



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Towards HLA epitope matching in clinical transplantation**

Kramer, C.S.M.

### **Citation**

Kramer, C. S. M. (2020, October 1). *Towards HLA epitope matching in clinical transplantation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137182>

Version: 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/1887/137182>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137182> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Kramer, C.S.M.

**Title:** Towards HLA epitope matching in clinical transplantation

**Issue Date:** 2020-10-01

The background is a dark blue gradient. Several thin, gold-colored lines are drawn across the page, creating a complex geometric pattern. These lines form various shapes, including triangles and polygons, and some are parallel to each other. The lines are positioned primarily in the upper and lower portions of the page, framing the central text.

**CHAPTER**

**9**

NEDERLANDSE SAMENVATTING

PUBLICATIONS

CURRICULUM VITAE

DANKWOORD

## **NEDERLANDSE SAMENVATTING**

### **Het immuunsysteem**

Het immuunsysteem beschermt de mens tegen schadelijke ziekteverwekkers (pathogenen) en daarvoor is het van belang dat het onderscheid kan maken tussen lichaamseigen en lichaamsvreemde antigenen. Het verdedigingssysteem doet dit in eerste instantie door middel van de aspecifiek aangeboren immuniteit die effectief en snel het pathogeen vernietigt. Het adaptieve (verworven) immuunsysteem is specifiek maar ook langzamer en bestaat uit antistoffen geproduceerd door B-cellen, de humorale immunreactie, en T-cellen die zorgen voor een cellulair immunreactie. De receptoren op zowel B-cellen als T-cellen moeten eerst een specifiek antigeen herkennen voordat de cellen differentiëren in zowel effector cellen die het pathogeen vernietigen als in langlevende geheugen cellen die een snelle en effectieve reactie kunnen veroorzaken bij nieuwe blootstelling aan hetzelfde antigeen.

### **HLA systeem**

De humane leukocyten antigenen (HLA) spelen een belangrijke rol in het immuunsysteem. Het HLA-systeem bestaat uit HLA klasse I moleculen, HLA-A, -B en -C, en HLA klasse II moleculen, HLA-DR, -DQ, en -DP. HLA klasse I moleculen komen voor op alle cellen behalve rode bloedcellen en presenteren peptiden afkomstig van lichaamsvreemde eiwitten in de cel aan cytotoxische T-cellen (CD8<sup>+</sup>) die vervolgens die cel doodt. HLA klasse II moleculen komen vooral tot expressie op antigeen presenterende cellen (APC) en geactiveerde endotheel cellen. Deze cellen nemen eiwitten op uit de omgeving en de HLA klasse II moleculen en presenteren die als peptiden aan T-helper-cellen (CD4<sup>+</sup>) die vervolgens andere cellen activeren, zoals B-cellen om antistoffen uit te scheiden. Verschillende HLA moleculen presenteren andere peptiden. Er zijn inmiddels heel veel HLA moleculen geïdentificeerd terwijl bij elk individu verschillende, erfelijk bepaald, HLA moleculen op de cellen aanwezig zijn. Deze extreme polymorfisme van HLA zorgt ervoor dat er altijd een individu is dat een peptide van een bepaalde pathogeen kan presenteren waardoor de menselijke populatie altijd beschermd is tegen nieuwe of gemuteerde pathogenen.

### **Allo-immuun reactie in transplantatie**

Waar het HLA polymorfisme voordelig is voor bescherming tegen pathogenen, is het ongunstig voor (orgaan) transplantaties. Al in de jaren 60 bleek dat HLA matchen cruciaal was voor niertransplantatie omdat donor nieren met dezelfde HLA als ontvanger een betere overlevingskans hadden. HLA moleculen van de donor kunnen namelijk worden herkend als lichaamsvreemd door het immuunsysteem van de ontvanger. Zo kunnen T-cellen van de

ontvanger zowel de intacte HLA moleculen op donor APC herkennen, directe herkenning, als peptiden afkomstig van een donor HLA molecuul gepresenteerd in HLA moleculen van ontvanger, indirecte herkenning. Beide reacties induceren immuunreacties die leiden tot acute en chronisch afstotingen. Transplantatie patiënten moeten levenslang afweer onderdrukkende medicijnen nemen en de meerderheid daarvan is dan ook gericht op het onderdrukken van T-cel activatie.

Maar ook de B-cel receptoren op de B-cellen van de ontvanger kunnen de intacte HLA moleculen van de donor herkennen als lichaamsvreemd. Vervolgens gaan de B-cellen HLA-specifieke IgG antistoffen produceren waarbij ze geholpen worden door T-helper-cellen, die peptiden herkennen die afkomstig zijn van het donor HLA molecuul gepresenteerd door HLA klasse II moleculen op de B-cellen van de ontvanger.

Antistoffen specifiek gericht tegen donor HLA gevormd na transplantatie worden donor-specifieke antistoffen (DSA) genoemd. De aanwezigheid van deze DSA is geassocieerd met een verhoogde kans op afstoting van de getransplanteerde nier. Daarnaast zorgen deze DSA ervoor dat het moeilijker is om een geschikte donor te vinden voor een nieuwe transplantatie, omdat de HLA antigenen waartegen de al voor transplantatie antistoffen aanwezig zijn, worden beschouwd als onacceptabel. Dit is nodig om te voorkomen dat een nier na transplantatie meteen wordt afgestoten omdat er antistoffen aanwezig zijn die de donor HLA op het orgaan kunnen herkennen. Deze ongewenste DSA kunnen ook worden gevormd na een zwangerschap of bloedtransfusie. Een bijkomend probleem is dat DSA niet alleen specifiek zijn voor het gemismatchte donor HLA, maar ook kunnen kruisreageren met andere HLA moleculen, die een beetje lijken op het donor HLA.

### **Dit proefschrift**

Ondanks de verbeterde chirurgische technieken en de betere immunosuppressiva is HLA matchen nog steeds essentieel voor niertransplantatie. Maar door de hoge mate van HLA polymorfisme en schaarste van organen is de kans op het vinden van een HLA identieke (gematchte) donor klein. Nu blijkt dat niet elke HLA antigeen verschil (mismatch) een humorale allo-immuunreactie induceert. Ontwikkeling van nieuwe technieken, waarbij de genen die de erfelijke informatie bevatten voor de HLA moleculen in detail worden geanalyseerd, hebben geleid tot een betere kennis over de HLA moleculen. Het is inmiddels duidelijk dat elk HLA molecuul bestaat uit een unieke set van polymorfe aminozuur configuraties, vaak aangeduid als epitopen, maar dat individuele epitopen gedeeld kunnen worden door verschillende HLA

moleculen. Recente studies hebben aangetoond dat het aantal epitooop verschillen tussen donor en ontvanger geassocieerd is met vorming van DSA na transplantatie.

Daarom is het interessant om nieren te alloceren op basis van epitooop matchen in plaats van HLA antigeen matchen om DSA vorming na transplantatie te voorkomen. Hiervoor is het van belang om in kaart te brengen welke epitopen een antistofreactie kunnen veroorzaken. Het blijkt dat een configuratie van een paar aminozuren, ook wel functioneel epitooop genoemd, op het HLA molecuul verantwoordelijk is voor de inductie van antistoffen en ook de specificiteit van het antistof zal bepalen. Het vermogen om een antistof reactie op te wekken wordt immunogeniciteit genoemd. Voor de binding van antistof aan antigeen zijn meerdere aminozuur configuraties betrokken en die bepalen de affiniteit en sterkte van binding. Dit laatste wordt aangeduid als de antigeniciteit van een HLA molecuul. Het complete gebied van antigeen waaraan antistof bindt wordt ook wel B-cel epitooop of structureel epitooop genoemd.

In **hoofdstukken 2 en 3** beschrijven wij verschillende benaderingen die zijn geïntroduceerd om de immunogeniciteit van HLA moleculen te voorspellen en daarmee ook de kans op DSA vorming. Daarnaast beargumenteren wij dat DSA vorming niet enkel afhankelijk is van het aantal gemismatchte epitopen, maar dat de immunogeniciteit van individuele epitopen wellicht nog meer bepalend is (**hoofdstuk 3**). Het verschil tussen immunogeniciteit en antigeniciteit wordt ook uitgelegd (**hoofdstuk 2**). Dit is belangrijk omdat DSA vorming voorkomen kan worden door immunogene aminozuur configuraties, of epitopen, te vermijden tijdens allocatie van organen. Als DSA al gevormd zijn, zoals bij hoog geïmmuniseerde patiënten, is het van belang om de antigeniciteit in kaart te brengen teneinde de onacceptabele en acceptabele configuraties, of epitopen, te bepalen en op basis daarvan geschikte donoren te vinden.

De meeste bestudeerde benadering om de kans op immunisatie te bepalen is op basis van gemismatchte eplets. Eplets zijn theoretisch gedefinieerde configuraties van aan de oppervlakte van het HLA molecuul gelegen polymorfe aminozuren. Van veel van deze eplets moet nog worden vastgesteld of een antistof er inderdaad aan kan binden. Dit kan worden gedaan met behulp van humane monoklonale HLA antistoffen (mAbs). Dit is zeer succesvol gebleken voor de HLA klasse I moleculen maar deze zijn nauwelijks aanwezig voor het in kaart brengen van de relevante polymorfisme op HLA klasse II moleculen. Daarom hebben we een techniek opgezet om HLA klasse II mAbs genereren om zo eplets te verifiëren waaraan een antistof kan binden. In **hoofdstuk 4** gebruiken wij bestaande B-cel hybridoma's om een methode te verifiëren voor het genereren van recombinant humaan HLA mAbs van alle vier de IgG subklassen. Vervolgens hebben wij deze methode gebruikt in **hoofdstuk**

**5** om recombinant humaan HLA-DR-specifieke mAbs te genereren uit geheugen (memory) B-cellen die door middel van HLA-DR tetrameren waren geïsoleerd uit perifeer bloed van zwangerschap geïmmuniseerde individuen. Reactiviteit analyse van deze mAbs hebben geresulteerd in de identificatie van uniek gedeelde aminozuur of aminozuur configuraties op de reactieve HLA allelen. Sommige van de geïdentificeerde configuraties kwamen overeen met bestaande eplets en daarmee bevestigden wij dat een antistof kan binden aan deze eplets. Andere geïdentificeerde configuraties toonden aan dat andere eplets niet helemaal juist waren gedefinieerd.

Een andere manier om de relevante epitopen te definiëren is door de immunogene polymorfe aminozuren te identificeren. In **hoofdstuk 6** beschrijven wij de ontwikkeling van een gebruiksvriendelijke software HLA-EMMA dat aminozuur sequenties van gemismatchte donor HLA allelen vergelijkt met de aminozuur sequenties van dezelfde locus van de ontvanger. HLA-EMMA bepaalt de aminozuur verschillen van zowel de hele sequentie als enkel die posities die gedefinieerd zijn als toegankelijk voor antistof. Naast de verschillen geeft HLA-EMMA ook de soort en positie van de gemismatchte aminozuren.

Aangezien DSA specifiek voor HLA klasse II voornamelijk worden gevormd na transplantatie, wilden wij de meest immunogene HLA klasse II aminozuren identificeren. Hiervoor analyseerde wij in **hoofdstuk 7** niet-geïmmuniseerde mannen die voor het eerst een niertransplantatie hadden ondergaan met minimaal één HLA antigeen mismatch maar die uiteindelijk hun transplantaat verloren als gevolg van immunologisch falen. Met HLA-EMMA bepaalde wij de “solvent accessible” aminozuur verschillen voor HLA-DR en HLA-DQ allelen mismatches. In deze kleine studie zagen wij al voor het aantal gemismatchte HLA-DQ aminozuren een associatie met nieuwgevormde DSA. In tegenstelling tot andere studies, analyseerden wij de HLA-DQ ketens (alfa en bèta keten) afzonderlijk met betrekking tot hun vermogen om een antistofreactie te induceren en toonde aan dat één aminozuur mismatch op de alfa of op de bèta keten al voldoende kan zijn om een antistofreactie te veroorzaken.

Dit bevestigde onze hypothese dat niet alleen het aantal epitoopt mismatches maar ook de immunogeniciteit van de individuele epitopen bijdraagt aan de inductie van HLA antistoffen.

HLA-EMMA en de door ons ontwikkelde humane HLA mAbs zullen beiden bijdragen aan de identificatie van immunogene en daarmee de relevante epitopen die de basis moeten vormen van toekomstige strategieën gebaseerd op epitoopt matchen om zo DSA vorming te voorkomen en om niet onnodig een orgaan af te wijzen op basis van niet-immunogenen epitopen. Aanvullende studies met de recombinant humaan HLA klasse II mAbs zullen zeker



ook meer inzicht geven in de interactie tussen antistof en HLA antigeen. Daarnaast kunnen methodologische studies worden uitgevoerd met de recombinant humaan HLA mAbs vooral omdat we alle vier de IgG subklassen kunnen genereren en dit zal bijdragen aan het begrijpen van de differentiële pathogeniteit van HLA antistoffen die gevormd worden na transplantatie.

In conclusie, dit proefschrift vormt een goede basis voor aanvullende studies die nodig zijn om HLA epitoopt matchen te introduceren in de praktijk.

