet nodig is; in deze situatie vormen de cellen geen niche voor *Salmonella* overleving en verspreiding, dus hun onmiddellijke opruiming zou minder belangrijk kunnen zijn voor de gastheer.

### **MHC klasse II antigeen presentatie in leukemie**

Professionele APCs nemen apoptotische cellen en puin op om een CD4<sup>+</sup> T cell respons te initiëren. Stervende tumorcellen kunnen ook opgenomen worden, maar soms slaagt de APC er niet in om een effectieve immuunrespons te genereren tegen de tumorcellen, aangezien de kanker niet altijd wordt opgeruimd. Desalniettemin brengen veel tumoren van het hematologisch systeem MHC klasse II tot expressie op hun cel oppervlak. Blijkbaar is de MHC klasse II antigeen presentatie door deze tumorcellen er niet in geslaagd om een effectieve immuunrespons te genereren wat het resultaat zou kunnen zijn van afwijkingen in de MHC klasse II antigeen presentatie route. Wij hebben de MHC klasse II antigeen presentatie route bestudeerd in de myeloïde leukemie AML en in meer detail in de lymfoïde leukemie B-CLL.

In **Hoofdstuk 5** hebben we laten zien dat het zelf-peptide CLIP tot expressie werd gebracht in AML blasten die MHC klasse II tot expressie brachten. Patiënten met HLA-DR<sup>+</sup>/CLIP<sup>-</sup> blasten hadden een significant langere ziekte-vrije overleving dan patiënten met HLA-DR<sup>+</sup>/CLIP<sup>+</sup> blasten. Dit laat zien dat de expressie van CLIP op de blasten een maat zou kunnen zijn voor ontsnapping aan het immuunsysteem door de leukemie cellen. Tijdens het onderzoek naar de MHC klasse II antigeen presentatie route, vonden we dat in AML blasten HLA-DO en HLA-DM (de peptide editors van de MHC klasse II antigeen presentatie route) duidelijk detecteerbaar waren op zowel mRNA als eiwit niveau. De relatieve expressie van DO en DM correleerde met de efficiëntie van antigeen belading op DR moleculen: hoe meer DO relatief aan DM, hoe meer CLIP relatief aan DR. Samen leidde dit tot de hypothese dat HLA-DR<sup>+</sup>/CLIP<sup>-</sup> blasten in staat zijn om leukemie-specifieke antigenen aan CD4<sup>+</sup> T cellen te presenteren. Dit zou een effectieve anti-tumor respons teweeg brengen die in een verlengde ziekte-vrije overleving resulteert. Strategieën om CLIP expressie omlaag te brengen op leukemische blasten worden onderzocht om een effectieve anti-tumor respons op te wekken in AML. Retrovirale transductie van specifiek Ii siRNAs in twee humane myeloïde leukemische cellijnen laat een gereduceerde expressie van CLIP zien relatief aan DR (van Luijn et al., submitted). Ondanks de verlaagde hoeveelheden DR op het celoppervlak (als

secondaire consequentie van de verlaging van *Ii*), verhogen beide cellijnen sterk de activatie van allogene CD4<sup>+</sup> T cellen. Echter, de inductie van tumor specifieke CD4<sup>+</sup> T cellen (en daaropvolgende hulp voor de inductie van tumor specifieke CD8<sup>+</sup> T cellen) in AML blasten getransduceerd met *Ii* siRNAs is nog niet aangetoond. Andere strategieën zouden DM en/of DO, de peptide editors, kunnen aanpakken. Ongepubliceerde data van onze groep laten zien dat wanneer B cellen *in vitro* worden blootgesteld aan dexamethason, een sterke toename van DM eiwit wordt gezien, zonder veranderde DR of DO eiwit hoeveelheden. Meer DM relatief aan DO zou peptide belading van MHC klasse II moleculen kunnen verbeteren, zonder de totale hoeveelheid DR moleculen die beschikbaar zijn voor antigeen presentatie te beïnvloeden.

### **Het HLA-DOA mRNA expressie niveau voorspelt prognose in B-CLL**

Naast de myeloïde leukemie AML, hebben we de MHC klasse II antigeen presentatie route bestudeerd in de lymfoïde leukemie B-CLL. In **Hoofdstuk 6** hebben we laten zien dat in B-CLL de expressie van *DRA*, *DMB*, *DOA* en *DOB* maar ook *Ii* sterk afwijkend is op mRNA niveau in vergelijking met B cellen van gezonde controles. Aangezien transcriptie van deze genen gereguleerd wordt (*DOB* en *Ii* deels) door CIITA, hebben we mRNA levels bestudeerd van totaal CIITA en de lymfoïd-specifieke promoters PIII en PIV. Totaal CIITA mRNA was significant verhoogd in vergelijking met mRNA levels in B cellen van gezonde controles. mRNA van CIITA-PIII werd in alle monsters gedetecteerd, maar liet geen verschil zien met controles. De mRNA levels van de IFN- $\gamma$ -induceerbare promotor CIITA-PIV waren echter significant verhoogd, wat laat zien dat transcriptie van CIITA in B-CLL gecontroleerd wordt door de gecoördineerde activiteit van de B cel-specifieke promotor PIII en de IFN- $\gamma$ -induceerbare promotor PIV. Verhoogde transcriptie leidt niet altijd tot verhoogde translatie en verhoogde eiwit levels, zoals we hebben laten zien in **Hoofdstuk 6**. Analyse van eiwitexpressie met semi-kwantitatieve Western blot liet geen toename zien in eiwit expressie door B-CLL cellen vergeleken met B cellen van gezonde controles. DM eiwit expressie was zelfs significant lager in B-CLL patiënten.

We hebben het mechanisme bestudeerd onderliggend aan het verschil tussen de geobserveerde transcriptionele opregulatie en de onveranderde of gedownreguleerde totale eiwit levels van DR in de maligne B-CLL cellen. We hebben pulse chase analyse gedaan in B cellen van drie gezonde donoren en vier B-CLL



patiënten met verschillende niveaus van transcriptionele opregulatie van *DRA*. Voor DR zagen we een vergelijkbare halfwaardetijd in de maligne B-CLL cellen en de gezonde B cellen, aangezien in alle gevallen ongeveer 90% van de nieuw gesynthetiseerde DR moleculen 24 uur na biosynthese nog steeds aanwezig was. Bovendien was de maturatie van het DR complex en de degradatie snelheid van het klasse II-geassocieerde Ii vergelijkbaar tussen gezonde B cellen en maligne B-CLL cellen (ongepubliceerde resultaten). Onverwachts laten de maligne B-CLL cellen een vergelijkbare biosynthese snelheid van DR zien als de gezonde B cellen, ondanks hun tot drievoudige hogere mRNA levels. Recent is aangetoond dat mesenchymale stamcellen in respons op IFN- $\gamma$  verhoogde levels van CIITA-PIV hebben, maar dat dit niet tot uiting komt in een verhoging van HLA-DR eiwit als gevolg van cytoplasmatische retentie van het CTIIA transcript. Aangezien wij ook opregulatie hebben gevonden van transcripten downstream van CIITA is het niet waarschijnlijk dat CIITA-PIV in het cytoplasma vast gehouden wordt. Of cytoplasmatische retentie van *DRA* transcripten een verklaring zou kunnen zijn voor de normale of verlaagde DR eiwit levels moet nog onderzocht worden. Deze data laten zien dat het bestuderen van mRNA levels niet noodzakelijkerwijs een afspiegeling is van de expressie levels van functionele eiwitten.

Daarnaast hebben we bestudeerd of de verhoogde mRNA levels van de MHC II componenten een correlatie vertonen met klinische uitkomst. Alleen *DOA* mRNA levels waren significant verschillend als we de overleving na monsterafname vergeleken tussen patiënten. Als patiënten werden ingedeeld in een groep met *DOA* mRNA levels  $< 3.4$  en  $\geq 3.4$ , definieerde *DOA* mRNA levels  $\geq 3.4$  een subgroep van patiënten met een minder gunstige prognose: 6 van de 8 patiënten met *DOA* mRNA levels  $\geq 3.4$  stierven tijdens follow up vergeleken met 4 van de 12 patiënten met mRNA levels  $< 3.4$ .

Aangezien de verandering in transcriptie van de DO genen niet tot uiting komt in hun eiwit levels, rijst de vraag waarom *DOA* mRNA correleert met klinische uitkomst. Het is beschreven in B-CLL dat verscheidene serum cytokine gehalten verhoogd zijn en dat zowel CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> T cellen significant meer IFN- $\gamma$  en IL-4 produceren dan in gezonde controles. Deze ontstekings cytokines kunnen de transcriptie van CIITA-PIV initiëren, welke verhoogd is in B-CLL. Dus, overexpressie van *DOA* mRNA zou het resultaat kunnen zijn van een afwijkend immunologisch milieu in B-CLL maar kan overleving in B-CLL voorspellen. Dit moet gevalideerd

worden in een groter cohort van B-CLL patiënten en bij voorkeur in monsters afgenomen op het moment van diagnose.

### **Veranderde MHC klasse II antigeen presentatie wordt gereflecteerd door expansie van het geactiveerde T cel compartiment in B-CLL**

In **Hoofdstuk 7** hebben we kwantitatief aangetoond dat eigenlijk zowel DM als DO op eiwit niveau lager tot expressie komen in B-CLL in vergelijking met gezonde controles. Hoewel we niet de biosynthese snelheid van DM en DO hebben bestudeerd, zou een lagere eiwit expressie van DM en DO eiwit in B-CLL patiënten een verschil in turnover suggereren vergeleken met gezonde controles. Dit is een interessant onderwerp dat meer onderzoek verdient. De relatieve expressie van DM ten opzichte van DO was echter hoger in B-CLL patiënten. Expressie van DR op het plasma membraan verschilde niet, maar CLIP levels waren significant lager in B-CLL patiënten. De correlatie tussen de relatief hogere expressie van DM en de verlaagde expressie van het zelf-peptide CLIP suggereert dat door variatie in DM levels het peptide repertoire dat gepresenteerd wordt door DR moleculen wordt veranderd, aangezien het gecorreleerd is aan een verlaagde expressie van het zelf-peptide CLIP. Vervolgens hebben we de differentiatie en activatie status van het T cel compartiment bestudeerd. **Hoofdstuk 7** laat zien dat het T cel compartiment in B-CLL patiënten significant verlaagd was in naïeve CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> subsets ten gunste van verhoogde geactiveerde effector populaties. Het percentage geactiveerde T cellen is omgekeerd gecorreleerd met CLIP expressie, wijzend op verbeterde antigeen presentatie. Veranderde MHC klasse II antigeen presentatie zou dus een nieuwe factor kunnen zijn in de immuun dysfunctie en pathobiologie van B-CLL.

Nieuwe therapieën tegen B cel maligniteiten omvatten het gebruik van monoklonale antistoffen, in het bijzonder tegen CD20 en CD52. Het effector mechanisme van anti-CD20 en anti-CD52 antistoffen is voornamelijk gebaseerd op complement gemedieerde cellulaire cytotoxiciteit (CDCC) en antistof gemedieerde cellulaire cytotoxiciteit (ADCC). Behandeling met deze monoklonale antistoffen lijkt veelbelovend, maar in het geval van hoge B cel belasting zou uitputting van de effector mechanismes kunnen leiden tot substantiële vermindering van de immunotherapeutische efficiëntie.

De data in dit proefschrift zouden een nieuwe benadering kunnen vormen voor therapie tegen B cel kankers. Alle chronische B cel leukemieën en B cel lymfomen brengen IgM en/of IgD tot expressie aan het cel oppervlak. Aangezien wij hebben

laten zien dat het richten van deeltjes naar de IgM-BCR leidt tot internalisatie, en recent hetzelfde is aangetoond voor IgD, zou het richten van micropartikels met anti-kanker middelen naar het constante domein van de BCR een optie kunnen zijn. Deze aanpak zou in het bijzonder aantrekkelijk kunnen zijn in het geval van mantelcel lymfomen, welke hoge levels IgM en/of IgD tot expressie brengen en waar patiënten de slechtste prognose hebben van alle B cel kankers.

Anti-kanker middelen verpakt in micropartikels zijn minder schadelijk voor de patiënt en gericht naar het constante domein van de BCR brengt dit de drugs direct binnen in de kankercellen. Zo kunnen hoge concentraties drugs bereikt worden in de target cellen, zonder andere cellen in het lichaam te schaden. Deze strategie zou dus de ongewilde bijwerkingen van systemische behandeling met anti-kanker medicijnen kunnen verminderen.