



Universiteit
Leiden

The Netherlands

HLA epitopes in kidney transplantation: from basic science to clinical application

Bezstarosti, S.

Citation

Bezstarosti, S. (2023, October 5). *HLA epitopes in kidney transplantation: from basic science to clinical application*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3642858>

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/1887/3642858>

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



Appendices

NEDERLANDSE SAMENVATTING

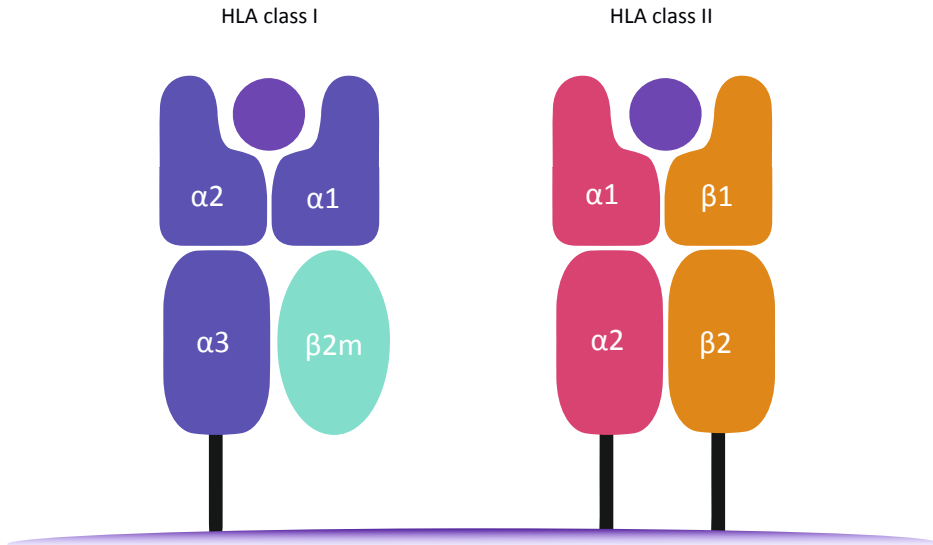
Wereldwijd zijn er meer dan 800 miljoen mensen met een chronische nierziekte. Het hebben van een chronische nierziekte is een enorme belasting voor de patiënt en gaat gepaard met een hoge ziektelast (morbiditeit), en kans op sterfte (mortaliteit). Een deel van de patiënten met een chronische nierziekte heeft uiteindelijk nierfunctie-vervangende therapie nodig, zoals dialyse, of door middel van een transplantatie. Niertransplantatie is de behandeling van voorkeur voor een groot deel van de patiënten, omdat deze behandeling significant betere uitkomsten biedt dan dialyse. Sinds de eerste succesvolle niertransplantatie in 1954 hebben er veel ontwikkelingen plaatsgevonden die de uitkomsten van transplantatie hebben verbeterd, zoals de vooruitgang in chirurgische technieken, en de ontwikkeling van afweer-onderdrukkende medicijnen (immunosuppressiva). Hoewel de vooruitgang in lange-termijn uitkomsten aan het einde van de vorige eeuw in een stroomversnelling is geraakt, (met name door de introductie van calcineurine-remmers zoals tacrolimus) is deze vooruitgang de afgelopen twintig jaar gestagneerd. Dit betekent dat er nog steeds veel patiënten zijn wiens donornier faalt, met name door chronische afstoting door het immuunsysteem.

Het immuunsysteem

Het immuunsysteem is verantwoordelijk voor het bestrijden van infecties met bacteriën, virussen, parasieten en schimmels, en bestaat uit het aangeboren en het verworven immuunsysteem. Het aangeboren immuunsysteem bestaat uit anatomische barrières, oplosbare stoffen en cellen (macrofagen, granulocyten, mestcellen en dendritische cellen) en begint al binnen enkele minuten na de infectie met het vormen van een afweerreactie. Het verworven immuunsysteem, bestaande uit T- en B-cellen en antistoffen, werkt trager, namelijk binnen een aantal dagen. Het is echter effectiever dan het aangeboren systeem omdat het specifiek is, door de aanwezigheid van specifieke receptoren op de T- en B-lymfocyten die antigenen (lichaamsvreemde stoffen) herkennen. De T-cellen zijn verantwoordelijk voor de cellulaire immuniteit: het uitschakelen van geïnfecteerde cellen door cytotoxische T-cellen. De B-cellen zorgen voor de humorale immuniteit: het produceren van antistoffen die zich kunnen hechten aan antigenen om deze te inactiveren en de rest van het immuunsysteem te laten weten dat deze stoffen of cellen opgeruimd moeten worden. Lichaamsvreemde weefsels of cellen worden ook als indringers gezien door het immuunsysteem, en zowel de cellulaire als de humorale immuniteit spelen een rol in afstoting van donororganen.

Het HLA systeem

Het HLA systeem is een cruciaal onderdeel van het immuunsysteem, omdat het het lichaam in staat stelt lichaamsvreemde antigenen te herkennen. Het HLA systeem bestaat uit klasse I en klasse II moleculen, die op hun beurt zijn onderverdeeld in HLA-A, -B en -C (klasse I) en HLA-DR, -DQ en -DP (klasse II) (Figuur 1).



Figuur 1. De structuur van HLA klasse I en HLA klasse II moleculen.

HLA klasse I moleculen bevinden zich op alle kernhoudende cellen in het lichaam en kunnen peptiden (stukjes eiwit) presenteren van eiwitten die aanwezig zijn in de cel, bijvoorbeeld wanneer een cel door een virus is geïnfecteerd. Om gepresenteerd te worden door het HLA-molecuul moet het eiwit eerst in peptiden worden opgeknipt (door het proteasoom). Vervolgens wordt het peptide in het HLA-molecuul geladen en wordt het naar de celmembraan getransporteerd, waar het HLA-peptide complex tot expressie komt aan de oppervlakte van de cel. Vervolgens kan de receptor van een CD8+ T cel met de juiste specificiteit aan het HLA-peptide complex binden, waarna er een proces in gang wordt gezet dat ertoe leidt dat de geïnfecteerde cel wordt geëlimineerd.

HLA klasse II moleculen bevinden zich vooral op professionele antigeen-presenterende cellen, zoals dendritische cellen, macrofagen en B-cellen. Deze cellen kunnen extracellulaire lichaamsvreemde substanties, zoals bijvoorbeeld een bacterie, opvangen en in zich opnemen. Het antigeen wordt wederom in peptiden geknipt door enzymen in de cel. Wanneer het HLA klasse II molecuul met het peptide aan het celoppervlak tot expressie wordt gebracht, kan een CD4+ T-cel met de juiste specificiteit dit complex herkennen, en wordt daardoor geactiveerd. Dit resulteert in de activatie van meerdere immunologische processen waaronder de differentiatie van naïeve T cellen tot effector T-cellen, de activatie van macrofagen tot het lyseren van pathogenen, en het rekruteren van helper T-cellen voor hulp bij de productie van antistoffen.

Het HLA systeem is extreem polymorf; dit betekent dat vrijwel ieder mens een uniek HLA type heeft. De enorme verscheidenheid in HLA typen is gunstig vanuit een evolutionair perspectief, omdat dit de kans vergroot dat in het geval van een epidemie er minstens een aantal leden van de populatie zijn die de infectie effectief kunnen bestrijden. De enorme verscheidenheid in HLA

typen wordt allereerst veroorzaakt door het feit dat het HLA systeem bestaat uit meerdere moleculen die op verschillende plaatsen in het genoom zijn vastgelegd (de verschillende loci: HLA-A, -B, -C, -DR, -DP en -DQ). Ieder mens erft per locus 1 allel van de vader en 1 allel van de moeder als zogenaamde haplotypen. Omdat er voor elke locus duizenden verschillende polymorfismen zijn beschreven, betekent dit dat geen mens hetzelfde HLA type heeft. Hierop is een uitzondering: in het geval van een eeneige tweelingen zal het HLA type wel gelijk zijn.

De afstoting van een donororgaan

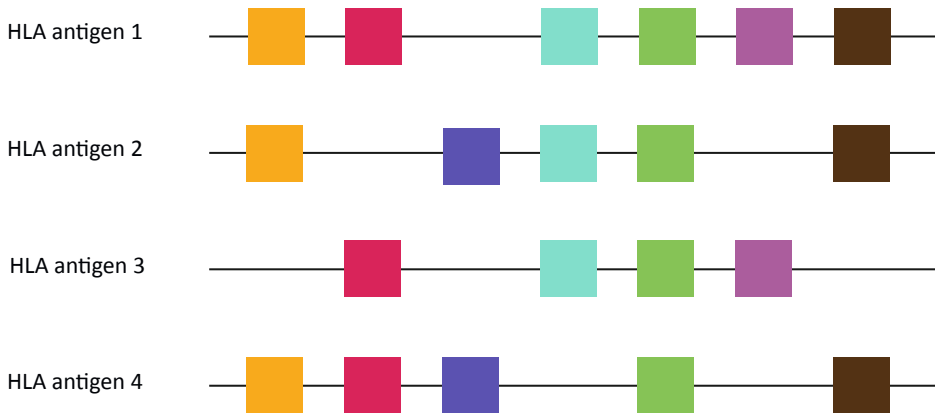
Hoewel de enorme verscheidenheid in HLA typen voor een evolutionair voordeel zorgt, is het een groot obstakel in orgaantransplantatie. Na de transplantatie van een donororgaan kunnen gemismatchte HLA moleculen op het donororgaan worden herkend als lichaamsvreemd door het immuunsysteem van de ontvanger. Dit proces heet alloherkenning en gebeurt op verschillende manieren; de directe, de indirecte en de semi-directe wijze (zie Figuur 2 in **Hoofdstuk 1**). Wanneer de HLA moleculen van de donor worden herkend door het immuunsysteem van de ontvanger zal er zowel een cellulaire als een humorale afweerreactie op gang komen. Een van de belangrijkste componenten hierbij is de productie van donor-specifieke antistoffen (DSA) (zie Figuur 3 in **Hoofdstuk 1**). Dit zijn antilichamen die zijn gericht tegen de HLA moleculen van de donor, en veroorzaken met name chronische afstoting. Antilichamen gericht tegen HLA werden ontdekt in de jaren '50 van de vorige eeuw, in patiënten die eerder bloedtransfusies hadden ondergaan, en bij vrouwen na de zwangerschap. Toen duidelijk werd dat het hebben van reeds gevormde antistoffen tegen HLA ten tijde van een orgaantransplantatie tot onmiddellijke afstoting van het orgaan kon leiden, werd er gestart met het testen op anti-HLA antistoffen bij patiënten die een niertransplantatie zouden ondergaan. Door de introductie van deze zogenaamde kruisproef werd acute afstoting grotendeels voorkomen, en dit fenomeen is tegenwoordig uiterst zeldzaam. Echter, het werd ook duidelijk dat het ontvangen van een donororgaan van een donor met een ander HLA type dan de ontvanger (gemismatchte donor), ook kon leiden tot het vormen van nieuwe anti-HLA antistoffen. Veel studies hebben sindsdien laten zien dat het vormen van deze nieuwe antistoffen geassocieerd is met een slechtere transplantatiefunctie op de lange termijn. Sterker nog, meer dan 50% van het falen van donornieren op de lange termijn wordt toegeschreven aan chronische afstoting door donor-specifieke antistoffen.

HLA epitopen

Om de vorming van nieuwe antistoffen tegen donor-HLA tegen te gaan wordt in transplantatieprogramma's rekening gehouden met matchen op HLA. Eurotransplant, de Europese samenwerking waarin acht landen vertegenwoordigd zijn, matcht op HLA-A, -B en -DR in hun niertransplantatieprogramma. Echter, door het hoge polymorfisme van HLA en de schaarste aan organen ontvangen patiënten vrijwel altijd een donornier met enige vorm van HLA mismatch.

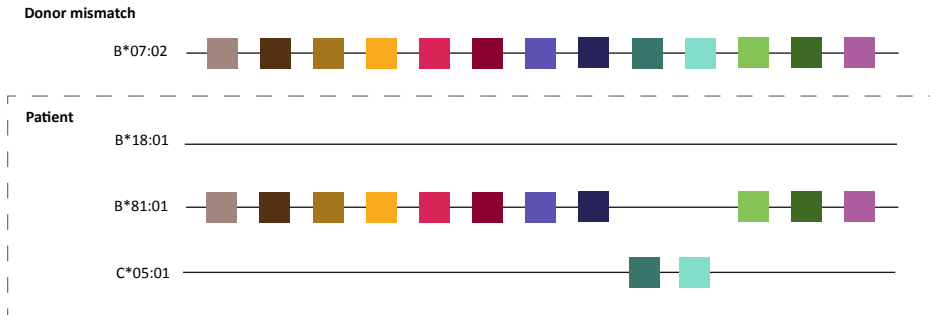
Eiwitten in het lichaam, en dus ook HLA moleculen, zijn opgebouwd uit aminozuren. Deze bouwstenen bestaan in vele verschillende varianten, elk met hun eigen karakteristieken wat betreft lading, grootte en andere eigenschappen. Hoewel er duizenden verschillende HLA antigenen zijn, met elk een unieke aminozuurvolgorde, bestaan HLA moleculen uit combi-

naties van aminozuren die *epitopen* wordt genoemd. Dit wordt geïllustreerd in Figuur 2; de vier getoonde HLA moleculen zijn allemaal uniek. Echter, ze zijn opgebouwd uit individuele epitopen die op meerdere HLA moleculen kunnen voorkomen.



Figuur 2. De gekleurde vierkantjes illustreren de verschillende epitopen van het HLA molecuul. Hoewel elk HLA molecuul bestaat uit een unieke set epitopen, komen de individuele epitopen ook voor op andere HLA moleculen.

Theoretisch gezien betekent dit dat een donornier die HLA mismatches op antigen niveau heeft, geen mismatches hoeft te hebben op epitooop niveau (Figuur 3). Dit is van belang omdat het immuunsysteem uiteindelijk niet het molecuul in zijn geheel herkend, maar slechts een configuratie van aminozuren (de epitooop). In de transplantatiewereld wordt de epitooop ook wel *eplet* genoemd. De aminozuren waaruit het eplet bestaat mogen niet te ver uit elkaar liggen (niet verder dan 3.5 Angstrom), omdat de eplet anders niet in zijn geheel herkend kan worden door een antilichaam. Afgelopen jaren is er veel aandacht geweest voor eplets in transplantatie, omdat het gebruik van kennis over epitopen of eplets zou kunnen leiden tot betere HLA matches in orgaantransplantatie. Meerdere studies hebben de relatie aangetoond tussen HLA mismatches op eplet niveau en het ontstaan van DSA voor grote groepen patiënten. Echter, op dit moment wordt eplet-matchen nog niet toegepast in transplantatieprogramma's, omdat empirisch bewijs voor klinisch relevante eplets op individueel patiënten niveau grotendeels ontbreekt. Met andere woorden, het is nog niet duidelijk welke eplet mismatches zullen leiden tot de vorming van nieuwe DSA en daarmee dus ook tot de chronische afstoting van de donornier. Het feit dat niet iedere eplet mismatch leidt tot de productie van DSA en uiteindelijke afstoting van het orgaan heeft te maken met de verschillende eigenschappen van de aminozuren die de eplet vormen, en of er hulp van T-cellen beschikbaar is om een duurzame immunreactie op te wekken.



Figuur 3. Hoewel er sprake is van een mismatch op HLA molecuul niveau, zijn er geen epitoom mismatches. Dit komt door de gedeelde epitopen van het donor allel en de overige HLA allelen (B*81:01 en C*05:01) van de ontvanger.

IN DIT PROEFSCHRIFT

Het eerste deel van dit proefschrift richt zich op de basale wetenschap van HLA epitopen. In **hoofdstuk 2** worden factoren besproken die bepalen of er een immunoreactie tegen gemismatched HLA optreedt (immunogeniciteit). Hier bespreken we ook de verschillende computerprogramma's die kunnen worden gebruikt om het aantal epitoom of eplet mismatches te berekenen.

Omdat de definities van de verschillende eplets zijn gebaseerd op de verschillen in aminozuurvolgorde per HLA allel, moet er in de praktijk worden getoetst of deze eplets inderdaad kunnen worden herkend door een antilichaam. Experimenteel onderzoek hiernaar wordt antistofverificatie genoemd. Deze kennis is onmisbaar om HLA eplets uiteindelijk in de transplantatiekliniek te kunnen gebruiken, omdat het informatie verschaft over de meest schadelijke eplet mismatches.

In **hoofdstuk 3** wordt de productie van recombinante antilichamen die gericht zijn tegen HLA beschreven. Voor het maken van deze antistoffen hebben we gebruik gemaakt van witte bloedcellen van vrouwen die zijn geïmmuniseerd door zwangerschap. Dit betekent dat er antistoffen in het bloed aanwezig zijn, die gericht zijn tegen het HLA van hun partner. Door HLA-specifieke B-cellen te isoleren, hebben we HLA-specifieke antistoffen kunnen maken via een recombinante techniek. Vervolgens hebben we onderzocht welke HLA allelen er precies herkend worden door deze antilichamen. Hieruit kan afgeleid worden welk eplet of epitoom er precies herkend wordt door een specifiek antilichaam. Door middel van deze methode hebben we meerdere HLA-DQ eplets kunnen verifiëren.

In **hoofdstuk 4** hebben we al het eerdere bewijs voor antistofverificatie van HLA eplets op een rij gezet. Er zijn verschillende methoden om HLA eplets in het laboratorium te verifiëren. De online database die in eerdere onderzoeken vaak werd gebruikt, berust op bewijs uit tientallen

wetenschappelijke artikelen, waarin verschillende verificatie methoden worden gebruikt. Echter, niet elke methode is even goed en betrouwbaar. Om deze reden hebben wij een classificatiesysteem geïntroduceerd, waarmee alle beschikbare data is geïntroduceerd. Op deze manier hebben we een overzicht gemaakt van alle beschikbare data voor de verificatie van eplets, geïntroduceerd volgens de bewijskracht.

In **hoofdstuk 5** wordt een laboratorium techniek beschreven voor de genetische verandering van HLA moleculen, om zo te onderzoeken welk epitoot precies herkend wordt door een HLA-specifiek antilichaam. In dit geval werd op een specifieke plaats van het HLA molecuul een aminozuur vervangen door een ander aminozuur (mutatie). Vervolgens werd er gekeken of de HLA-specifieke antistof nog steeds aan het gemuteerde HLA-molecuul bond, of niet. Met deze methode hebben we kunnen afleiden welk aminozuur op het HLA molecuul cruciaal is voor het binden van dit specifieke antilichaam.

Het tweede deel van dit proefschrift beschrijft een aantal klinische toepassingen van HLA epitopen in de transplantatiekliniek. In de afgelopen jaren zijn er veel studies verschenen waarin HLA eplets in niertransplantatie worden onderzocht. Helaas zijn deze studies vaak moeilijk met elkaar te vergelijken omdat de definities van de gebruikte eplets in de loop der tijd nogal eens zijn veranderd. Dit probleem kan worden opgelost door aminozuurmismatches te onderzoeken in plaats van eplets, aangezien de aminozuurvolgorde van HLA allelen niet veranderd, in tegenstelling tot eplet definities. In **hoofdstuk 6** gebruiken we deze methode om de HLA aminozuurmismatches van een groot cohort niertransplantatiepatiënten in kaart te brengen. Deze studie toont aan dat niet alleen HLA eplet, maar ook HLA aminozuurmismatches geassocieerd zijn met DSA formatie, en mogelijk gebruikt kunnen worden om het immunologisch risico van een transplantatiepatiënt in te kunnen schatten. Het inschatten van dit risico is erg belangrijk, aangezien er dan ook mogelijkheden zullen ontstaan patiënten een op maat gemaakte behandeling met afweeronderdrukkende medicijnen te bieden. Momenteel onderkennen veel patiënten namelijk ernstige bijwerkingen van immunosuppressiva, waaronder een verhoogd risico op infecties, kanker en cardiovasculaire aandoeningen. Bovendien is het meest gebruikte immunosuppressieve middel, tacrolimus, ook nog eens toxisch voor de nieren, en kan dus bijdragen aan een verminderde transplantaatfunctie. Wanneer we het immunologisch risico van patiënten beter kunnen inschatten, kunnen patiënten die worden geïntroduceerd als laag-risico, wellicht behandeld worden met een lagere dosering immunosuppressiva, waardoor er minder kans is op bijwerkingen.

Een behandeling met celtherapie is een van de methodes waarvan wordt onderzocht of het kan bijdragen aan het verminderen van het gebruik van immunosuppressiva. Het toedienen van cellen die het immuunsysteem kunnen beïnvloeden, zoals mesenchymale stromale cellen (MSC) of regulatoire T-cellen, leidt tot een immunologisch toleranter milieu in het lichaam. In theorie betekent dit dat er minder immunosuppressie nodig is om afstoting van het donor-organ te voorkomen. Een van de studies die deze behandeling in klinische transplantatiepatiënten heeft onderzocht is de Triton studie. In deze gerandomiseerde klinische trial werden

patiënten behandeld met autologe MSC. Dit zijn stamcellen die uit het eigen lichaam afkomstig zijn. Vervolgens werd na een aantal weken de tacrolimus afgebouwd en vervolgens helemaal gestopt, waarna deze patiënten alleen nog met prednison en everolimus werden behandeld. Hoewel de studie liet zien dat deze behandeling veilig is en niet tot meer afstoting leidt dan in de controlegroep, ontwikkelde een deel van de patiënten DSA. In **hoofdstuk 7** beschrijven we dat analyse van de hoeveelheid eplet mismatches zou hebben geholpen bij het identificeren van patiënten met een laag immunologisch risico. Deze patiënten hebben dus baat bij celtherapie en het afbouwen van tacrolimus, zonder dat er sprake is van een verhoogd risico op de vorming van DSA.

In de meeste studies naar celtherapie met MSC worden autologe cellen gebruikt. Dit zijn cellen die afkomstig zijn uit de patiënt zelf, en hebben als voordeel dat het lichaam geen afweerreactie tegen deze cellen zal opwekken. Het nadeel is dat het ingewikkeld is om deze cellen te verkrijgen en voor te bereiden zodat ze geschikt zijn voor toediening in het lichaam. Daarom wordt er ook onderzoek gedaan naar het gebruik van allogene MSC; dit zijn cellen van een donor. De donor kan dezelfde donor zijn als de nierdonor, of een derde partij. Het voordeel van een derde partij donor is dat deze cellen al van tevoren geoogst kunnen worden en als voorraad beschikbaar kunnen zijn in het ziekenhuis. In **hoofdstuk 8** beschrijven we twee studies naar allogene MSC; een studie uit Leiden en uit Luik (België). In de Leidse studie werd de MSC donor op een specifieke manier gekozen, zodat er geen herhaalde mismatch was tussen de nierdonor en de ontvanger, en tussen de MSC donor en de ontvanger. Zou dit namelijk wel het geval zijn, dan zouden er in theorie antistoffen tegen het HLA van de MSC donor kunnen ontstaan, die vervolgens ook gericht zijn tegen het HLA van de nierdonor, waardoor er afstoting van de nier zou kunnen ontstaan. In de studie uit Luik waren er niet zulke specifieke voorwaarden aan de MSC donor. In **hoofdstuk 8** hebben we geanalyseerd of het specifiek selecteren van MSC donoren zonder “herhaalde mismatches”, een relatie had met de vorming van DSA. De studie toonde aan dat er een zeer laag risico is op het ontwikkelen van antistoffen die worden opgewekt door de MSC donor en die vervolgens ook tegen de nierdonor gericht zijn. Dit betekent dat het waarschijnlijk niet nodig is om specifieke MSC donoren zonder herhaalde mismatches te selecteren. Dit is gunstig voor de toekomst van ‘off-the-shelf’ cellulaire producten voor toepassing in de transplantatiekliniek.

CONCLUSIE

Er zijn verschillende toepassingen van epitoopt-matches in transplantatie, waaronder 1) de allocatie van organen in transplantatieprogramma’s voor overleden donoren, 2) optimale selectie van levende donoren, 3) het vinden van een juiste match voor patiënten met veel donor-specifieke antistoffen en 4) het inschatten van het immunologisch risico ten behoeve van een op maat gemaakte immunosuppressieve behandeling na transplantatie. Voordat al deze toepassingen hun weg naar de klinische praktijk zullen vinden, zal er meer wetenschappelijk bewijs voor klinisch relevante eplets in transplantatie moeten komen. Dit kan vergaard worden in het laboratorium door middel van antistof-verificatie, maar ook door middel van mutatie-

studies en visualisatie van de interactie tussen het antilichaam en het HLA molecuul. Ook is het van belang dat de rol van T-cel epitopen verder onderzocht wordt. Bovendien is het cruciaal dat er meer klinisch onderzoek gedaan zal worden in etnisch diverse populaties, aangezien HLA typen sterk geassocieerd zijn met etniciteit.

Hoewel er nog veel uitdagingen voor ons liggen, kan eplet-analyse nu al waardevol zijn, met name in risico analyse na transplantatie. Door het immunologische risico van patiënten beter te kunnen inschatten door middel van eplet-analyse kan behandeling met immunosuppressiva beter worden afgestemd op de patiënt, en kan een inschatting worden gemaakt welke patiënten het beste in aanmerking komen voor behandeling met nieuwe therapieën zoals MSC.