



Samenvatting proefschrift G.E. Karahan

“HLA-specific memory B cells: the missing link?”

**Promotie: 2 november 2017
Universiteit Leiden**

Promotor:
Prof. dr. F.H.J. Claas

Copromotor:
Dr. S. Heidt

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 celweek 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 celweek 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 desensitatie behandelingen ondergaan, mogelijk voordeel kunnen ondervinden van de assays die beschreven staan in dit proefschrift.