



Universiteit
Leiden
The Netherlands

HLA-specific memory B cells : the missing link?

Karahan, G.E.

Citation

Karahan, G. E. (2017, November 2). *HLA-specific memory B cells : the missing link?*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/57343>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/57343>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57343> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Karahan Gonca E.

Title: HLA-specific memory B cells : the missing link?

Date: 2017-11-02



Chapter 10

Nederlandse Samenvatting

Türkçe Özet

Abbreviations

Curriculum Vitae

Publications

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het immuunsysteem beschermt het lichaam tegen lichaamsvreemde pathogenen. Dit verdedigingssysteem is opgebouwd uit aangeboren (aspecifiek) en adaptieve immuun responsen met uitgebreid overlap tussen beiden. Het aangeboren deel van het immuunsysteem vormt de eerstelijnsafweer tegen micro-organismen en is opgebouwd uit fysieke barrières (huid en slijmvlies epitheel), oplosbare bestanddelen zoals het complement systeem, en cellulaire effectorcellen (granulocyten, mest cellen, macrofagen, dendritische cellen en natural killer cellen). Cellen van het aangeboren immuunsysteem komen snel in actie tegen pathogenen, terwijl cellen van het adaptieve immuunsysteem (T en B cellen) een relatief langzame maar meer specifieke respons verzorgen. Een uniek kenmerk van het adaptieve immuunsysteem is het vermogen om geheugen te vormen tegen pathogenen. Hierdoor kan er een snellere en sterkere immuunrespons optreden als het lichaam opnieuw aan het zelfde pathogeen wordt blootgesteld. Speciale eiwitten genaamd humaan leukocytenantigenen (HLA) bevinden zich op het celoppervlak en spelen een belangrijke rol in adaptieve immuunresponsen. Het HLA systeem is erg polymorf, wat betekent dat er vele verschillende allelen voorkomen, zowel in individuele personen maar met name ook in de populatie. De functie van HLA moleculen is het presenteren van (lichaamsvreemde) eiwitten aan T cellen van het adaptieve immuunsysteem, en verschillende HLA moleculen kunnen verschillende eiwitten presenteren. Het uitgebreide polymorfisme in het HLA biedt zekerheid dat gehele populaties niet ten ondergaan aan nieuwe, onbekende pathogenen, omdat op populatie niveau er zo goed als zeker eiwitten van het betreffende pathogeen gepresenteerd kunnen worden om een immuunrespons te genereren. Terwijl HLA polymorfisme bijdraagt aan effectieve adaptieve immuunresponsen tegen een verscheidenheid aan pathogenen, kunnen de verschillen in HLA tussen individuen leiden tot problemen bij transplantatie. Het afweersysteem van de patiënt herkent de vreemde HLA antigenen op het donororgaan en kan hiertegen reageren alsof het om een pathogeen gaat.

Orgaantransplantatie is een levensreddende behandelingsmethode voor patiënten die het eindstadium van orgaanfalen hebben bereikt. Verscheidene studies hebben het gunstige effect van HLA overeenkomst tussen ontvanger en donor beschreven. Echter het enorme HLA polymorfisme maakt het haast onmogelijk om een volledig HLA-identiek niet-gerelateerde donor voor een ontvanger te vinden. HLA mismatches tussen patiënt en donor kunnen dan leiden tot activatie van zowel het cellulaire als het humorale adaptieve immuunsysteem in de ontvanger. Om overleving van een HLA-gemismatchte transplantaat mogelijk te maken, is de ontvanger afhankelijk van immunosuppressieve (afweer onderdrukkende) medicatie. Hoewel de reactiviteit van T cellen effectief onder controle gehouden kan worden door hedendaagse immunosuppressieve geneesmiddelen, zijn HLA-antistoffen geproduceerd na activatie van B-cellen een risicofactor voor een vroegtijdig verlies van een orgaantransplantaat.

HLA antistoffen kunnen ontstaan door blootstelling aan cellen of weefsels met lichaamsvreemd

HLA, zoals het geval is bij bloedtransfusies, zwangerschap of eerdere transplantaties. Zoals besproken in **hoofdstuk 2** spelen B cellen een essentiële rol bij de productie van HLA antilichamen. Volledige activatie van naïeve B cellen treedt op als er vreemde HLA antigenen worden herkend, waarbij interacties met T-helper cellen ook een rol spelen. Specifieke interacties tussen immuuncellen, die plaatsvinden in secundaire lymfoïde organen, leiden ertoe dat sommige B cellen positief geselecteerd worden om óf te differentiëren in lang levende memory B cellen die continu circuleren tussen de periferie en de secundaire lymfoïde organen, óf in plasmacellen waarvan het merendeel zich concentreert in het beenmerg om de serum antistof titers te behouden. IgM antilichamen worden voornamelijk geproduceerd door naïeve B-cellen, terwijl IgG wordt geproduceerd door memory B-cellen. Na activatie door een T-helpercel kan een naïeve B cel een verandering ondergaan en IgG produceert (isotype switching).

Transplantatie patiënten, die al eerder een afweerreactie hebben gemaakt tegen het vreemde HLA van een orgaandonor hebben een verhoogd risico op het ontwikkelen van antistof-gemedieerde afstoting, wat een negatieve invloed kan hebben op de overleving van het transplantaat. In diagnostische HLA laboratoria wordt vóór en na transplantatie het serum van patiënten getest op de aanwezigheid van HLA-specifieke antistoffen. Serum antistoffen worden voornamelijk geproduceerd door plasmacellen die zich bevinden in het beenmerg. Daarnaast kunnen echter ook memory B cellen een rol spelen bij de antilichaamproductie tegen het donororgaan. Tot dusver is de rol van deze cellen verwaarloosd in de diagnostiek. Zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, hebben sommige patiënten met een geschiedenis van allo-immunisatie circulerende HLA-specifieke memory B cellen in de afwezigheid van serum antistoffen. Hoewel er een aantal verschillende methoden (complement dependent cytotoxicity (CDC), ELISA, bead-based assays) gebruikt worden voor het detecteren van serum antistoffen, geeft geen van deze testen informatie over de aanwezigheid en omvang van het HLA-specifieke memory B cel compartiment. Het doel van dit proefschrift was om technieken te ontwikkelen voor het detecteren en kwantificeren van HLA-specifieke memory B cellen in het perifeer bloed van HLA-geïmmuniseerde individuen en de relevantie van deze assays vast te stellen voor klinische transplantatie.

Omdat memory B cellen pas actief worden na stimulatie, is polyklonale activatie in het laboratorium noodzakelijk om deze memory B cellen *in vitro* te kunnen detecteren. Hierbij is het essentieel dat deze polyklonale activatie cocktail niet tot leidt tot isotype switching in naïeve B cellen veroorzaakt, waardoor deze dezelfde functionele karakteristieken krijgen als memory B cellen, het geen zou leiden tot vals positieve reacties. **Hoofdstuk 4** beschrijft een polyklonale activatie cocktail die gebruikt kan worden om geïsoleerde B cellen te activeren om op deze manier reeds bestaande antigeen-specifieke memory B cellen te detecteren zonder antistof isotype switching te induceren. Door gebruik te maken van dit polyklonale activatie protocol is een ELISPOT methode ontwikkeld waarin synthetische HLA klasse II moleculen dienen als HLA doelwit, zoals beschreven in **hoofdstuk 5**. Methoden

om memory B cellen te detecteren maken voornamelijk gebruik van monomeer/tetrameer HLA moleculen die over het algemeen niet het volledige HLA repertoire van een individu representeren. Een donor-specifiek HLA-ELISPOT assay, die screening van HLA-specifieke memory B cellen in perifere bloed van geïmmuniseerde individuen mogelijk maakt door gebruik te maken van cellysaten als natuurlijke bron van HLA klasse I en II, is beschreven in **hoofdstuk 6**. Terwijl perifere bloedmonsters gebruikt kunnen worden om memory B cellen *in vitro* te detecteren, bevatten secundaire lymfoïde organen en beenmerg ook memory B cellen. Zoals beschreven in **hoofdstuk 7**, herbergt het beenmerg niet alleen plasmacellen maar ook memory B cellen specifiek voor hetzelfde antigeen, terwijl deze twee celtypen een verschillend immunoglobuline isotype distributie laten zien. Hoewel serum HLA antistoffen geproduceerd worden door plasmacellen die zich in het beenmerg concentreren, kunnen memory B cellen ook bijdragen aan de productie van HLA antistoffen bij activatie. Deze antistoffen zijn niet per definitie een afspiegeling van de antistof specificiteiten geproduceerd door plasma cellen in het beenmerg. Daarom zou het bepalen van HLA antistoffen in B celkweek supernatanten, aanvullend aan het detecteren van serum HLA antistoffen, een completer beeld kunnen geven van de potentiële humorale allo-immuunrespons. **Hoofdstuk 8** wijdt uit over het nauwkeurig bepalen van HLA antistof specificiteiten die gevonden zijn in serum en B celkweek supernatanten van patiënten die een tweede of opeenvolgende transplantatie ondergaan.

Immunologische risicobeoordelingen in patiënten is momenteel alleen gebaseerd op de aan- of afwezigheid van serum HLA antistoffen, die echter kunnen verschillen van antistof specificiteiten afkomstig van memory B cellen. Gezien het feit dat de afwezigheid van donor-specifieke HLA antistoffen in serum niet per definitie de afwezigheid van B cel immuniteit tegen het transplantaat reflecteert, zouden patiënten die mogelijk donor HLA-specifieke memory B cellen bezitten, zoals patiënten met een tweede of opeenvolgende transplantatie, vrouwen die transplantaten ontvangen van hun partner of kind, en patiënten die desensitisatie behandelingen ondergaan, mogelijk voordeel kunnen ondervinden van de assays die beschreven staan in dit proefschrift.

TÜRKÇE ÖZET

Bağışıklık sistemi vücudu, doğal ve kazanılmış immün yanıtlar aracılığıyla, öz olmayan patojenik mikroorganizmalara karşı korur. Doğal bağışıklık, mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını sağlar ve fiziksel bariyerler (deri ve mukozal epitel), kompleman sistemi gibi solubl araçlar ile efektör hücrelerden (granülositler, mast hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler) oluşur. Doğal bağışıklık sisteminin hücreleri patojenlere karşı hızlı bir savunma uygularken, kazanılmış bağışıklık sisteminin hücreleri (T ve B lenfositler) nispeten daha yavaş fakat daha spesifik bir yanıt verir. Kazanılmış bağışıklığın en önemli özelliği yabancı bir antijen ile ikinci kez karşılaşıldığında, ilkinde göre çok daha güçlü ve hızlı bir yanıt verebilmesi, diğer bir deyişle daha önceden karşılaştığı patojenleri hatırlayabilmesidir. Kazanılmış bağışık yanıtın oluşmasına, insan lökosit antijenleri (Human Leukocyte Antigens-HLA) adı verilen ve bir popülasyondaki her bir bireyde birbirinden tamamen farklı olabilen (polimorfizm) özel proteinler aracılık eder. HLA sistemindeki bu çeşitlilik sayesinde, farklı patojenik antijenler T hücresine sunulabilmekte ve oluşan immün yanıt sayesinde toplumların patojenlere yenik düşmesi engellenmektedir. HLA sisteminin bu oldukça polimorfik yapısı çeşitli patojenlere karşı etkin immün yanıt oluşturulmasına katkıda bulunurken, allojenik (akraba veya akraba dışı) transplantasyonlara bir engel oluşturmaktadır.

Solid organ transplantasyonu, son dönem organ yetmezliği olan hastalar için hayat kurtarıcı bir tedavi seçeneğidir. Pek çok çalışma, hasta ve verici arasındaki HLA uyumunun greft ve hasta sağkalımı üzerine faydalı etkisini göstermiştir. Ancak, HLA sistemindeki çeşitlilik nedeniyle bir hasta için HLA tam uyumlu bir organ vericisi bulmak neredeyse imkansızdır. Hasta ve verici arasındaki HLA uyumsuzlukları, hastada kazanılmış immün yanıtın hem hücreyel (T hücresi) hem de hümorale (B hücresi) kollarını tetikleyerek nakil edilen organın reddine yol açabilir. HLA uyumsuz greftlerin ömrünü uzatmak için hastaların çoğunluğu immünosupresif tedavi almaktadır. T hücresinin reaksiyonları mevcut immünosupresif ilaçlarla etkin bir şekilde kontrol edilebilirken, HLA antikorları aracılığıyla (B hücresi tarafından yönlendirilen) hümorale immün yanıtlar halen uzun dönem solid organ sağkalımı için bir risk faktörü olarak düşünülmektedir.

Doğal yollarla oluşan kan grubu antikorlarının aksine HLA antikorları kan transfüzyonları, gebelikler veya önceki transplantasyonlar yoluyla yabancı HLA'ya maruz kalınması sonucu gelişebilir (alloimmünizasyon). **Bölüm 2**'de tartışıldığı üzere B hücreleri hümorale alloimmün yanıt vasıtasıyla alloimmüniteye (hastanın nakil edilen organa verdiği bağışık yanıt) aracılık ederler. Naif B hücrelerinin aktivasyonu alloantijenin tanınması ve yardımcı T hücreleriyle etkileşim sonucu gerçekleşir. İkincil lenfoid organlarda meydana gelen bazı özel reaksiyonlar sonucu (germinal merkez reaksiyonları) bazı B hücreleri uzun ömürlü hafıza hücreleri ve plazma hücrelerini oluşturmak üzere seçilirler. Hafıza B hücreleri ikincil lenfoid organlar ve periferik kan arasında latent fazda dolaşırken, serum antikor seviyelerini korumakla görevli plazma hücrelerinin çoğu kemik iliğine yerleşir.

Alloimmünizasyon geçmişli olan hastalar, allogreft sağkalımını etkileyebilecek olan antikor

aracılı rejeksiyon geliřtirmek açısından yüksek riskli hasta grubunu oluřtururlar. Serum, HLA tanı laboratuvarlarında nakil öncesi ve sonrası donöre karřı yönlenmiř HLA antikörlerinin tespitinde kullanılan tek kaynaktır. Serum antikörleri çoğunlukla kemik iliğinde yerleřmiř olan plazma hücreleri tarafından üretilir. Ancak sadece plazma hücreleri deėil hafıza B hücreleri de HLA antikör üretimine katkıda bulunabilir. **Bölüm 3**'te örneklendiėi gibi, allimmnizasyon öyküsü olan bazı hastalar serumlarında HLA antikru tespit edilmemiř dahi olsa HLA-spesifik hafıza B hücreleri barındırabilir.

Serum HLA antikrlerini saptamak için kullanılan pek çok yöntem (komplemana baėlı sitotoksisite-CDC, ELISA, boncuk bazlı testler) olmasına raėmen, bu yöntemlerin hiçbiri HLA-spesifik hafıza B hücresi yanıtının byklėi hakkında herhangi bir bilgi saėlamamaktadır. Bu tez çalıřmasının amacı, HLA'ya karřı immünize edici bir hikayesi olan bireylerin periferik kanında HLA-spesifik hafıza B hücrelerini saptayabilen yöntemler geliřtirmek ve yeni geliřtirilen bu yöntemlerin klinik transplantasyon ortamında uygulanabilirliėini deėerlendirmektir.

Latent haldeki hafıza B hücrelerinin *in vitro* ortamda tespit edilebilmeleri için poliklonal aktivasyonları gereklidir. Ancak, kullanılan poliklonal aktivasyon kokteylinin naif B hücrelerinde izotip deėiřimine neden olmaması ve yalnızca hafıza B hücrelerinden kaynaklanan IgG tipi antikörlerin saptanmasına izin vermesi kritik bir öneme sahiptir. **Bölüm 4**, antijen-spesifik hafıza B hücrelerinin tespitinde kullanılabilir böylesi bir poliklonal aktivasyon kokteylini tarif etmektedir. **Bölüm 5**'te ise izole B hücreleri bu kokteyl kullanılarak aktive edilmiř ve sınıf II HLA-spesifik antikör salgılayan hafıza hücrelerini sentetik HLA molekülleri kullanılarak tespit edebilen ELISPOT yöntemi geliřtirilmiřtir.

HLA-spesifik hafıza hücrelerinin tespitinde genelde monomerik ya da tetramerik HLA molekülleri kullanılmaktadır. Allel sayısının 16000'den fazla olduėu HLA sisteminde, bir bireye ait HLA repertuarının yalnızca bir kaç spesifiteye özgü bu sentetik moleküllerle temsili imkansızdır. HLA kaynaėı olarak sınırlı sayıda mevcut olan bu sentetik moleküller yerine hücre lizatlarının kullanıldıėı donör HLA-spesifik ELISPOT yöntemi **bölüm 6**'da anlatılmıřtır. Periferik kan örneklere hafıza hücrelerinin *in vitro* tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır ancak kemik iliėi ve ikincil lenfoid organlarda da hafıza hücresi olabileceėi unutulmamalıdır. **Bölüm 7**'de gösterildiėi üzere kemik iliėi sadece plazma hücrelerini deėil aynı antijene özgü hafıza B hücrelerini de barındırmakta olup iki hücre tipi birbirinden farklı bir immünglobulin izotip daėılımı sergilemektedir.

Serumdaki HLA antikörleri kemik iliğinde yerleřmiř bulunan plazma hücreleri tarafından üretilmekte olup, aktive oldukları takdirde HLA-spesifik hafıza B hücreleri de HLA antikör üretimine katkıda bulunabilmektedir. Ancak hafıza hücresi ve plazma hücresi kaynaklı HLA antikör spesifiteleri her zaman tamamen örtüřmemektedir. Bu sebeple, alloimmünizasyon geçmiři olan bireylerde serum HLA antikrlarına ek olarak, B hücre kültürü supernatantlarında HLA antikör analizi, potansiyel hümoral alloimmün yanıt hakkında daha kapsamlı bilgi verebilir. **Bölüm 8**, daha önceden en az bir böbrek nakli hikayesi olan ve yeni bir nakle hazırlanan

hastalarda serum ve B hücre kültürü supernatantlarındaki HLA antikor spesifitelerinin doğru bir şekilde karşılatırılmasına yönelik prelininer verileri sunmaktadır.

Organ nakline hazırlanan hastalarda immünolojik risk değerlendirmesi yalnızca serum HLA antikorlarına göre yapılmaktadır ancak bu antikor spesifiteleri hafıza B hücresi kaynaklı HLA antikor spesifitelerinden farklı olabilir. Bir hastanın serumunda HLA antikorunun yokluğu o bireyde grefte karşı yönelmiş B hücre immünitesinin olmadığı anlamına gelmez. Bu sebeple, tekrar nakil bekleyen hastalar, eşlerinden ya da çocuklarından organ nakline hazırlanan kadınlar ve desensitizasyon tedavisi gören hastalar gibi potansiyel olarak HLA-spesifik hafıza hücreleri barındırabilecek olan bireyler bu tez çalışmasında tarif edilen yöntemlerden ek fayda sağlayabilirler.

ABBREVIATIONS

³ H-TdR	³ H-tritiated thymidine
7-AAD	7-aminoactinomycin D
ABMR	Antibody-mediated rejection
ALP	Alkaline phosphatase
APC	Antigen presenting cell
APRIL	A proliferation inducing ligand
ASC	Antibody secreting cells
BAFF	B cell activating factor
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium
BCPF	B cell precursor frequency
BCR	B cell receptor
B-LCL	B-lymphoblastoid cell lines
BMT	Bone marrow transplantation
Bregs	Regulatory B cells
BSA	Bovine serum albumin
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
CDR	Complementarity determining region
CpG	Cytosine-phosphate-guanin
CPM	Counts per minute
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
CV	Coefficient of variation
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSA	Donor-specific antibody
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FBS	Fetal bovine serum
FCM	Flow cytometry
FCS	Fetal calf serum
FDC	Follicular dendritic cells
GC	Germinal center
GvHD	Graft versus host disease
HEV	High endothelial venules
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Horse radish peroxidase
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin

IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s medium
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite
KTR	Kidney transplant recipients
mAb	Monoclonal antibody
MHC	Major histocompatibility complex
MPA	Mycophenolic acid
OD	Optic density
ODN	Oligodeoxynucleotide
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohemagglutinin
PRA	Panel reactive antibody
PVDF	Polyvinylidene fluoride
R848	Resiquimod
RNA	Ribonucleic acid
SAB	Single antigen bead
SCS	Subcapsular sinus
SD	Standard deviation
SFU	Spot forming units
SSC	Side scatter
T _{FH}	Follicular T helper cells
TLR	Toll-like receptor
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
Tregs	Regulatory T cells
TT	Tetanus toxoid

CURRICULUM VITAE

Gonca Emel Karahan was born on the 12th of November 1978 in Istanbul, Turkey. After graduating from Beşiktaş Atatürk Anadolu High School in 1996, she started her studies of Biomedical Sciences in Cerrahpaşa Medical Faculty, Istanbul University.

From her graduation in June 2000 until December 2011, she worked at the diagnostic HLA laboratory of the Department of Medical Biology, Istanbul Medical Faculty. During this period, she received her MSc degree (in 2003) and PhD degree in Medical Biology (in 2010) under supervision of Prof Dr. Mahmut Çarin and Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz on research focused on the detection of HLA antibodies in kidney transplant recipients.

From January 2012 until July 2017 she has worked as a PhD student under supervision of Dr. Sebastiaan Heide and Prof. Dr. Frans Claas at the Department of Immunohematology and Blood Transfusion of the Leiden University Medical Center where the research that is presented in this thesis was carried out. Since July 2017, she is working as a researcher in the same group.

LIST OF PUBLICATIONS

Karahan GE, Seyhun Y, Oguz FS, Kekik C, Onal AE, Yazici H, Turkmen A, Aydin AE, Sever MS, Eldegez U, Carin MN. Impact of HLA on the underlying primary diseases in Turkish patients with end-stage renal disease. *Ren Fail* 2009; 31: 44-9.

Karahan GE, Seyhun Y, Oguz F, Kekik C, Onal E, Caliskan Y, Bakkaloglu H, Yazici H, Turkmen A, Aydin AE, Sever MS, Eldegez U, Carin MN. Anti-HLA antibody profile of Turkish patients with end-stage renal disease. *Transplant Proc* 2009; 41: 3651-4.

Karahan GE, Kekik C, Oguz FS, Onal AE, Bakkaloglu H, Caliskan YK, Yazici H, Turkmen A, Aydin AE, Sever MS, Eldegez U, Carin MN. Association of HLA phenotypes of end-stage renal disease patients preparing for first transplantation with anti-HLA antibody status. *Ren Fail* 2010; 32: 380-3.

Iyibozkurt AC, Kalelioğlu I, Gursoy S, Corbacioglu A, Gurelpolat N, **Karahan GE**, Saygili H, Bengisu E. Evaluation of serum levels of interleukin-10, interleukin-11 and leukemia inhibitory factor in differentiation of eutopic and tubal ectopic pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2010; 37: 217-20.

Ozkok A, Caliskan Y, Sakaci T, Erten G, **Karahan G**, Ozel A, Unsal A, Yildiz A. Osteoprotegerin/RANKL axis and progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 965-73.

Seyhun Y, Ozdilli K, Oguz F, **Karahan G**, Onal E, Turkmen A, Eldegez U, Nane I, Caliskan Y, Bakkaloglu H, Carin M. Human leukocyte antigen and major histocompatibility complex class I-related chain A antibodies after kidney transplantation in Turkish renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2012; 44: 1660-6.

Ozkok A, Kekik C, **Karahan GE**, Sakaci T, Ozel A, Unsal A, Yildiz A. FGF-23 associated with the progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 2013; 14: 241.

Karahan GE, Eikmans M, Anholts JD, Claas FH, Heidt S. Polyclonal B cell activation for accurate analysis of pre-existing antigen-specific memory B cells. *Clin Exp Immunol* 2014; 177: 333-40.

Karahan GE, de Vaal YJ, Roelen DL, Buchli R, Claas FH, Heidt S. Quantification of HLA class II-specific memory B cells in HLA-sensitized individuals. *Hum Immunol* 2015; 76: 129-36.

Karahan GE, Claas FH, Heidt S. Detecting the humoral alloimmune response: we need more than serum antibody screening. *Transplantation* 2015; 99: 908-15.

Chapter 10

Karahan GE, Caliskan Y, Ozdilli K, Kekik C, Bakkaloglu H, Caliskan B, Turkmen A, Sever MS, Oguz FS. High soluble CD30 levels and associated anti-HLA antibodies in patients with failed renal allografts. *Int J Artif Organs* 2017; 39: 547-552.

Karahan GE, Claas FH, Heidt S. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* 2017; 7: 686.

Karahan GE, de Vaal YJH, Krop J, Wehmeier C, Roelen DL, Claas FHJ, Heidt S. A Memory B Cell Crossmatch Assay for Quantification of Donor-Specific Memory B Cells in the Peripheral Blood of HLA-Immunized Individuals. *Am J Transplant* 2017; Mar 30.

