



*SUMMER SCHOOL
AIBT
Ercolano
13-15 giugno 2019*

HLA vs EPITOPE MATCHING NEL TRAPIANTO ALLOGENICO (CSE/ORGANI)

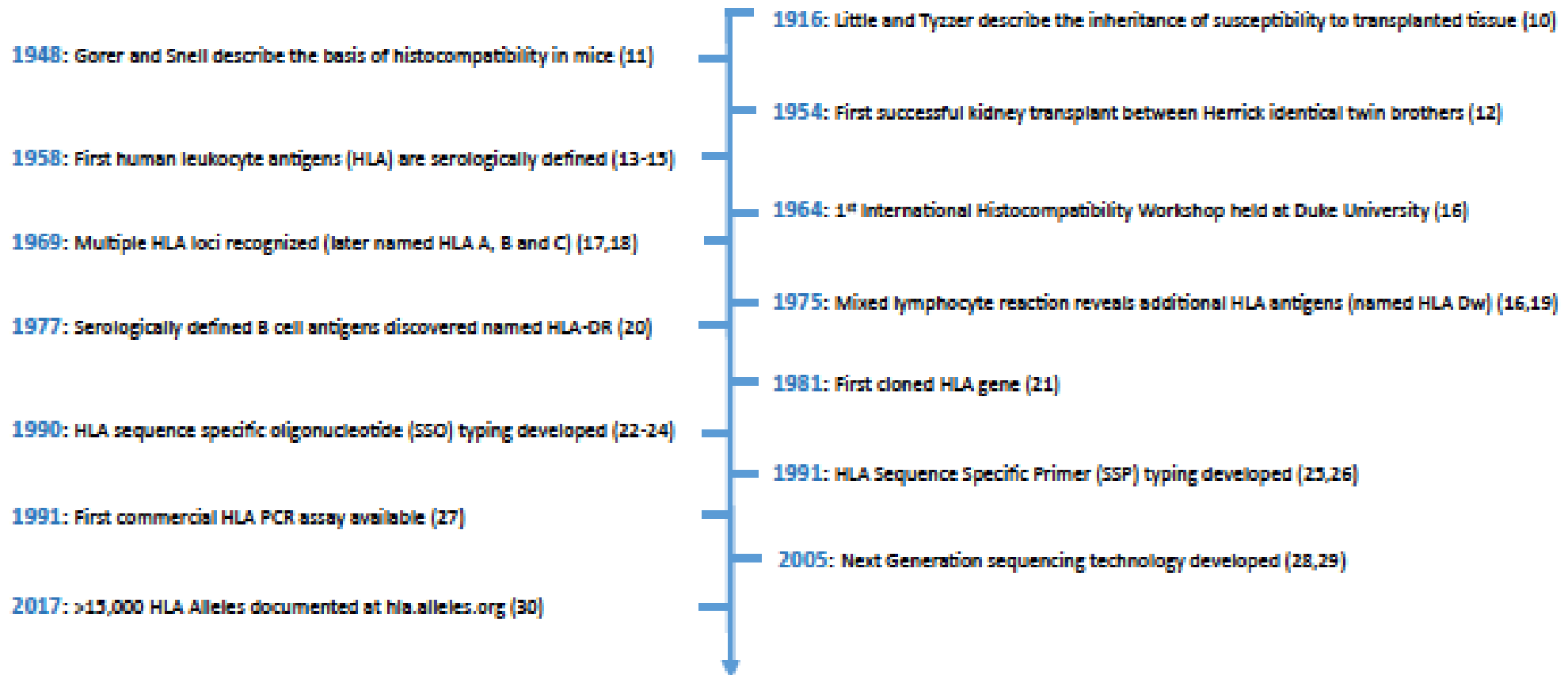
Dr.ssa Paola Zanelli

Immunogenetica Unica Regionale del Trapianto di Rene
Regione Emilia-Romagna
S.S.D. Immunogenetica dei Trapianti
Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma

Sommario

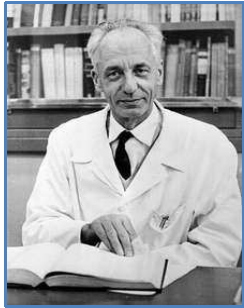
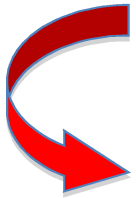
- Un po' di storia
- Match HLA e trapianto renale
- Match HLA e trapianto di CSE
- Epitopi ed antigeni
- “Tools for Epitope Matching”

Il lungo cammino dell'HLA



Entrando un po' nei dettagli...

- **1958**. Vengono identificati i primi antigeni umani di istocompatibilità analizzando i pattern di agglutinazione di globuli bianchi messi a contatto con sieri di pazienti politrasfusi o di donne multigravide.



Daussett J.
Iso-leuco-anticorps.
Acta Haematol. 1958;20:156-166

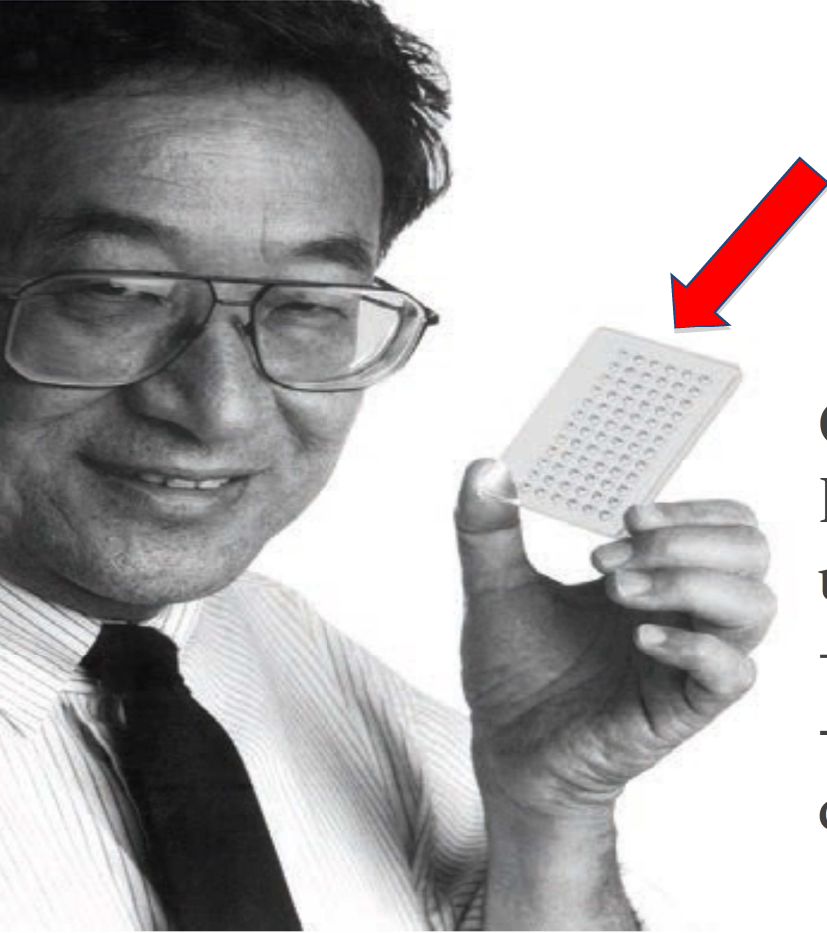
Questi Ag verranno in seguito chiamati Antigeni Leucocitari umani (HLA)

- **1966 -1969**. Vengono identificati altri gruppi di Ag: HLA-B e HLA-C
- **1975**. Mediante le colture miste linfocitarie viene identificato un distinto pattern di reattività degli Ag HLA, diverso dai precedenti; questi Ag vennero chiamati HLA-D; l'analisi di antisieri che reagivano con Ag presenti sui linfociti B e non sui linfociti T permise di identificare Ag strettamente legati ai determinati antigenici rivelati dalle colture miste linfocitarie, che vennero quindi chiamati D "related" o DR

Dopo aver ricordato il Prof. Dausset, per dovere di scuola un ricordo del Prof. Ruggero Ceppellini :



Che è stato maestro dei miei maestri, Mario Savi, Tauro M.Neri e, per ricordare anche chi non c'è più, Pier Luigi Mattiuz, e a cui dobbiamo la comprensione che gli Ag HLA erano il prodotto di geni strettamente linked tra di loro e per cui coniò durante il “3° International HLA Workshop” svoltosi a Torino nel 1967, il termine di “**aplotipo**”.



Allora la tipizzazione HLA era sierologica, mediante citotossicità complemento dipendente (CDC) :

CDC era stata messa a punto nel 1964 dal Dr. Paul I. Terasaki (1929 -2016) ed è tutt'ora usata (*sempre meno*) per :

- tipizzazione HLA sierologica
- ricerca ed identificazione di Ab anti HLA contro pannello linfocitario



QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTIBODY AND COMPLEMENT
DIRECTED AGAINST LYMPHOCYTES¹

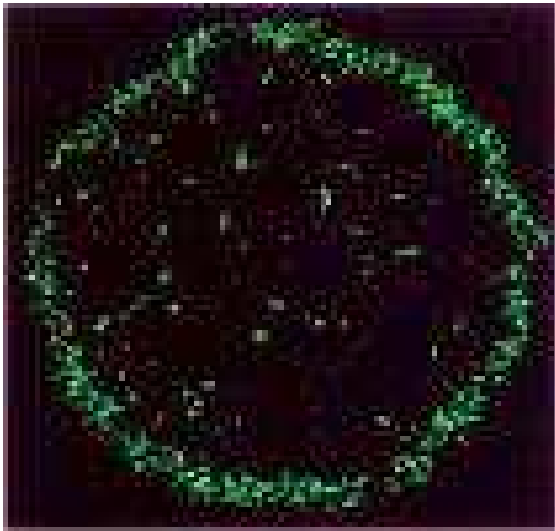
PAUL I. TERASAKI AND NORMAN E. RICH

From the Department of Surgery, UCLA Center for the Health Sciences, Los Angeles 24, California

Received for publication July 12, 1962

J Immunol 1964; 92:128-138;

CDC:
REAZIONE NEGATIVA



CDC:
REAZIONE POSITIVA



Se ben ricordiamo già allora ci rendevamo conto che esisteva una significativa
cross reattività tra gli Ag HLA

1981 : entriamo nell'era moderna

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 78, No. 1, pp. 616–620, January 1981
Medical Sciences

Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligodeoxynucleotide primer

(dideoxynucleoside triphosphate-terminated cDNA synthesis)

ASHWANI K. SOOD, DENNIS PEREIRA, AND SHERMAN M. WEISSMAN

Department of Human Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510

Communicated by Aaron B. Lerner, September 15, 1980

Viene riportata per la prima volta la sequenza di un gene HLA, iniziando così l'era della **tipizzazione molecolare**: la tipizzazione non è più basata sul pattern di reazione sierologico dei leucociti, ma sulla sequenza degli Ag HLA.

Cambiano le metodiche, cambia la nomenclatura

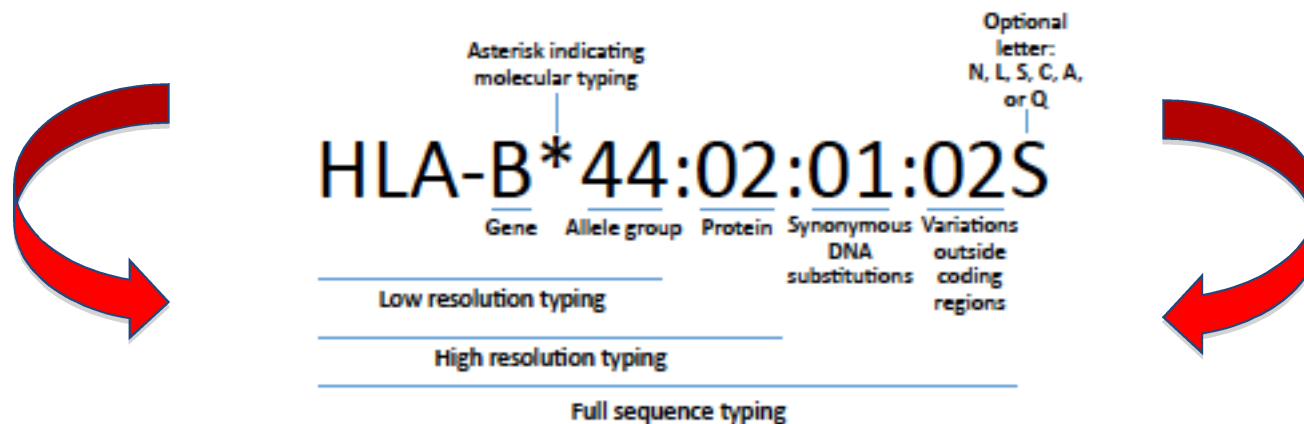
Già con le tecniche sierologiche avevamo compreso che i pattern di reazione sierologica di alcuni Ag sierologicamente definiti, erano in realtà riconducibili a più specifici sottotipi:

↳ la specificità sierologica A₉, ad es. veniva suddivisa in due “sottotipi” A₂₃ e A₂₄, dove :

A₉ è l'Ag BROAD

A₂₃ e A₂₄ sono i suoi SPLIT, espressi come : A₂₃(9) o A₂₄(9)

Con l'introduzione delle tecniche di tipizzazione molecolare la nomenclatura ha dovuto evolvere, per rendere ragione di proteine che appartengono alla stessa classe sierologica, ma differiscono nella loro sequenza aminoacidica o genica.



Perché esistiamo : il dogma dell'immunologia dei trapianti

Mismatch HLA tra donatore e ricevente determinano una risposta alloreattiva mediata sia linfociti B che da linfociti T responsabile del fallimento del trapianto dopo trapianto di organi solidi o GVHD dopo trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) .

E questo si mantiene vero, come vedremo, non ostante i progressi delle terapie immunosoppressive.

Il nostro scopo è quello di contenere questa risposta alloreattiva T e B mediata nei confronti dei mismatches HLA ed uno dei metodi più potenti per farlo è ridurre al massimo i mismatches tra donatore e ricevente.

I criteri di match HLA per i trapianti di CSE sono tutt'ora molto stringenti (match 10/10 > 9/10), mentre le maglie sono molto più larghe per quello che riguarda i trapianti di organi solidi

Ma tanto lavoro solo per contare i mismatch?

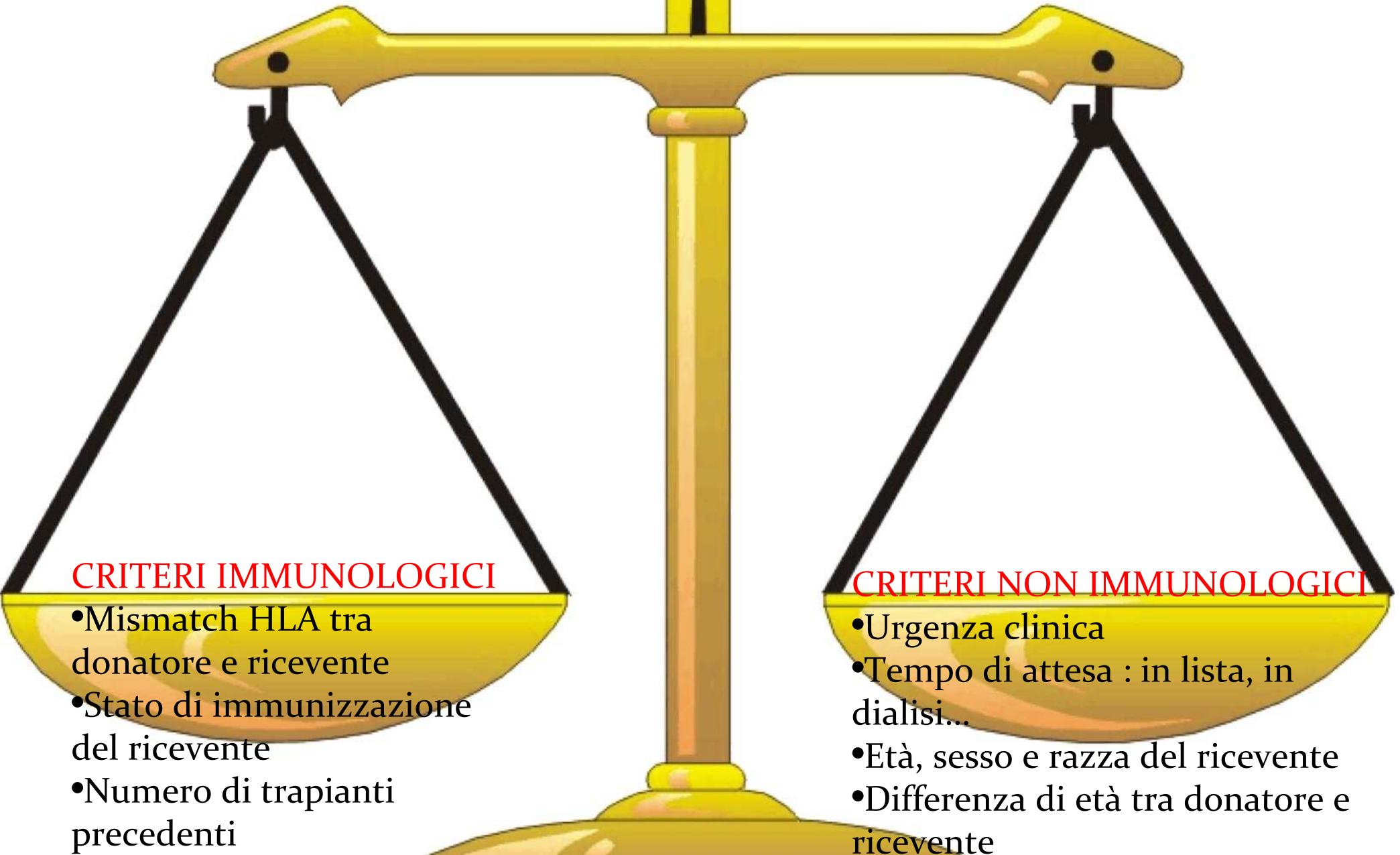


Quello che davvero dovrebbe essere il nostro lavoro sarebbe cercare di definire il potenziale immunogeno di ciascun mismatch.

Esistono **mismatch ad alto rischio o non permissivi** che determinano una reazione clinica severa ed altri che determinano una reazione alloreattiva quasi nulla, detti per questo **permissivi**.

Identificare i mismatch permissivi permette di ridurre l'alloreattività T e B mediata e quindi di migliorare l'outcome del trapianto

GENERALMENTE GLI ALGORITMI DI ALLOCAZIONE BILANCIANO



IL MATCH HLA

Sebbene gli Ag HLA siano i primi allo – antigeni riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite nei trapianti ABO compatibili, il ruolo del match HLA nella sopravvivenza del trapianto è sempre stato controverso.



Ancora un po' di storia.....

- Quando si tipizzava solo per Classe I il match HLA sembrava avere un ruolo positivo solo nei trapianti da donatore vivente, ma non da cadavere (*Terasaki et al. Transplantation 4: 688-699; 1966*)
- Con l'estensione della tipizzazione anche agli Ag di Classe II l'effetto è stato notato anche per i trapianti da donatore cadavere (*Kissmeyer-Nielsen et al. - Mickey et al. Tissue Antigens 1: 53-56 e 57-67; 1971*)

Per un po' abbiamo vissuto bene, ma poi è arrivata la ciclosporina.....

E per qualche tempo è sembrato che i nostri Laboratori potessero quasi chiudere

Diminishing Significance of HLA Matching in Kidney Transplantation

Xuanming Su^a, Stefanos A. Zenios^a,
Harini Chakkerab, Edgar L. Milford^c
and Glenn M. Chertow^{b,*}

La conclusione degli AA. è molto semplice :

- ✓ Se la terapia immunosoppressiva ha avuto progressi tali da poter trapiantare, con pressochè uguali possibilità di successo, organi anche scarsamente compatibili, è giunto il momento di eliminare la tipizzazione HLA dagli algoritmi di allocazione.
- ✓ Allo stesso modo anche gli sforzi volti ad allargare il pool dei donatori per offrire organi con buoni livelli di match HLA sono da considerare inutili

Meno male che c'è Opelz...

Di fronte all'accanimento terapeutico contro il match HLA (*forse perché criterio troppo oggettivo per usarlo in un programma di allocazione*) periodicamente da Heidelberg il Prof. Gerhard Opelz con tedesca costanza controlla la sopravvivenza dei trapianti nei diversi scenari clinico-politici.



2007

Analisi dell'impatto del match HLA sulla sopravvivenza del trapianto durante due decenni :
1985 -1994 e 1995 -2004 sui dati del Collaborative Transplant Study (135.970 casi da 363 Centri Trapianto di 41 paesi)
Ulteriore analisi ristretta al quinquennio 2000-2004

SPECIAL FEATURE

Effect of Human Leukocyte Antigen Compatibility on Kidney Graft Survival: Comparative Analysis of Two Decades

Gerhard Opelz and Bernd Döhler

Background. Based on an analysis of United Network for Organ Sharing data, it was reported that the influence of human leukocyte antigen (HLA) matching in renal transplantation has diminished in recent years, prompting the suggestion that donor kidney allocation algorithms should be revised.

Methods. We compared the impact of HLA matching on kidney graft survival during the decades 1985–1994 and 1995–2004 using the data of the Collaborative Transplant Study. Results for the last 5 years (2000–2004) were analysed separately in addition. Multivariate Cox regression analysis was used to account for the influence of confounders.

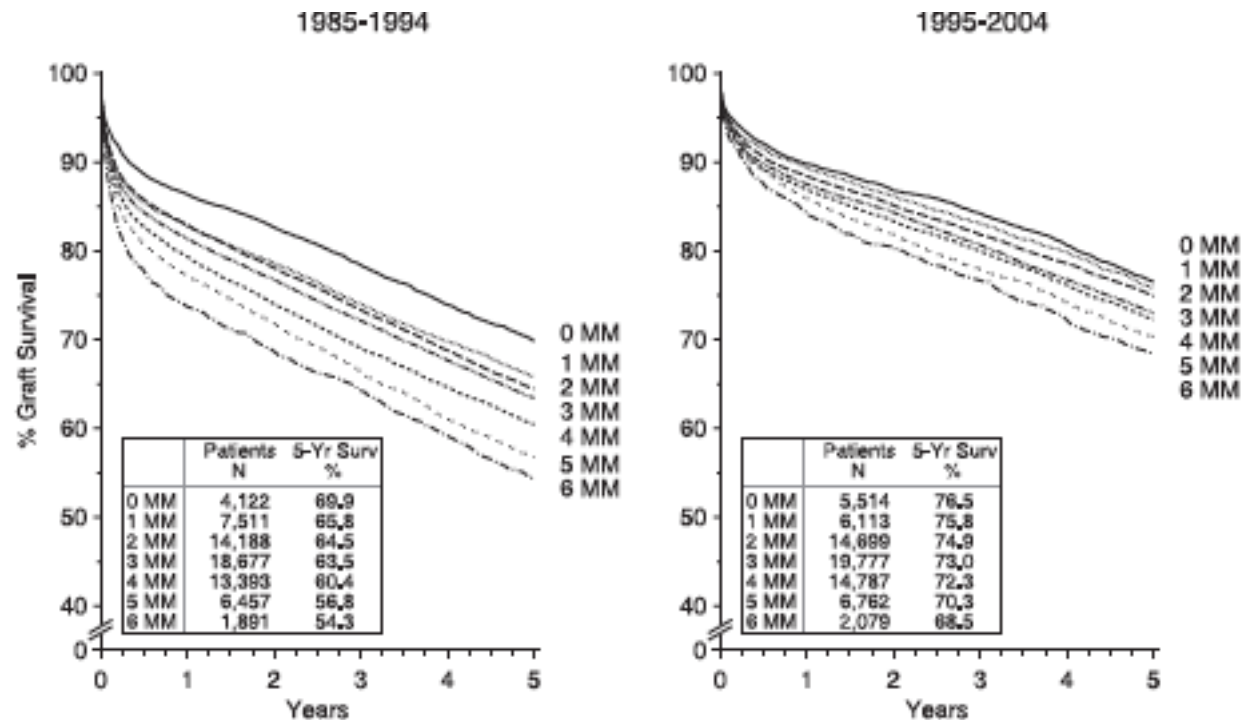
Results. Our results show that, while graft survival rates have improved overall over time, the relative impact of HLA matching on the graft survival rate has remained strong and highly significant. Both the need for posttransplant rejection treatment and the graft survival rates showed statistically highly significant associations with HLA matching regardless of the interval analysed ($P < 0.001$).

Conclusions. We conclude that HLA mismatches significantly influence the outcome of kidney transplants and that kidney exchange programs for the purpose of achieving better HLA matches continue to be meaningful.

Keywords: HLA matching, Kidney transplant, Graft survival, Graft rejection.

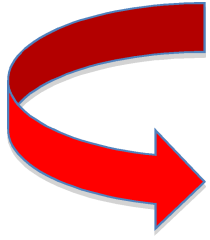
(Transplantation 2007;84: 137–143)

La sopravvivenza del trapianto è migliorata durante le due decadi esaminate, ma l'impatto relativo del match antigenico HLA è rimasto forte ed altamente significativo anche riguardo la minor incidenza di episodi di rigetto ($P < 0.001$)



Gli A.A. concludevano che il numero dei mismatch HLA influenza significativamente la sopravvivenza del trapianto e che era tutt'ora saggio aumentare il pool dei donatori per ottenere il maggior numero di match HLA

Ed infine, un importante effetto collaterale del match HLA :



Another advantage of HLA matching that often receives insufficient attention is the reduced likelihood that patients form HLA antibodies after graft rejection if the graft was well matched. Although agreement in the literature is not uniform (13), the weight of the available evidence suggests that patients with well-matched first grafts produce HLA antibodies at a lower rate than recipients with poorly matched first transplants, and that as a result the likelihood of successful retransplantation is higher if the failed first transplant was from an HLA well-matched donor (14, 15).



A Lifetime Versus a Graft Life Approach Redefines the Importance of HLA Matching in Kidney Transplant Patients

Herwig-Ulf Meier-Kriesche,^{1,4} Juan C. Scornik,² Brian Susskind,³ Shehzad Rehman,¹ and Jesse D. Schold¹

Introduction. Human leukocyte antigen (HLA) matching has been de-emphasized in the allocation of renal allografts and further discounting is planned in the new United Network of Organ Sharing kidney allocation model. An unforeseen consequence of poorer matching could be increased sensitization for candidates pursuing retransplantation.

Methods. We examined candidates listed in the United States from 1988 to 2007 from the Scientific Renal Transplant Registry (SRTR) database that were relisted after loss of a primary kidney transplant ($n = 15,980$). The primary outcome was change in panel reactive antibody (PRA) from prior to recipient's initial transplant to the subsequent listing. Absolute change in PRA levels were examined in general linear models and the likelihood of becoming newly sensitized in logistic models.

Results. There was no appreciable change in PRA for patients receiving a first 0 HLA-A, -B, -DR, or 0 HLA-A, -B-mismatched kidney transplant; contrariwise, there was a significant increase in PRA by increasing HLA mismatch of the first transplant. Only 10% of patients became sensitized after a 0 HLA-A, -B-mismatched transplant, whereas the proportion rose up to 37% with increasing HLA mismatches. Other factors, notably younger age and African American race, also contributed to a higher PRA at relisting.

Conclusions. Although there might be a limited impact of HLA matching on acute rejection and graft survival, many patients might be negatively impacted from poor HLA matching of their first kidney transplant when needing a second transplant. This might be particularly important in patients with a long life expectancy because of the high likelihood of needing a second transplant during their lifetime.

Keywords: HLA matching, Sensitization, Retransplantation.

(*Transplantation* 2009;88: 23–29)

IL NUMERO DI
MISMATCH HLA
DEL I° TP E' IL
MAGGIOR
FATTORE DI
RISCHIO PER
AUMENTO DEL
PRA AL
MOMENTO DEL
RINSERIMENTO
IN LISTA



TABLE 2. Least-squared mean levels of changes in PRA level from initial transplant to relisting

Explanatory factor	Level	Adjusted mean % change in PRA	P ^a
Donor type	Deceased Donor	14.5	0.01
	Living Donor	16.4	
Recipient age (yr)	0–11	21.9	<0.001
	12–17	21.9	
	18–34	16.0	
	35–54	13.1	
	55–64	9.1	
	65+	10.5	
Recipient race	African American	18.3	<0.001
	Other	14.1	
	White	13.9	
Donor age (yr)	0–17	17.5	<0.001
	18–49	16.8	
	50–59	14.7	
	60+	12.6	
Donor race	African American	14.1	0.003
	Other	15.1	
	Caucasian	17.0	
Candidate gender	Female	12.4	<0.001
	Male	18.4	
Time to relisting (mo)	0–24	12.2	<0.001
	25–60	18.8	
	61–96	15.6	
	97+	15.1	
Primary diagnosis	GN	15.5	0.07
	Secondary GN/Vasculitis	14.3	
	Polycystic disease	18.7	
	Other congenital disorders	15.2	
	Diabetes	16.1	
	Interstitial nephritis	12.7	
	Neoplasms/tumors	13.3	
	Other	16.9	
	Hypertension	16.1	
Candidate BMI	Missing	15.3	0.21
	<20	15.1	
	20–24	13.9	
	25–29	15.3	
	30–34	15.5	
	35+	17.4	
Total HLA-A, -B, -DR mismatches	0	0.8	<0.001
	1	9.0	
	2	15.9	
	3	18.9	
	4	19.0	
	5	22.7	
	6	21.7	

^a Type-III significance level of factor from multivariate linear regression model.

GN, glomerulonephritis; HLA, human leukocyte antigen; BMI, body mass index; PRA, panel reactive antibody.

Ed ancora Opelz ritorna, a distanza di 10 anni:

OPEN

The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors

Robert C. Williams, PhD,¹ Gerhard Opelz, MD,² Chelsea J. McGarvey, MD,³ E. Jennifer Weil, MD,¹ and Harini A. Chakkera, MD⁴

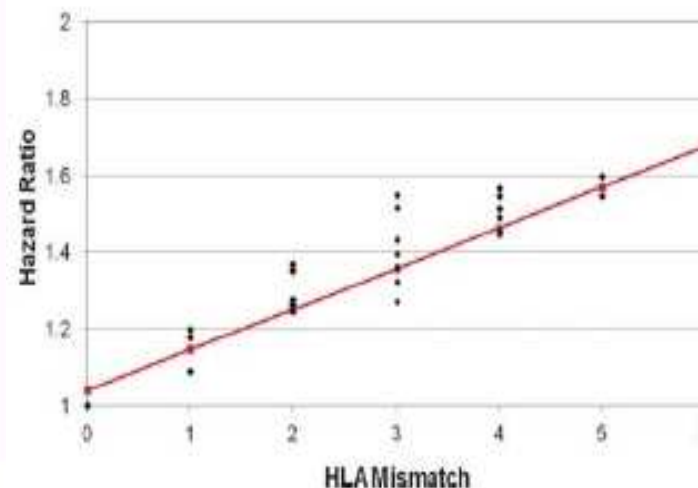
Transplantation ■ May 2016 ■ Volume 100 ■ Number 5

N = 189,141
994,557 anni di
sopravvivenza

Background. Since the beginning of the technology, there has been active debate about the role of human leucocyte antigen (HLA) matching in kidney allograft survival. Recent studies have reported diminishing importance of HLA matching, which have, in turn, been challenged by reports that suggest the continuing importance of these loci. Given the controversies, we examined the effect of HLA compatibility on kidney allograft survival by studying all first adult kidney transplants in the United States from a deceased donor. **Methods.** Using the United Network for Organ Sharing data, we identified first deceased donor kidney transplants between October 1, 1987, and December 31, 2013. Recipients were classified by their number of HLA mismatches. Cox multivariate regression analyses adjusting for recipient and donor transplant characteristics were performed to determine the impact of HLA compatibility on kidney allograft survival. **Results.** Study cohort included 189,141 first adult kidney alone transplants, with a total of 994,558 years of kidney allograft follow-up time. Analyses adjusted for recipient and donor characteristics demonstrated a 13% higher risk (hazard ratio, 1.13; 95% confidence interval, 1.06-1.21) with 1 mismatch and a 64% higher risk (hazard ratio, 1.64, 95% confidence interval, 1.56-1.73) with 6 mismatches. Dividing the mismatch categories into 27 ordered permutations, and testing their 57 within mismatch category differences, demonstrated that all but 1 were equal, independent of locus. **Conclusions.** A significant linear relationship of hazard ratios was associated with HLA mismatch and affects allograft survival even during the recent periods of increasing success in renal transplantation.

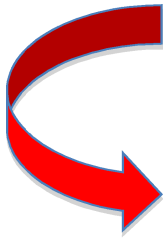
(Transplantation 2016;100: 1094-1102)

Hazard Ratio for First Kidney Failure Time as a Function of HLA Mismatch Permutations in the Full Cox Model. Deceased Donors.
N = 189,141



Un *hazard ratio* lineare suggerisce che:

- ✓ L'effetto del match HLA si mantiene forte ed è additivo
- ✓ Ogni mismatch ha lo stesso effetto nel ridurre la sopravvivenza del trapianto indipendentemente dal locus e l'effetto è additivo



Osservazione a latere:

- ✓ Tra le variabili non HLA che influenzano l'outcome del trapianto importante effetto dell'età del donatore e del ricevente

Perché il match HLA fa bene al trapianto

- ✓ La principale causa di perdita del trapianto a lungo termine è la risposta umorale alloreattiva e i mismatches HLA sono associati ad un aumentato rischio di produzione di anticorpi anti HLA donatore specifici, DSA, i più frequenti dei quali sono quelli rivolti contro gli Ag DQB1.
- ✓ La presenza di DSA è associata a ridotta sopravvivenza del trapianto ed aumentato rischio di sensibilizzazione.

Abbiamo a disposizione metodi sensibili ed accurati per evidenziare la presenza di DSA ed in generale di Ab anti HLA ed è possibile, sulla base delle frequenze degli Ag HLA nella popolazione calcolare la percentuale di reattività del singolo paziente contro un pool di donatori (*cPRA e virtual crossmatch*)

MA

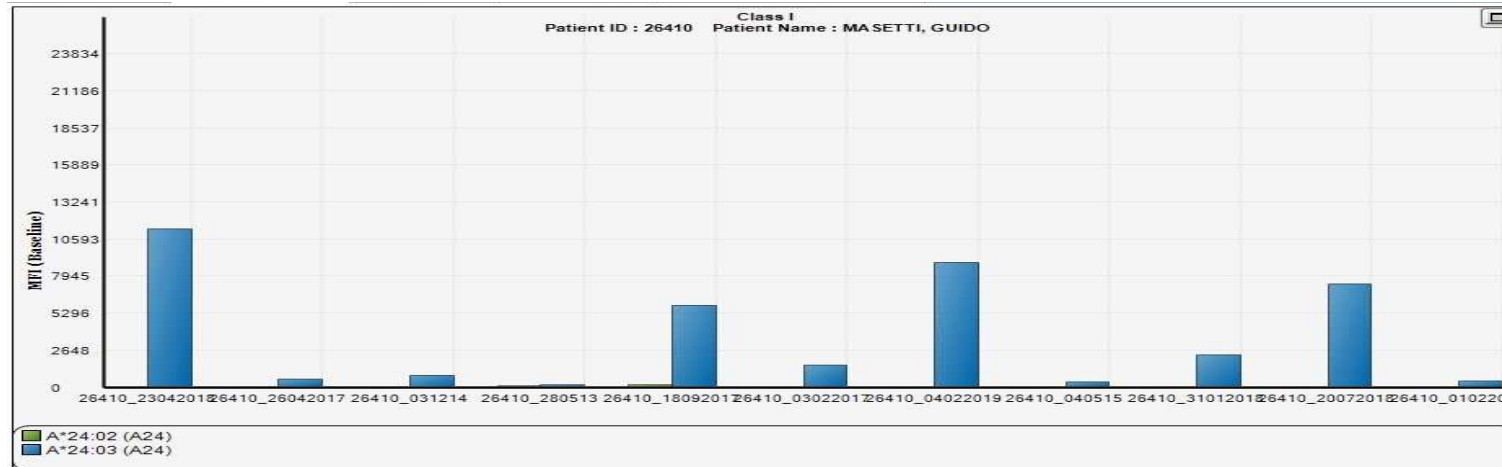
esiste tutt'ora una sproporzione tra il livello di risoluzione della tipizzazione HLA utilizzata per pazienti e donatori ed il grado di risoluzione della specificità degli Ab

Il challenge della risoluzione

La tipizzazione a bassa risoluzione è una semplificazione della complessità del sistema HLA e non fornisce sufficiente dettaglio per un adeguato match, specie per pazienti immunizzati.

Se siamo in grado di determinare Ab a 4 digit di risoluzione, dovremmo tipizzare almeno allo stesso livello i nostri donatori : non è corretto escludere un paziente con un Ab allelico (ad es. anti A*24:03) da tutti i donatori A24, semplicemente perchè al momento non siamo in grado di risolvere allo stesso grado di risoluzione la tipizzazione del donatore.

E questo vale a maggior ragione per i pazienti immunizzati, per cui il pool dei possibili donatori è molto più ristretto



E siamo solo al 4° digit.....

Elogio dell'incoerenza



In effetti siamo un tantino incoerenti :
possiamo tipizzare i donatori ed identificare gli anticorpi ad alta risoluzione e poi, al momento dell'allocazione convertiamo le nostre informazioni in bassa risoluzione se non addirittura ad equivalenti sierologici



E siccome in alto ci vogliono bene, il nostro nuovo algoritmo nazionale **INKA** bada solo agli Ag broad.....

Il match HLA fa bene al trapianto, ma non è tutto

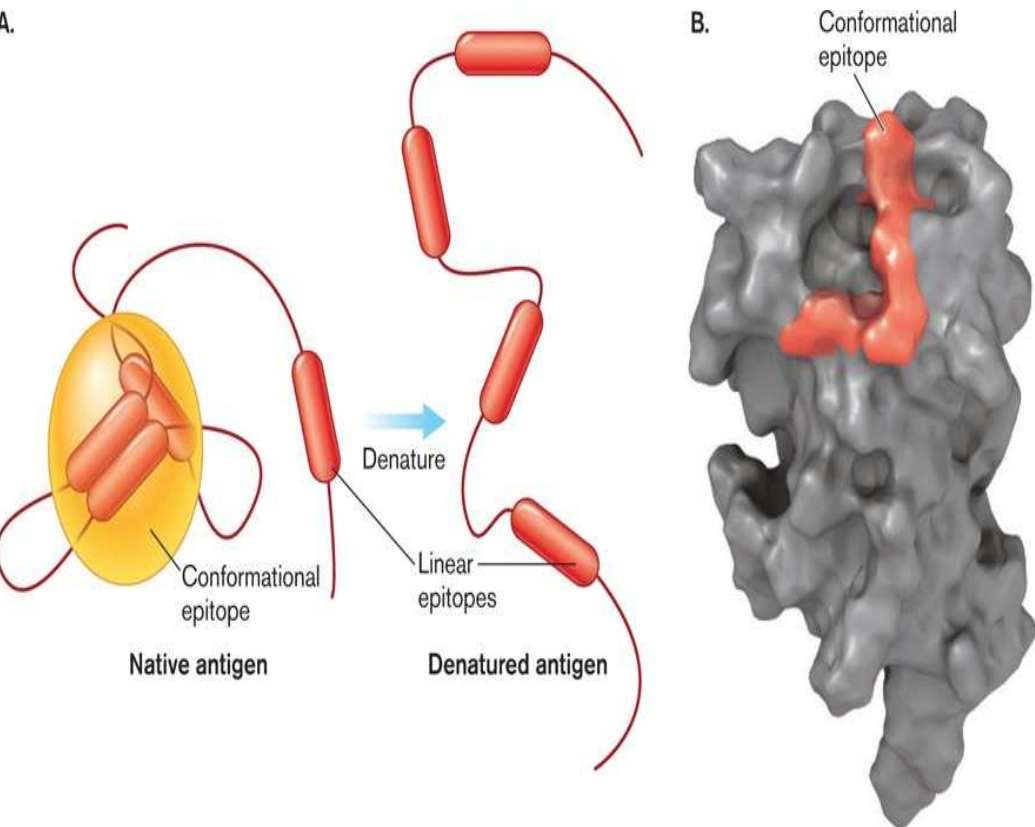
Con tutto il bene che vogliamo al match antigenico HLA non siamo ancora in grado di rendere ragione:

- ✓ del fatto che alcuni mismatch sono più immunogeni di altri
- ✓ del rischio che lo sviluppo di anticorpi cross reattivi a seguito dell'alloimmunizzazione determini una sensibilizzazione allargata riducendo di molto le future probabilità di ritrapianto.





IL MATCH NEL TRAPIANTO CSE



Match HLA e trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE)

Ancor oggi la selezione dei possibili donatori MUD (Matched Unrelated Donor) è basata sulla tipizzazione in alta risoluzione (HR) degli alleli HLA di Classe I A, B, C e di classe II DRB1 e DQB1.

Sappiamo bene che solo il 30% dei pazienti che necessitano di un trapianto di CSE troveranno un fratello HLA identico come donatore.

Per questo sono nati i registri donatori.

Ma anche utilizzando i registri internazionali, trovare un donatore match 10/10 o 8/8 può essere particolarmente difficile con combinazioni alleliche meno frequenti.

Ad. es. riceventi Afro-Americani hanno una probabilità di circa il 16% di trovare un donatore 8/8, probabilità che sale al 79% abbassando il livello di match a 7/8.

Polimorfismo HLA e *linkage disequilibrium*

All'ultima revisione dell'aprile 2019 dell'IPD-IMGT/HLA database gli alleli HLA sono arrivati a 22.528, di cui :

- al locus A : 5018
- al locus B : 6096
- al locus C : 4852
- al locus DRB1 : 2403
- al locus DQB1 : 1560

Per fortuna esiste il *linkage disequilibrium* (LD), croce e delizia degli immunogenetisti : se tutti sappiamo che, nella popolazione caucasica, un donatore identico con il ricevente per i loci A*01:01 e B*08:01, ha ottime probabilità di condividere con esso anche l'allele DRB1*03:01, lo stesso fenomeno renderà assai più complessa la ricerca di un donatore compatibile in presenza di aplotipi meno frequenti o rari.

Hanno forte linkage tra di loro i loci B e C e DRB1 e DQB1, per cui un mismatch al locus B aumenterà le probabilità di mm al locus C, come un mismatch al locus DRB1 aumenterà quelle allo locus DQB1.

Il match HLA fa bene anche al trapianto di cellule staminali

Storicamente il match allelico a tutti e 5 i loci principali (**match 10/10**) riduce il rischio di GVHD severa, riduce la mortalità ed è associato ad una maggiore sopravvivenza libera da malattia dei pazienti.

Quando sono disponibili solo donatori con 1 o più mismatch conoscere il rischio legato ad ogni singolo locus è fondamentale per la selezione dei donatori ed andranno quindi considerati :

- ✓ Il locus
- ✓ Il numero dei mismatches
- ✓ Le differenze tra antigeni ed alleli
- ✓ Il livello di espressione nel ricevente dei mismatch HLA
- ✓ La posizione e la natura dei mismatches aminoacidici che definiscono gli epitopi di Classe I

(Non tratterò di trapianti aploidentici)

Mismatch HLA : 1. effetto dei singoli loci

TRANSPLANTATION

High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation

Stephanie J. Lee,¹ John Klein,² Michael Haagenson,³ Lee Ann Baxter-Lowe,⁴ Dennis L. Confer,⁵ Mary Eapen,² Marcelo Fernandez-Vina,⁶ Neal Flomenberg,⁷ Mary Horowitz,² Carolyn K. Hurley,⁸ Harriet Noreen,⁹ Machteld Oudshoorn,¹⁰ Effie Petersdorf,¹ Michelle Setterholm,⁵ Stephen Spellman,⁵ Daniel Weisdorf,¹¹ Thomas M. Williams,¹² and Claudio Anasetti¹³

¹Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; ²Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Medical College of Wisconsin, Milwaukee; ³Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Minneapolis, MN; ⁴Department of Surgery, University of California, San Francisco; ⁵National Marrow Donor Program, Minneapolis, MN; ⁶M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX; ⁷Thomas Jefferson University Hospital, Philadelphia, PA; ⁸Department of Oncology, Georgetown University Medical Center, Washington, DC; ⁹Immunology/Histocompatibility Laboratory, University of Minnesota Medical Center, Fairview; ¹⁰Europdonor Foundation, Leiden, the Netherlands; ¹¹Blood and Marrow Transplantation (BMT) Program, University of Minnesota, Minneapolis; ¹²Department of Pathology, University of New Mexico, Albuquerque; and ¹³H. Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, FL

BLOOD, 15 DECEMBER 2007 • VOLUME 110, NUMBER 13

Nei riceventi caucasici mismatch ad un singolo locus sono associati a :

- ✓ Rischio significativamente aumentato di GVHD : HLA A, B e C
- ✓ Mortalità legata al trapianto (TRM) : HLA A, C e DRB1
- ✓ Mortalità del ricevente : HLA A, C e DRB1

Dei classici loci HLA i mismatch più permissivi sono quelli a livello di DQB1

Si può quindi forse fare a meno del locus DQB₁

- ✓ L'outcome atteso dopo un trapianto 8/8 con un donatore con match per i loci A, B, C e DR è sovrapponibile a quello di un donatore 10/10
- ✓ Quando un donatore full match non è disponibile, può essere accettabile utilizzare donatori con mismatch al locus DQB₁
- ✓ Se un singolo mm DQB₁ può essere tollerato, il mismatch al locus DQB₁ se associato a mm ad altri loci determina una prognosi peggiore, per cui si consiglia il match DQB₁ quando si debba utilizzare un donatore con mismatch ad altri loci

E il locus DPB₁?

Mismatch al locus DPB₁ si osservano in circa l'85% dei trapianti 10/10 e si associano ad GVHD e a fallimento del trapianto, ma questi effetti negativi sono controbilanciati da un positivo effetto del graft vs leukemia (GVL).

HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants

Bronwen E. Shaw, Steven G.E. Marsh, Neema P. Mayor, Nigel H. Russell, and J. Alejandro Madrigal

BLOOD, 1 FEBRUARY 2006 • VOLUME 107, NUMBER 3

The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation

Bronwen E. Shaw,^{1,2} Theodore A. Gooley,³ Mari Malkki,³ J. Alejandro Madrigal,^{1,4} Ann B. Begovich,⁵ Mary M. Horowitz,⁶ Alois Gratwohl,⁷ Olle Ringdén,⁸ Steven G. E. Marsh,^{1,4} and Effie W. Petersdorf^{9,10}

¹Anthony Nolan Research Institute, London, United Kingdom; ²Section of Hemato-Oncology, Royal Marsden Hospital/Institute of Cancer Research, Surrey, United Kingdom; ³Division of Clinical Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; ⁴Royal Free and University College London Medical School, London, United Kingdom; ⁵Roche Molecular Systems, Alameda, CA; ⁶Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Medical College of Wisconsin, Milwaukee; ⁷Hematology Department, University Hospital Basel, Basel, Switzerland; ⁸Division of Clinical Immunology, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden; and ⁹Department of Medicine, University of Washington School of Medicine, Seattle

BLOOD, 15 DECEMBER 2007 • VOLUME 110, NUMBER 13

The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation

Bronwen E. Shaw,^{1,2} Theodore A. Gooley,³ Mari Malkki,³ J. Alejandro Madrigal,^{1,4} Ann B. Begovich,⁵ Mary M. Horowitz,⁶ Alois Gratwohl,⁷ Olle Ringdén,⁸ Steven G. E. Marsh,^{1,4} and Effie W. Petersdorf^{3,9}

¹Anthony Nolan Research Institute, London, United Kingdom; ²Section of Hemato-Oncology, Royal Marsden Hospital/Institute of Cancer Research, Surrey, United Kingdom; ³Division of Clinical Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA; ⁴Royal Free and University College London Medical School, London, United Kingdom; ⁵Roche Molecular Systems, Alameda, CA; ⁶Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Medical College of Wisconsin, Milwaukee; ⁷Hematology Department, University Hospital Basel, Basel, Switzerland; ⁸Division of Clinical Immunology, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden; and ⁹Department of Medicine, University of Washington School of Medicine, Seattle

BLOOD, 15 DECEMBER 2007 • VOLUME 110, NUMBER 13

HLA DPB1 è il classico Ag del trapianto: il maggior rischio di GVHD associato a mm a questo locus è controbilanciato dall'effetto GVL e quindi da un minor rischio di ripresa di malattia e l'effetto del mismatch DPB è dose dipendente.

Il Locus DPB1 è soggetto meno di altri loci a *linkage disequilibrium*, in particolare con il locus DQB1, quindi è più facile osservare mm a questo locus anche con donatori 10/10.

Il locus DPB1 ha invece un forte *linkage* con DPA1 : l'identità al locus DPB1 nella maggioranza dei casi è predittiva anche di identità al locus DPA1

Gli Ag DP facilitano l'effetto GVL del trapianto

Bone Marrow Transplantation, (1999) 23, 1153-1159
© 1999 Stockton Press. All rights reserved 0268-3369/99 \$12.00
<http://www.stockton-press.co.uk/bmt>



Recognition of leukemic blasts by HLA-DPB1-specific cytotoxic T cell clones: a perspective for adjuvant immunotherapy post-bone marrow transplantation

C Ibisch¹, G Gallot¹, R Vivien¹, E Diez¹, F Jotereau¹, R Garand² and H Vié¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U463, and ²Service Hématologie, Institut de Biologie, Nantes, France

Gli Ag DPB1 sono espressi sulla maggior parte delle cellule leucemiche, che possono essere target di cellule T allogeniche DP-specifiche.

Sembra che quest'effetto sia mantenuto sia in trapianti T-depleti che in quelli repleti, suggerendo che non è il numero totale dei linfociti T infusi a determinare l'effetto GVL

Utilità del typing al locus DPB₁


Conoscere prima del trapianto lo stato di match tra donatore e ricevente al locus DPB₁ può aiutare nel determinare il livello di rischio del trapianto, specie per i pazienti ad alto rischio che potrebbero non tollerare una GVHD severa o per i pazienti in cui la ricorrenza della malattia è il principale fattore di rischio.



- ✓ Per pazienti a basso rischio, con aplotipi comuni HLA e donatori con 10/10 match, una selezione estesa al match DPB₁ riduce il rischio di GVHD.

Abbiamo imparato molto dagli Ag DPB₁

La definizione di 6 regioni “ipervariabili” che definiscono il sito di legame con i peptidi localizzate nell’esone 2 polimorfico degli Ag DPB₁ è stato il punto di partenza per esplorare il ruolo degli epitopi delle cellule T (TCEs) nella GVHD e GVL



Peripheral blood stem cell allograft rejection mediated by CD4⁺ T lymphocytes recognizing a single mismatch at HLA-DPB1*0901

Katharina Fleischhauer, Elisabetta Zino, Benedetta Mazzi, Elisabetta Sironi, Paolo Servida, Elisabetta Zappone, Elena Benazzi, and Claudio Bordignon

BLOOD, 15 AUGUST 2001 • VOLUME 98, NUMBER 4

Fino a permettere di definire “distanze funzionali” predittive di mismatch permissivi al locus DPB₁

The Impact of Amino Acid Variability on Alloreactivity Defines a Functional Distance Predictive of Permissive HLA-DPB1 Mismatches in Hematopoietic Stem Cell Transplantation



CrossMark

Pietro Crivello^{1,2}, Laura Zito², Federico Sizzano^{2,3}, Elisabetta Zino², Martin Maier⁴, Arend Mulder⁵, Cristina Toffalori², Luigi Naldini^{6,7}, Fabio Ciceri⁸, Luca Vago^{2,8}, Katharina Fleischhauer^{1,2,*}

Biol Blood Marrow Transplant 21 (2015) 233–241

E a sviluppare un algoritmo basato sui gruppi degli epitopi delle Cellule T:

DPB₁ T-Cell Epitope Algorithms disponibile a :

<http://ebi.abi.uk/ipd/imgt/hla/>

Un modello di previsione diretta del riconoscimento delle molecole HLA allogeniche da parte delle cellule T : DPB₁ T-Cell Epitope Algorithm.1

Nei trapianti di cellule staminali ematopoietiche da donatore non consanguineo, la classificazione dei mismatch al locus DPB₁ basata sui gruppi di epitopi delle cellule T (TCE- groups) permette di identificare i mismatch permissivi da quelli a rischio aumentato o non permissivi e di valutare se in quel particolare trapianto preverrà GVHD o GVL.

Questo algoritmo è basato sul riconoscimento diretto delle molecole HLA DP da parte delle cellule T ed in particolare sui dati *in vitro* dei due cloni alloreattivi che possono originare dopo trapianto di CSE con mismatch al locus DP.

Occorre inserire la tipizzazione al locus DPB₁ del donatore e del ricevente per evidenziare la lista degli epitopi T e la predizione degli effetti dei mismatch.

DPB₁ T-Cell Epitope Algoritm.2

3 differenti livelli immunogeni di alleli:

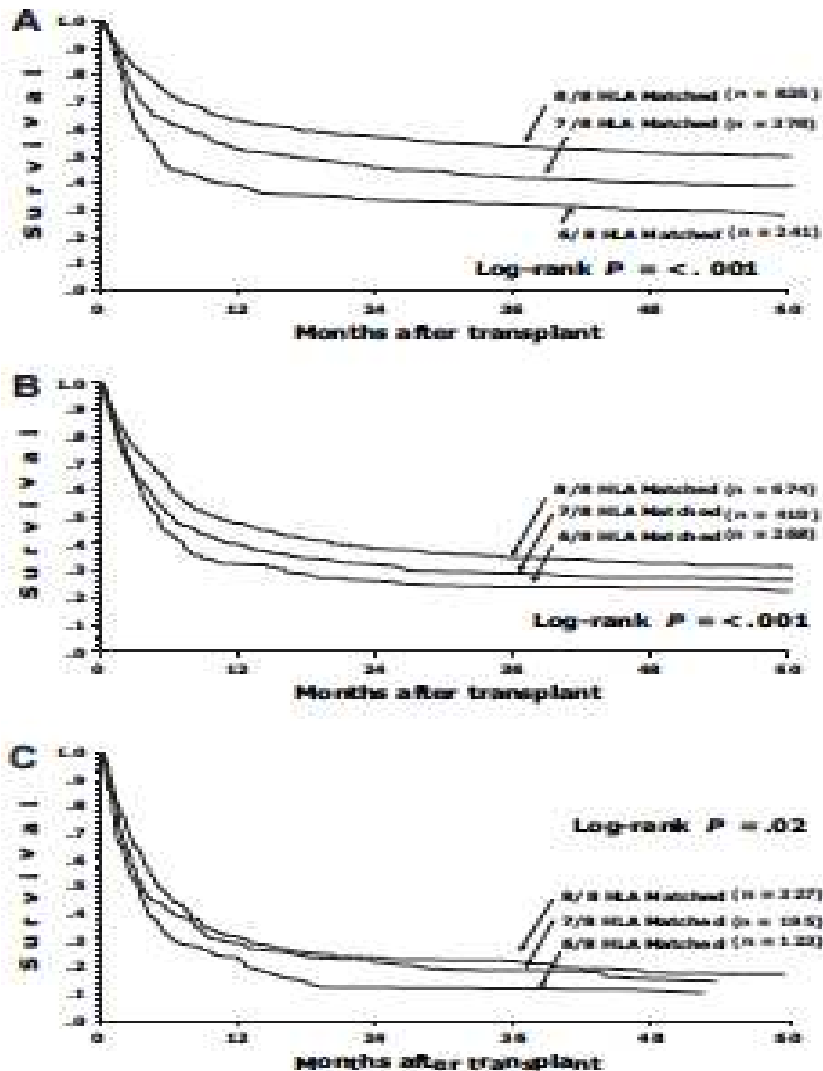
- altamente immunogeni : entrambi i cloni riconoscono gli alleli
- mediamente immunogeni : uno dei cloni riconosce l'allele, l'altro no
- non immunogeni : entrambi i cloni non riconoscono gli alleli

Quando un ricevente ha un allele DPB appartenente alla stessa classe o ad una classe a minor immunogenicità, il mismatch sarà permissivo nella direzione GVHD; d'altra parte essendo l'allele DPB del ricevente non immunogeno, le cellule T del ricevente saranno in grado di rispondere agli alleli più immunogeni del donatore, quindi tale mismatch non sarà permissivo nella direzione GVL.

Ne esistono due versioni:

- 1.0 : basata essenzialmente sui lavori di Katharina Fleischhauer e di Bronwen Shaw, ampiamente validata
- 2.0 : basata sui dati di Crivello; dove alcuni gruppi di TCE differiscono dalla precedente; ad oggi non completamente validata

Mismatch HLA : 2. effetto additivo dei mismatches



I rischi di fallimento del trapianto, GVHD acuta e la mortalità legata al trapianto aumentano con il numero dei mismatch.

L'effetto è più pronunciato per malattia agli stadi iniziali (A) e può essere calcolato in circa 10-11% di riduzione della sopravvivenza per ogni mismatch aggiuntivo.

Mismatch HLA : 3. differenze tra antigeni ed alleli

I mismatch a livello antigenico sono ovviamente molto più immunogeni di quelli a livello allelico (differenze tra due distinte sequenze dello stesso antigene) e questo è particolarmente vero per il locus C.

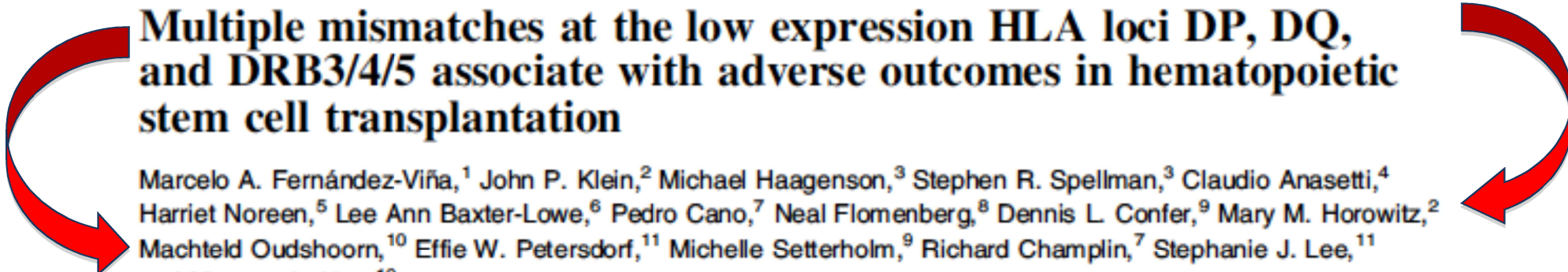
Quando non sono disponibili donatori full match o con un singolo mismatch DQB1 è preferibile un donatore con mismatch allelico piuttosto che antigenico al locus C

MAJOR-HISTOCOMPATIBILITY-COMPLEX CLASS I ALLELES AND ANTIGENS IN HEMATOPOIETIC-CELL TRANSPLANTATION

EFFIE W. PETERSDORF, M.D., JOHN A. HANSEN, M.D., PAUL J. MARTIN, M.D., ANN WOOLFREY, M.D., MARI MALKKI, PH.D.,
THEODORE GOOLEY, PH.D., BARRY STORER, PH.D., ERIC MICKELSON, B.S., ANAJANE SMITH, M.S.,
AND CLAUDIO ANASETTI, M.D.

Mismatch HLA : 4. livello di espressione dei mismatch

I loci a bassa espressione come HLA –DRB₃, DRB₄ e DRB₅ non vengono solitamente considerati nella selezione prospettica del donatore, ma il loro effetto sulla GVHD può diventare evidente specie quando esista tra ricevente e donatore un mismatch ad uno dei loci principali



Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation

Marcelo A. Fernández-Viña,¹ John P. Klein,² Michael Haagenson,³ Stephen R. Spellman,³ Claudio Anasetti,⁴ Harriet Noreen,⁵ Lee Ann Baxter-Lowe,⁶ Pedro Cano,⁷ Neal Flomenberg,⁸ Dennis L. Confer,⁹ Mary M. Horowitz,² Machteld Oudshoorn,¹⁰ Effie W. Petersdorf,¹¹ Michelle Setterholm,⁹ Richard Champlin,⁷ Stephanie J. Lee,¹¹ and Marcos de Lima¹²

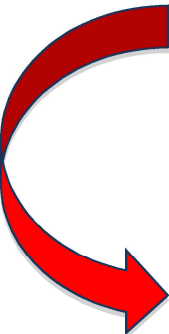
BLOOD, 30 MAY 2013 • VOLUME 121, NUMBER 22

Per tornare a DPB sono state identificate variazioni in regioni regolatorie responsabili dell'espressione allelica che correlano con il rischio di GVHD

Mismatch HLA : 5. posizione e natura dei mismatches aminoacidici che definiscono gli epitopi di Classe I.

Mismatch permissivi e non permissivi

Come avviene nel trapianto di organi solidi, alcuni mismatch HLA determinano una risposta alloreattiva severa associata ad aumento della morbidità e della mortalità del paziente e sono quindi considerati ad alto rischio : **MM non permissivi**, mentre altri producono effetti assai minori, vale a dire non sono associati a GVHD allogenica o a rigetto e sono quindi definiti **MM permissivi**.



HLA mismatching within or outside of cross-reactive groups (CREGs) is associated with similar outcomes after unrelated hematopoietic stem cell transplantation

Judith A. Wade,¹ Carolyn Katovich Hurley,² Steven K. Takemoto,³ John Thompson,⁴ Stella M. Davies,⁵ Thomas C. Fuller,⁶ Glenn Rodey,⁷ Dennis L. Confer,⁸ Harriet Noreen,⁹ Michael Haagensohn,¹⁰ Fangyu Kan,¹⁰ John Klein,¹¹ Mary Eapen,¹¹ Stephen Spellman,⁸ and Craig Kollman¹²

BLOOD, 1 MAY 2007 • VOLUME 109, NUMBER 9

La risposta non sta nei CREGs : mismatches all'interno dei gruppi sierologici cross-reattivi per i loci A e B non sono associati a miglior sopravvivenza rispetto a mismatches fuori dai CREGs .

Il grado di permissività di un mismatch non è quindi definito dalle sue somiglianze sierologiche

Mismatch HLA : 5. posizione e natura dei mismatches aminoacidici che definiscono gli epitopi di Classe I.

Mismatch permissivi e non permissivi

Determinate posizioni dei residui aminoacidici dei mismatch HLA tra donatore e ricevente risultano cruciali per la storia del trapianto.

**BONE MARROW-ALLOGRAFT REJECTION
BY T LYMPHOCYTES RECOGNIZING
A SINGLE AMINO ACID DIFFERENCE IN
HLA-B44**

KATHARINA FLEISCHHAUER, M.D.,
NANCY A. KERNAN, M.D.,
RICHARD J. O'REILLY, M.D.,
BO DUPONT, M.D., D.Sc.,
AND SOO YOUNG YANG, Ph.D.

NEJM 1990; 323: 1818-1822

Già in questo lavoro del 1990 gli AA. descrivevano un caso di rigetto del trapianto cellulo mediato da T linfociti che riconoscevano una singola differenza aminocidica a livello dell'Ag B44: in particolare al residuo 156 il ricevente presentava una leucina, il donatore una molecola di ac. aspartico

Per un punto Martin perse la cappa.... :
Mismatch B*44:02 vs B*44:03



Mediante metodiche molecolari il mismatch esistente tra donatore e ricevente riportato nel lavoro di Katharina tra B*44:02 e B*44.03.

La differenza di un singolo aminoacido ha avuto quindi conseguenze drammatiche sull'esito del trapianto; in altri casi mismatch apparentemente molto più consistenti sono ben tollerati.

Questa differenza di comportamento non può essere prevista dalla semplice differenza allelica; evidentemente i diversi gradi di permissibilità delle combinazioni non compatibili devono essere legati al differente impatto che il polimorfismo aminoacidico ha sul *motif* del legame peptidico e sulla conformazione del complesso HLA - peptide

Residui critici

Bone marrow transplantation from unrelated donors: the impact of mismatches with substitutions at position 116 of the human leukocyte antigen class I heavy chain

Giovanni B. Ferrara, Andrea Bacigalupo, Teresa Lamparelli, Edoardo Lanino, Laura Delfino, Anna Morabito, Anna M. Parodi, Cinzia Pera, Sarah Pozzi, Maria P. Sormani, Paolo Bruzzi, Domenico Bordo, Martino Bolognesi, Giuseppe Bandini, Andrea Bontadini, Mario Barbentì, and Guido Frumento

BLOOD, 15 NOVEMBER 2001 • VOLUME 98, NUMBER 10



Il lavoro di GB è stato il primo a correlare l'outcome del trapianto con il mismatch per specifici residui aminoacidici degli Ag HLA di Classe I:

- Mismatches alle posizioni 114 e 116 di HLA B sono associati con aumentato rischio di mortalità legata al trapianto
- La posizione 116 di HLA C è anche collegata ad aumentato rischio di GVHD

High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism

Takakazu Kawase,¹ Yasuo Morishima,² Keitaro Matsuo,³ Koichi Kashiwase,⁴ Hidetoshi Inoko,⁵ Hiroh Saji,⁶ Shunichi Kato,⁷ Takeo Juji,⁸ Yoshihisa Kodera,⁹ and Takehiko Sasazuki,¹⁰ for The Japan Marrow Donor Program

¹Division of Immunology, Aichi Cancer Center, Nagoya; ²Department of Hematology and Cell Therapy, Aichi Cancer Center, Nagoya; ³Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center, Nagoya; ⁴Japanese Red Cross Tokyo Metropolitan Blood Center, Tokyo; ⁵Division of Molecular Science, Tokai University School of Medicine, Isehara; ⁶Human Leukocyte Antigen (HLA) Laboratory, Nonprofit Organization (NPO), Kyoto; ⁷Department of Cell Transplantation and Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara; ⁸Japanese Red Cross Central Blood Institute, Tokyo; ⁹Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Nagoya; ¹⁰International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

In questo lavoro differenti combinazioni di mismatch non permissivi :

4 per HLA – A, 1 per B,
7 per C, 2 per aplo tipi
DR/DQ e 2 per HLA - DP

BLOOD, 1 OCTOBER 2007 • VOLUME 110, NUMBER 7

Manca ancora qualcosa.....

Anche nel trapianto di CSE poter predire la permissibilità o meno dei mismatch è di fondamentale importanza.

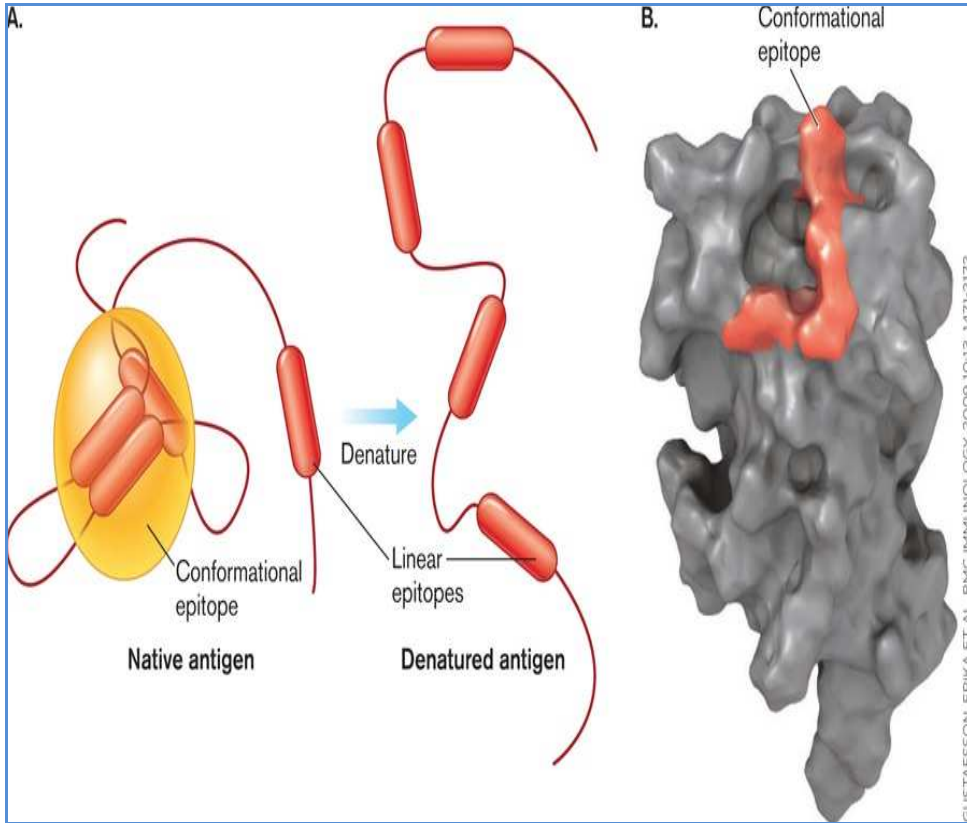
Molto abbiamo imparato, ma non è tutto :

- DPB₁ T-Cell Epitope Algorithm fornisce informazioni relative ai mismatch al locus DPB₁ e fornisce importanti informazioni al clinico(GVHD vs GVL)

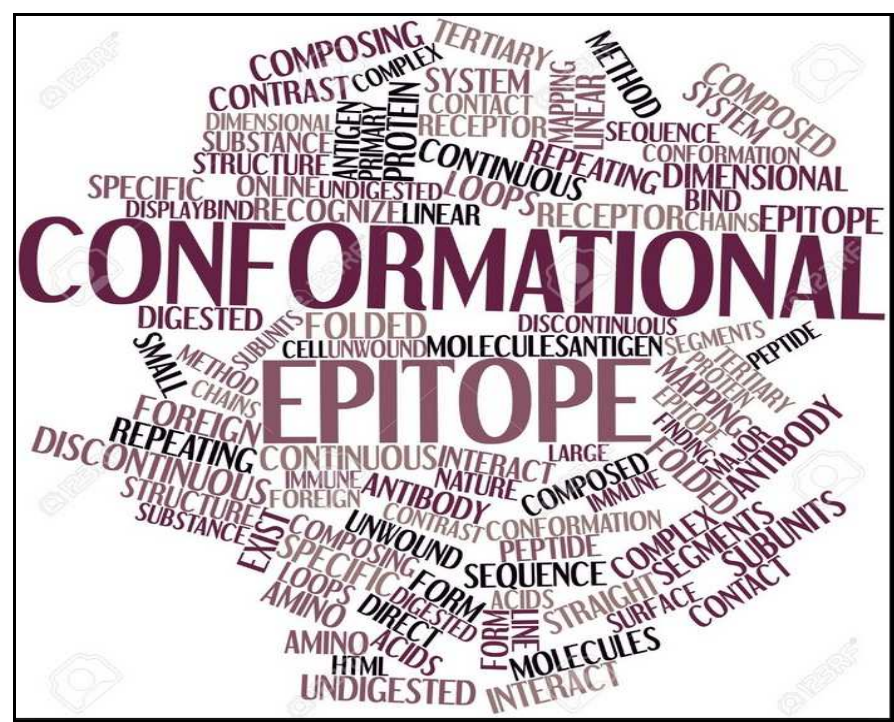
- la variazione di sequenza aminoacidica tra i diversi alleli può rendere ragione di alcune situazioni

Manca tutto quello che riguarda il riconoscimento indiretto degli Ag HLA attraverso la presentazione dei peptidi derivati dalle molecole HLA allogeniche, e non è poco, visto che da lì parte la produzione dei cloni B linfocitari specifici.

ANTIGENI



ED

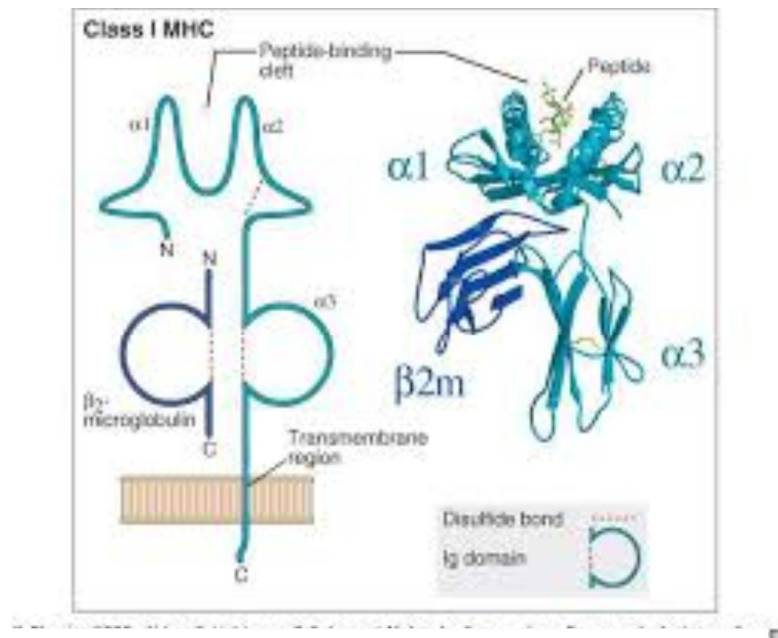


EPITOPI

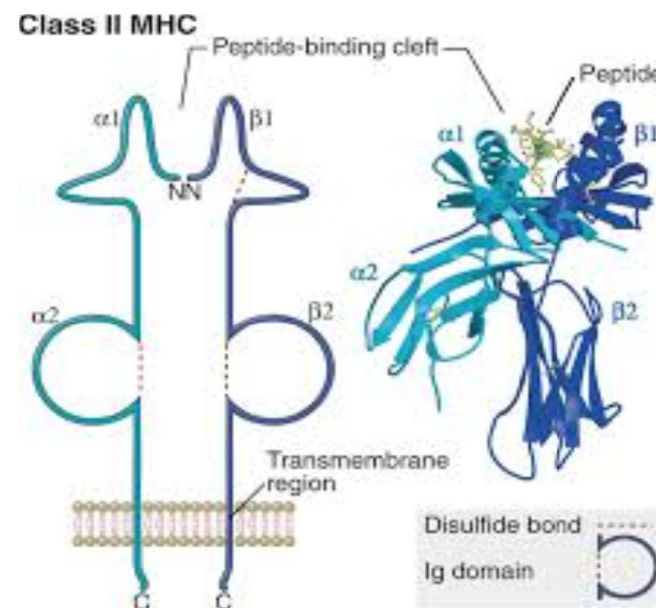
Conosciamo più da vicino gli Ag HLA

Mediante studi di cristallografia e di analisi di diffrazione a raggi-X abbiamo conosciuto più da vicino la struttura degli Ag HLA

HLA Classe I



HLA Classe II



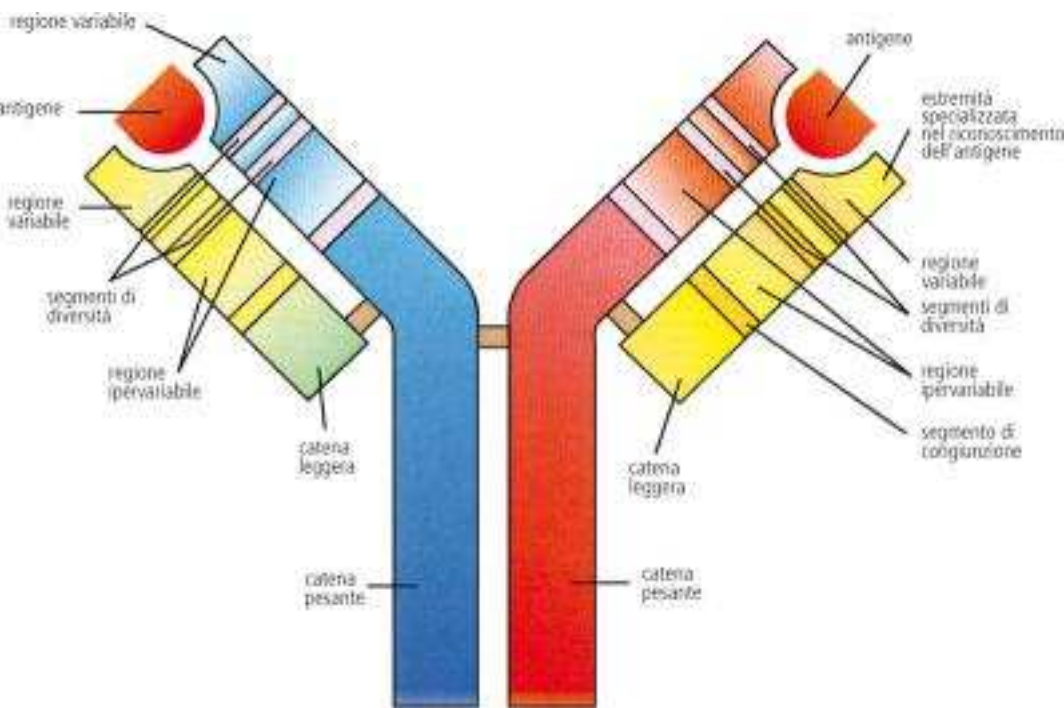
La maggior parte dei polimorfismi aminoacidici delle molecole HLA formano un cluster all'apice della molecola, dove formano un largo incavo che rappresenta la sede del legame dei peptidi alloigenici processati.

Piccole modificazioni della sequenza aminoacidica tra i diversi alleli possono creare o alterare la natura del sito di legame con l'Ag.

Queste variazioni sono responsabili della specificità allelica nel legame con l'alloantigene e la sua presentazione.

Ed i loro anticorpi

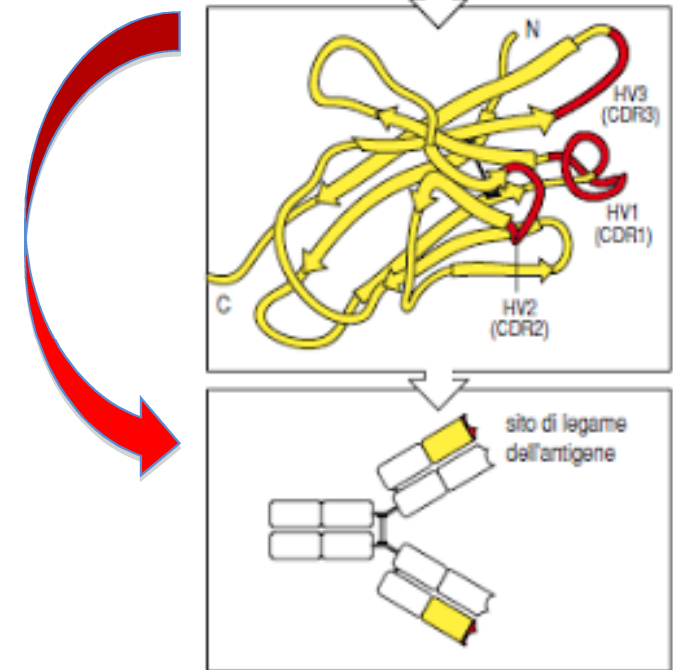
La zona di legame con l'Ag di un Ab è formata dall'insieme delle due regioni variabili aminoterminali delle catene leggere e pesanti



I CDRs determinano sia la specificità che l'affinità delle interazioni antigene-anticorpo e si definisce **paratopo** la particolare configurazione di aa. dell'Ab coinvolti nel legame e nel riconoscimento dell'Ag.

La variabilità della sequenza aminoacidica delle regioni variabili, derivata da ricombinazione genica e successive mutazioni somatiche, è concentrata in tre segmenti di ogni regione variabile, detti **regioni ipervariabili**.

Sono costituite da 10 aa. E dal momento che formano una combinazione complementare all'Ag sono dette **regioni determinanti la complementarietà (CDRs)**



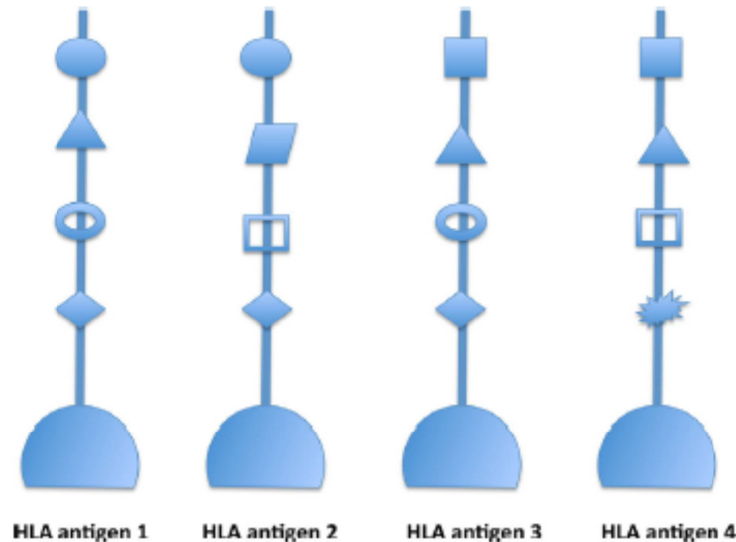
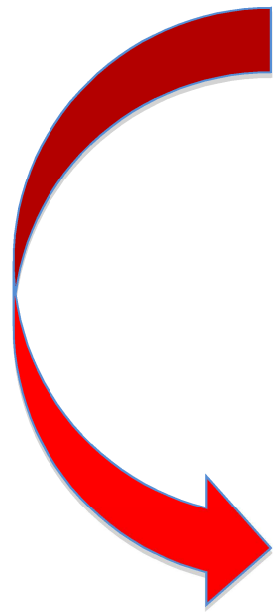
Il paratopo dell'Ab riconosce l'epitopo dell'Ag

Ovviamente anche gli Ab hanno regioni determinate di complementarità con gli Ag: per quello che riguarda gli Ab anti-HLA essi riconoscono **epitopi** target sugli Ag HLA, chiamati

EPITOPI DELLE CELLULE B detti familiarmente **EPITOPI**,

configurazioni dei residui aminoacidici polimorfici che sono riconosciute dalle cellule B, cioè il minimo determinate strutturale richiesto per legare uno specifico anticorpo.

Ogni Ag HLA ha la propria unica combinazione di epitopi, lo stesso epitopo può essere condiviso con altri Ag HLA, ma la combinazione dei diversi epitopi è unica per ciascun Ag HLA



I residui aminoacidici che costituiscono gli epitopi possono essere contigui lungo la catena aminoacidica o, più spesso, essere avvicinati tra di loro in seguito al ripiegamento della catena peptidica

A VOLTE RITORNANO..... CROSS REACTIVE GROUP – CREGs e EPITOPI COMUNI

Epitopi comuni condivisi da differenti Ag HLA sono in grado di determinare il legame con alloanticorpi cross-reattivi

Transplantation. 1997 October 15; 64(7): 983–991.

HLA AND CROSS-REACTIVE ANTIGEN GROUP MATCHING FOR CADAVER KIDNEY ALLOCATION¹

Thomas E. Starzl^{2,3}, Michael Eliasziw⁴, David Gjertson⁵, Paul I. Terasaki⁵, John J. Fung², Massimo Trucco⁶, Joan Martell⁶, John McMichael², Velma Scantlebury², Ron Shapiro², and Allan Donner⁴

The Thomas E. Starzl Transplantation Institute and Children's Hospital of Pittsburgh, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, Pennsylvania 15213; Department of Epidemiology and Biostatistics, University of Western Ontario, Ontario, Canada N6A 5C1; and UCLA Tissue Typing Laboratory, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California 90024-1652

Sebbene i geni HLA fossero già allora riconosciuti come altamente polimorfici (250 specificità nel 1997..) i prodotti proteici delle molecole di Classe I e II hanno minime variazioni di sequenza.

Molti di questi differenti residui condividono diversi determinanti antigenici, e questi costituiscono la base per cui molti Ab anti HLA sono diretti contro questi determinanti comuni o **CREGs**.

Gli AA. proponevano di utilizzare questa cross reattività degli Ag HLA ai fini dell'allocazione piuttosto che il match basato sui singoli Ag HLA

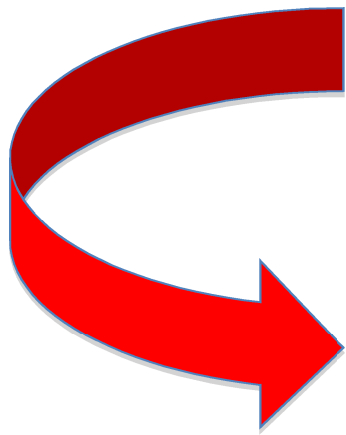
Definizione degli epitopi HLA. 1

Un possibile approccio per la definizione degli epitopi HLA è mediante analisi dei pattern di reazione di un'ampio range di Ab anti HLA ed assegnazione della specificità dell'epitopo in base al pattern di reattività .

Per spiegare le cross-reazioni osservate tra i differenti Ag HLA, il gruppo di Paul Terasaki guidato da El Awar, utilizzando microsfere coattate da singoli Ag HLA, ha analizzato sia Ab monoclonali anti HLA che Ab derivati da reazioni di assorbimento/eluizione di alloantisieri.

Gli eluati, testati con le biglie singolo antigene, hanno spesso dimostrato di reagire non solo con quello specifico Ag, ma con altri che condividevano uno o più aminoacidi.

I target di questi anticorpi, denominati **TEREps** in onore di Terasaki stesso sono rappresentati da 103 epitopi di Classe I, 60 epitopi DR e 18 epitopi DQ.



Human Leukocyte Antigen Class I Epitopes: Update to 103 Total Epitopes, Including the C Locus

Nadim R. El-Awar,^{1,4} Tatsuya Akaza,² Paul I. Terasaki,³ and Anh Nguyen¹

Background. Epitopes of human leukocyte antigen (HLA) are the sites to which the antibodies bind. We identify here 103 HLA class I epitopes shared by groups of class I antigens. In particular, our emphasis was on identifying epitopes exclusive to the C locus antigens or interlocus epitopes among A, B, and C antigens. The use of monoclonal antibodies or alloantibodies eluted from HLA recombinant single antigen cell lines coated with a panel of single antigen beads have proved very useful in the identification of the epitopes.

Methods. All antibodies absorbed onto then eluted from HLA single antigen cell lines and monoclonal antibodies were tested with a panel of 95 A-, B-, and C- single antigen beads and the HLA specificity determined. Each epitope was defined by amino acids shared exclusively by the positive antigens for each antibody.

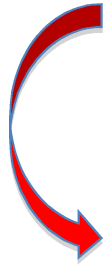
Results. In addition to the 58 A and B class I epitopes identified in an earlier study, we add 45 more new A, B, C epitopes including, for the first time, epitopes found on C locus antigens.

Conclusion. Beads bearing single antigens tested with monoclonal or eluted alloantibodies proved very powerful in identifying epitopes shared among HLA antigens. These epitopes are the targets of the antibodies. Antibody specificities to non-donor-specific antigens, often found in sera of transplant patients, can now be understood as reactions to epitopes shared with the donor specific antigens. The importance of identifying these epitopes is that they may be the "transplantation antigens" responsible for antibody mediated transplant rejection.

Keywords: HLA epitopes, HLA antibodies, HLA crossreactions, Eluted antibodies, Recombinant HLA class I antigens. (*Transplantation* 2007;84: 533-540)

Definizione degli epitopi HLA.2

Un altro approccio per la definizione degli epitopi HLA è mediante analisi della sequenza e della struttura degli alleli HLA e successiva validazione degli epitopi attesi rispetto agli Ab osservati



A Structurally Based Approach to Determine HLA Compatibility at the Humoral Immune Level

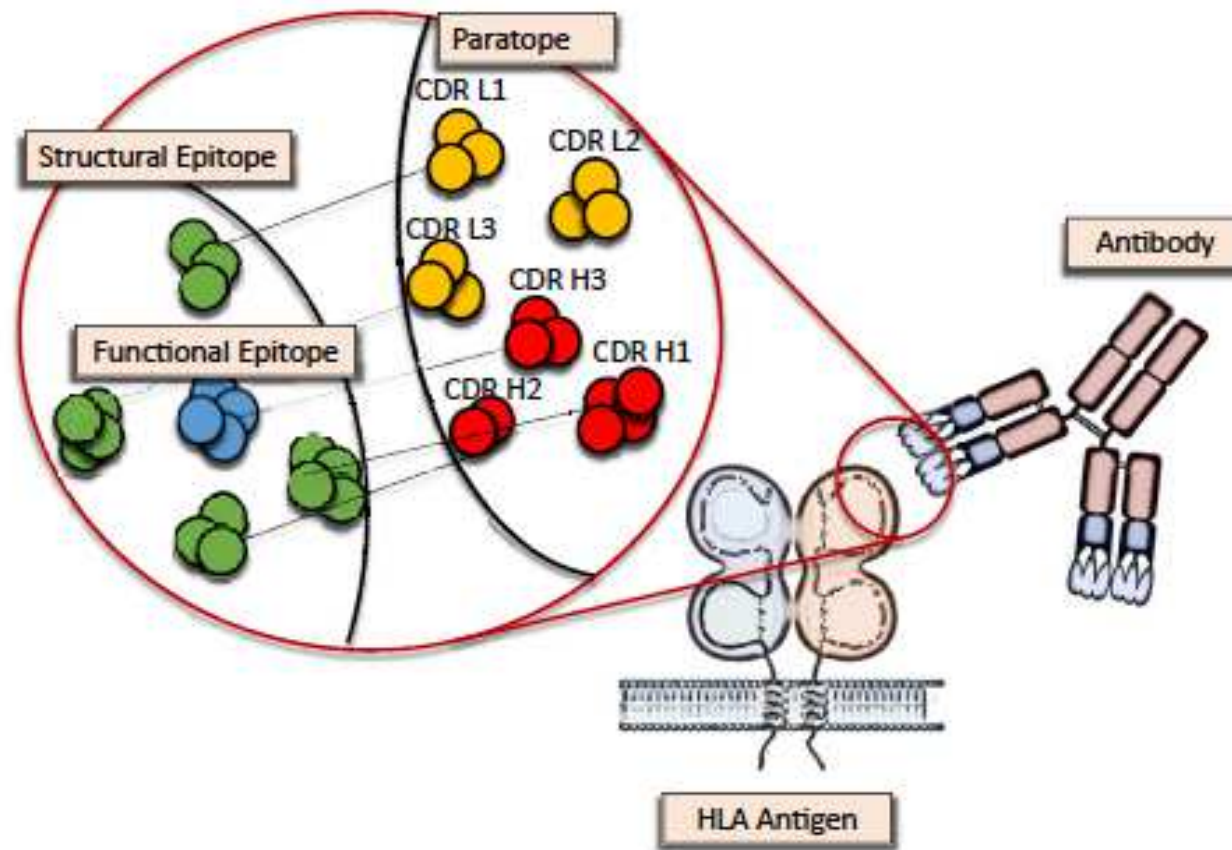
Rene J. Duquesnoy, Ph.D.

Division of Transplantation Pathology, Thomas E. Starzl, Transplantation Institute, University of Pittsburgh Medical Center

Hum Immunol. 2006 November ; 67(11): 847–862.

Mediante analisi strutturale dei complessi Ag-Ab cristallizzati, l'Autore ha dimostrato che la specificità di legame è determinata essenzialmente da un cluster tra i 3 e i 5 aa., detta **epitopo funzionale**, localizzato centralmente all'interno del più grande **epitopo strutturale** costituito da circa 15-20 residui aminoacidici, ciascuno dei quali coinvolto nel legame Ag-Ab.

Interfaccia tra il paratopo anticorpale e l'epitopo antigenico



Il paratopo dell'Ab incorpora le 3 CDRs (regioni determinanti la complementarietà) di ogni catena leggera e pesante che vengono in contatto con l' epitopo antigenico. Ci sono circa da 10 a 22 residui di contatto che determinano l'epitopo strutturale; centralmente a questi si trova un cluster di residui aa. che sono i determinanti chiave della specificità di legame dell'Ab che è stato denominato **epitopo funzionale o eplet**

EPITOPO FUNZIONALE o EPLET

Per essere immunogeno un epitopo funzionale deve contenere almeno 1 residuo polimorfico sulla superficie cellulare.

Il gruppo di Duquesnoy inizialmente ha preso in considerazione solo sequenze lineari di aa.: le **triple**tte. Successivamente, dopo aver meglio compreso la struttura terziaria della molecola, sono stati considerati anche residui discontinui, avvicinati tra di loro dal ripiegamento strutturale della proteina.

Vengono definiti **EPLET** i residui polimorfici HLA nel raggio di 3-3,5 Å di una determinata posizione di sequenza sulla superficie cellulare.

Molti degli **EPLET** corrispondono alle triplette, ma molti altri hanno residui discontinui sulla superficie cellulare

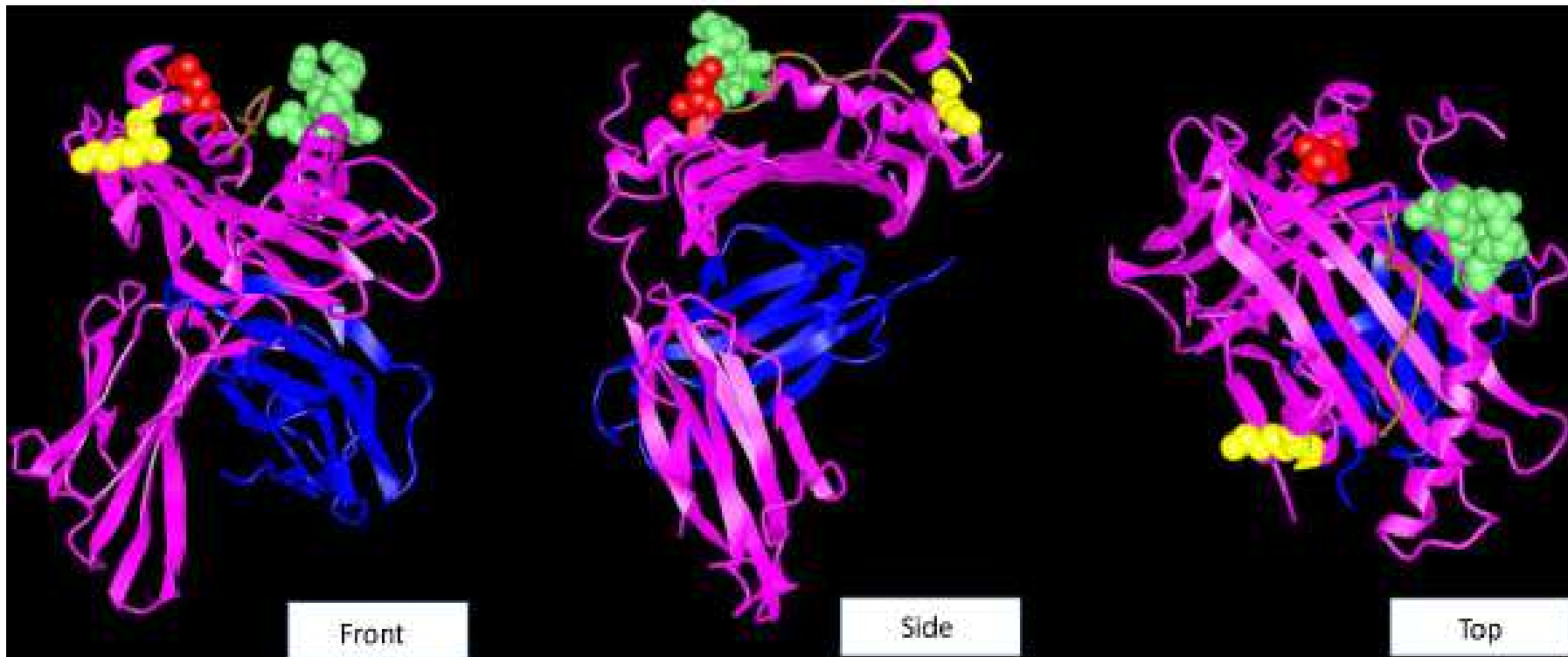
EPLETS : NOMENCLATURA

Ogni EPLET è indicato da un numero che rappresenta la posizione degli aa. polimorfici nella sequenza, seguito da una serie di lettere che rappresentano i residui polimorfici associati:

Ad es. l'eplet : **82LR** rappresenta il residuo che contiene una Leucina in posizione 82 e un'Arginina in posizione 83.

Per la lista completa: **HLA EPITOPE REGISTRY DATABASE**
(<http://www.epregistry.com>)

EPLETS : esempio di struttura tridimensionale

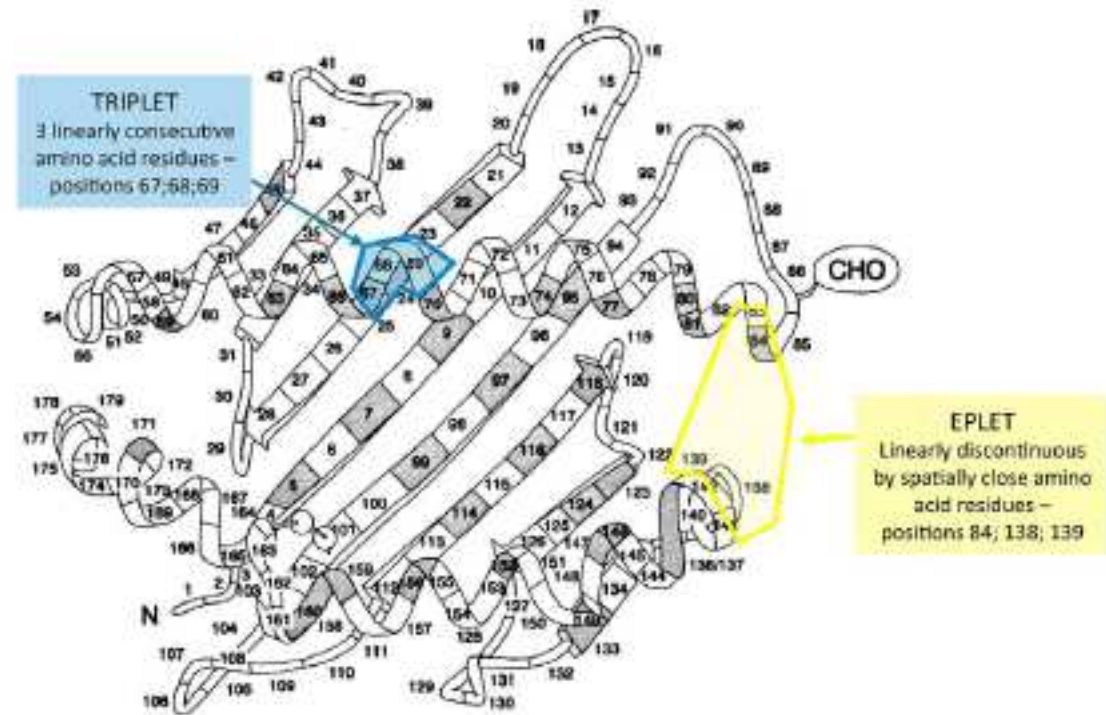
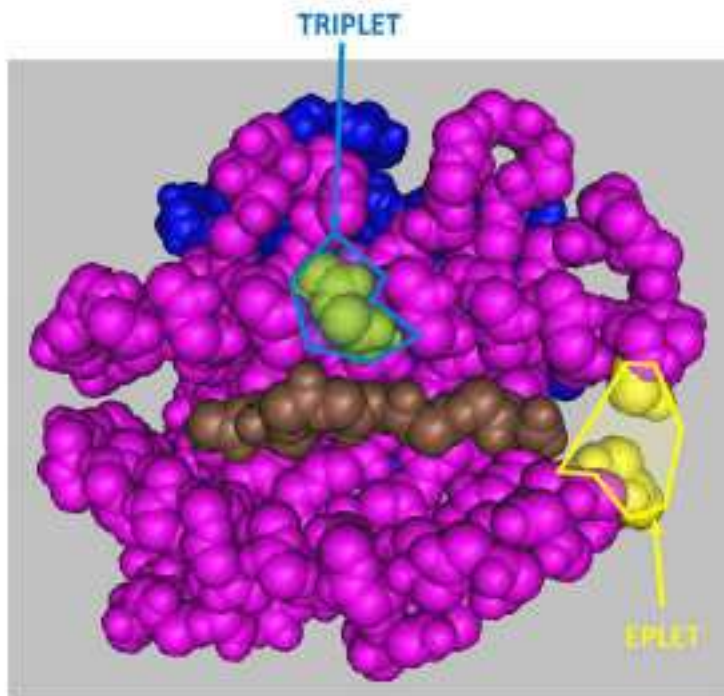


American Journal of Transplantation 2015; 15: 1148–1154

3 dei 54 eplet dell'Ag HLA A*01:01:

- in verde : 62QE (Glutamina 62; Ac. Glutamico 63)
- in giallo : 144KR (Lisina 144; Arginina 145)
- in rosso : 166DG (Asparagina 166; Glicina 167)

Differenza tra tripletta ed eplet



Correlazione tra TEREps e Eplets

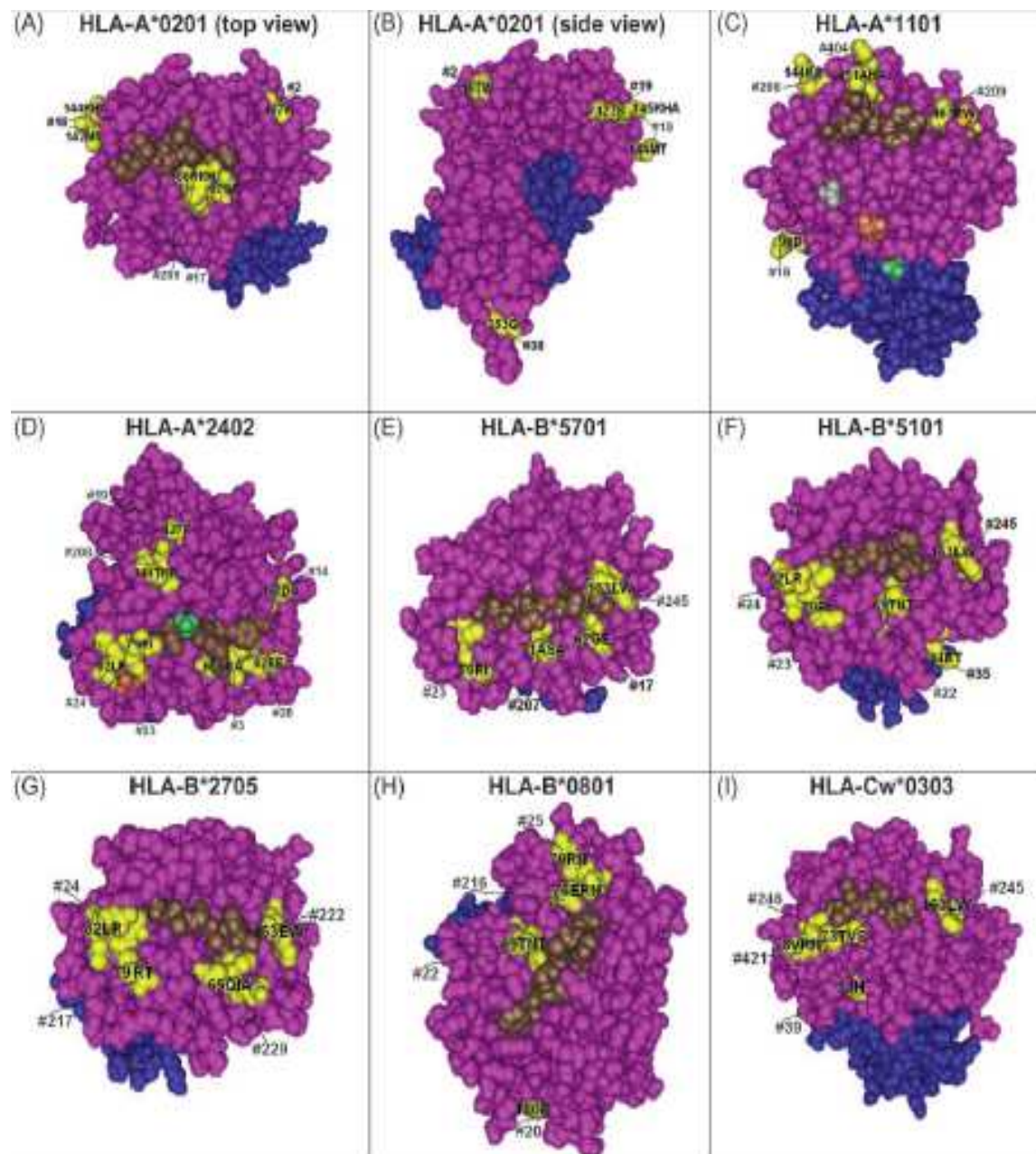
Tissue Antigens ISSN 0001-2815

Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens

R. J. Duquesnoy & M. Marrari

Division of Transplantation Pathology, Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, USA

Il 90% dei TEREps sono definiti da corrispondenti eplet, ma non tutti gli eplet verificati sono riconosciuti nel repertorio TEREps



E SE BASASSIMO ALLORA IL MACH SUGLI EPITOPI?

Dopo quanto abbiamo imparato sugli epitopi funzionali, prende senso la possibilità di un match non più rivolto verso gli Ag HLA, bensì verso i loro epitopi.

Mentre gli alleli HLA sono ormai troppi, gli Ab anti HLA sono diretti contro epitopi funzionali che comprendono un numero molto più limitato numero di residui aminoacidici diversi tra donatore e ricevente.

Il principio su cui si basa è che se un Ag HLA del donatore condivide uno specifico epitopo con un Ag HLA del ricevente, questo epitopo non verrà riconosciuto come non-self e quindi non determinerà una risposta immune umorale.

Ridurre ogni Ag HLA in un rosario di epitopi potrebbe originare informazioni biologicamente forse più rilevanti di quanto non forniscano i semplici antigeni HLA, pur in alta risoluzione

Se lo scopo del match HLA nei trapianti è di ridurre il numero dei target anticorpali, la logica progressione è quindi definire il match sulla base di questi bersagli anticorpali

“Tools for Epitope Matching”

match HLA in progress

$[X, P] = i\hbar$

$H = \frac{P^2}{2m} + \frac{1}{2} m \omega^2 x^2$

$H|\psi\rangle = E|\psi\rangle$

$[-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} + \frac{1}{2} m \omega^2 x^2] \psi(x) = E \psi(x)$

$\hat{X} = \sqrt{\frac{m\omega}{\hbar}} \hat{x}$

$[\hat{x}, \hat{p}] = i\hbar$

$\hat{H} = \frac{1}{2} (\hat{X}^2 + \hat{P}^2)$

$\hat{H}|\psi\rangle = E|\psi\rangle$

$a = \frac{1}{\sqrt{2}} (\hat{X} + i\hat{P})$

$a^\dagger = \frac{1}{\sqrt{2}} (\hat{X} - i\hat{P})$

$[a, a^\dagger] = 1$

$\hat{H} = a^\dagger a + \frac{1}{2}$

$\hat{H} = a a^\dagger - \frac{1}{2}$

$E = mc^2$

$a^\dagger |\psi_n\rangle = \sqrt{n+1} |\psi_{n+1}\rangle$

$a |\psi_n\rangle = \sqrt{n} |\psi_{n-1}\rangle$

$a |\psi_n\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} a a^\dagger |\psi_{n-1}\rangle = \frac{1}{\sqrt{n}} (a^\dagger a + 1) |\psi_{n-1}\rangle$

$= \sqrt{n} |\psi_{n-1}\rangle$

$X |\psi_n\rangle = \sqrt{\frac{\hbar}{m\omega}} \frac{1}{\sqrt{2}} (a^\dagger + a) |\psi_n\rangle$

$= \sqrt{\frac{\hbar}{2m\omega}} [\sqrt{n+1} |\psi_{n+1}\rangle + \sqrt{n} |\psi_{n-1}\rangle]$

$P |\psi_n\rangle = \sqrt{m\hbar\omega} \frac{i}{\sqrt{2}} (a^\dagger - a) |\psi_n\rangle$

$= i\sqrt{\frac{m\hbar\omega}{2}} [\sqrt{n+1} |\psi_{n+1}\rangle - \sqrt{n} |\psi_{n-1}\rangle]$

$\langle \psi_n | a | \psi_n \rangle = \sqrt{n} \delta_{n, n-1}$

$\langle \psi_n | a^\dagger | \psi_n \rangle = \sqrt{n+1} \delta_{n, n+1}$

$\langle \psi_n | X | \psi_n \rangle = \sqrt{\frac{\hbar}{2m\omega}} [\sqrt{n+1} \delta_{n, n+1} + \sqrt{n} \delta_{n, n-1}]$

$E = \frac{1}{2} m g L \theta^2$

$\frac{d\theta}{dt} = \left(\frac{2E - m g L \theta^2}{M L^2} \right)^{1/2} = \left(\frac{g}{L} \right)^{1/2} \left(\frac{2E}{M g L} - \theta^2 \right)^{1/2}$

$\frac{d\theta}{dt} = \left(\frac{g}{L} \right)^{1/2} \left(\theta_0^2 - \theta^2 \right)^{1/2}$

$\frac{dr}{dt} = \frac{dr}{d\phi} \frac{d\phi}{dt} = \frac{dr}{d\phi} \omega = \frac{dr}{d\phi} \frac{\Sigma}{\rho L^2}$

$\frac{d^2 r}{dt^2} = \frac{d^2 r}{d\phi^2} \left(\frac{\Sigma}{\rho L^2} \right)^2 + \frac{dr}{d\phi} \frac{\Sigma}{\rho L^2} \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{L^2} \right)$

$W(\phi) = \frac{1}{r(\phi)} \frac{d\omega}{d\phi} = -\frac{1}{r^2} \frac{dr}{d\phi}$

$\frac{d^2 r}{d\phi^2} = -\frac{1}{r^2} \left(\frac{\Sigma}{\rho} \right)^2 \frac{d^2 \omega}{d\phi^2} - \frac{\omega^2 \Sigma^2}{r^2} \frac{d^2 \omega}{d\phi^2}$

$= -\omega^2 G M_1 M_2 + \omega^2 \frac{\Sigma^2}{\rho} \frac{d^2 \omega}{d\phi^2} - \omega = \frac{\mu G M M}{J^2}$

$x^2 + y^2 + z^2 = c^2 t^2$

$x' = \frac{x - vt}{(1 - v^2/c^2)^{1/2}}$

$t' = \frac{t - (v/c^2)x}{(1 - v^2/c^2)^{1/2}}$

$E = \frac{Mc^2}{(1 - v^2/c^2)^{1/2}}$

$E = Mc^2 + \frac{1}{2} M v^2 + \dots$

$E^2 = p^2 c^2 + M^2 c^4$

$E = (p^2 c^2 + M^2 c^4)^{1/2}$

$\sum_{i=1}^n E_i = c^2$

$\Delta t' = \Delta t \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right)^{1/2}$

$E_0 = E + \frac{1}{2} E + \frac{1}{2} E_0$

$\frac{d\beta_x}{dt} = \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right)^{1/2} \frac{d\beta_x}{dt} = \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right)^{1/2} \frac{d\beta_x}{dt}$

$\frac{d\beta_z}{dt} = \frac{d\beta_z}{dt}$

$\Delta M = \frac{E}{c^2}$

$\frac{V}{c} = \frac{E}{E + M c^2}$

$b = \sqrt{1 - e^2}$



$r = \frac{a(1 - e^2)}{(1 - e \cos \phi)}$





$f = \frac{\omega}{2\pi} = \left(\frac{g}{L} \right)^{1/2}$

$N_a = (\vec{r} \cdot \vec{F})_a = 2Mg \sin \theta$

$J_a = (\vec{r} \times \vec{P})_a = -ML^2 \dot{\theta}$

$M \ddot{\theta} = -Mg \sin \theta$

$\ddot{\theta} + \frac{g}{L} \sin \theta = 0$

$F_a = -C_x$

$M \ddot{x} = -C_x$

$\ddot{x} + \frac{C}{M} x = 0$

$x = A \sin(\omega_0 t + \frac{1}{2}\pi) = A \cos(\omega_0 t)$

$K = \frac{1}{2} M \dot{x}^2 = \frac{1}{2} M [\omega_0 A \cos(\omega_0 t + \frac{1}{2}\pi)]^2$

$= \frac{1}{2} M \omega_0^2 A^2 \cos^2(\omega_0 t + \frac{1}{2}\pi)$

$= \frac{1}{2} M \omega_0^2 A^2 \cos^2(\omega_0 t)$

$\langle K \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T K dt = \frac{1}{2} M \omega_0^2 A^2 \frac{1}{T} \int_0^T \cos^2(\omega_0 t) dt$

$= \frac{1}{2} M \omega_0^2 A^2 \frac{1}{T} \int_0^T \frac{1 + \cos(2\omega_0 t)}{2} dt$

$= \frac{1}{4} M \omega_0^2 A^2 \left(\frac{1}{T} \int_0^T 1 dt + \frac{1}{T} \int_0^T \cos(2\omega_0 t) dt \right)$

$= \frac{1}{4} M \omega_0^2 A^2 \left(1 + \frac{\sin(2\omega_0 T)}{2\omega_0 T} \right)$

$\approx \frac{1}{4} M \omega_0^2 A^2$

$\langle K \rangle = \frac{1}{2} M \omega_0^2 A^2$

$E = \langle K \rangle = \langle U \rangle = \frac{1}{2} M \omega_0^2 A^2$

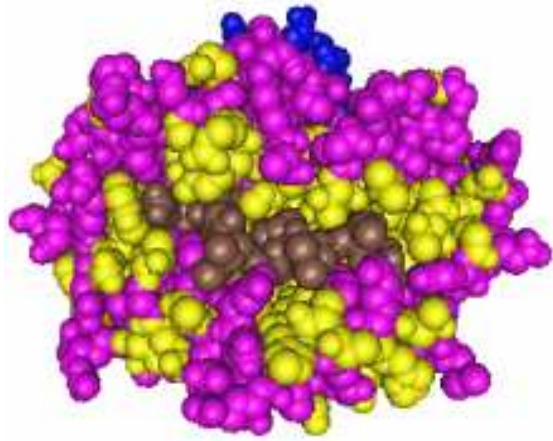
$\epsilon \neq 0 \Rightarrow |\epsilon_{z0}^{(t)}\rangle \in \mathcal{E}_\epsilon$

$\langle \mathcal{E}_\epsilon^{(t)} | \psi \rangle = \langle \mathcal{E}_\epsilon^{(t)} | \psi \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} dx \langle \mathcal{E}_\epsilon^{(t)} | \psi \rangle$

$\lim_{\epsilon \rightarrow 0} \mathcal{E}_\epsilon^{(t)}(x) = \mathcal{E}_0(x) \notin \mathcal{E}_\epsilon$

$\frac{dI}{dt} = \frac{1}{C} I dt = V$

$\frac{dI}{dt} + \frac{1}{C} I = V$



HLAMatchmaker

An Algorithm for Epitopes

Disponibile su :

<http://www.epitopes.net>



PIRCHE

Disponibile su :

<http://www.pirche.com>

**Entrambi gli algoritmi sono gratuiti
e assolutamente free**

HLAMatchmaker e PIRCHE

Entrambi gli algoritmi hanno lo scopo di predire l'immunogenicità dei mismatch HLA, che viene quantificata attraverso il numero di mismatch a livello di epitopi:

- ✓ **HLAMatchmaker** calcola in modo diretto i legami Ab IgG-epitopo antigenico sulle cellule B, quindi predice quali mismatch antigenici HLA possano indurre la formazione di Ab anti HLA
- ✓ **PIRCHE** fornisce un valore dei peptidi HLA del donatore che indirettamente, dopo legame con le cellule T del ricevente, sono potenzialmente in grado di indurre la produzione di Ab anti-HLA donatore-specifici, quindi predice la reattività T cellulare verso le molecole HLA allogeniche.

HLAMatchmaker

L'algoritmo si basa sul disegno teorico di aree di residui aminoacidici polimorfici, le eplet, presenti sugli Ag HLA del donatore e non del ricevente ed accessibili agli anticorpi.

Lo scopo è predire la risposta umorale dopo evento immunizzante quale gravidanza o trapianto.

HLAMatchmaker: A Molecularly Based Algorithm for Histocompatibility Determination. II. Verification of the Algorithm and Determination of the Relative Immunogenicity of Amino Acid Triplet-Defined Epitopes

René J. Duquesnoy and Marilyn Marrari

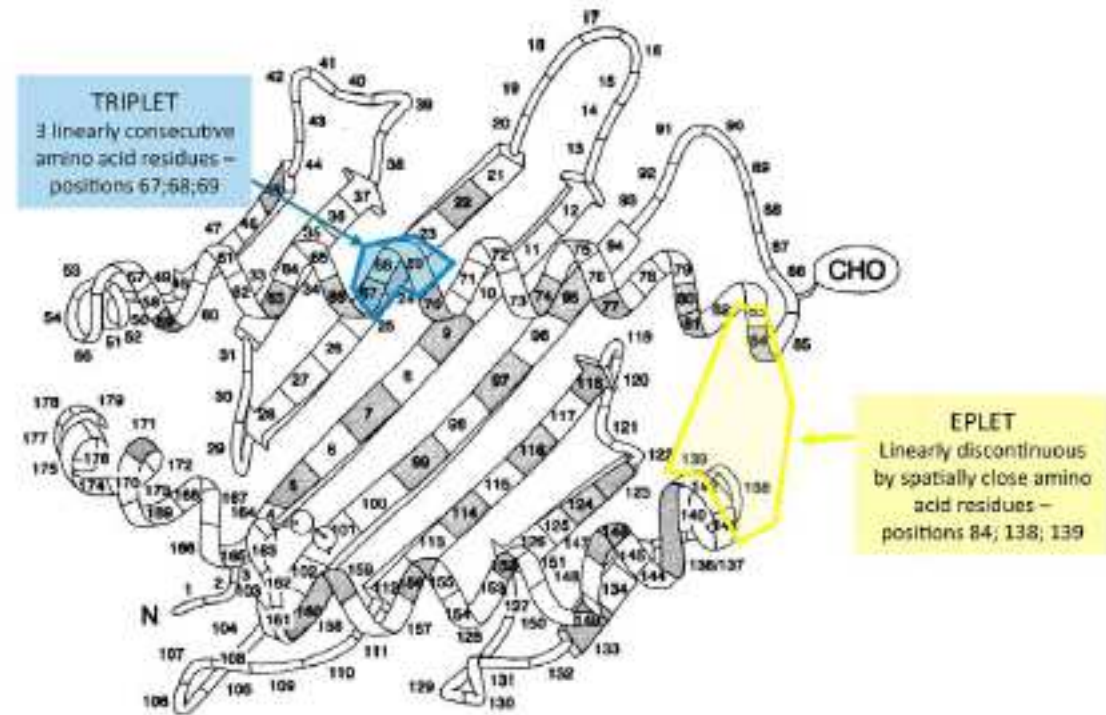
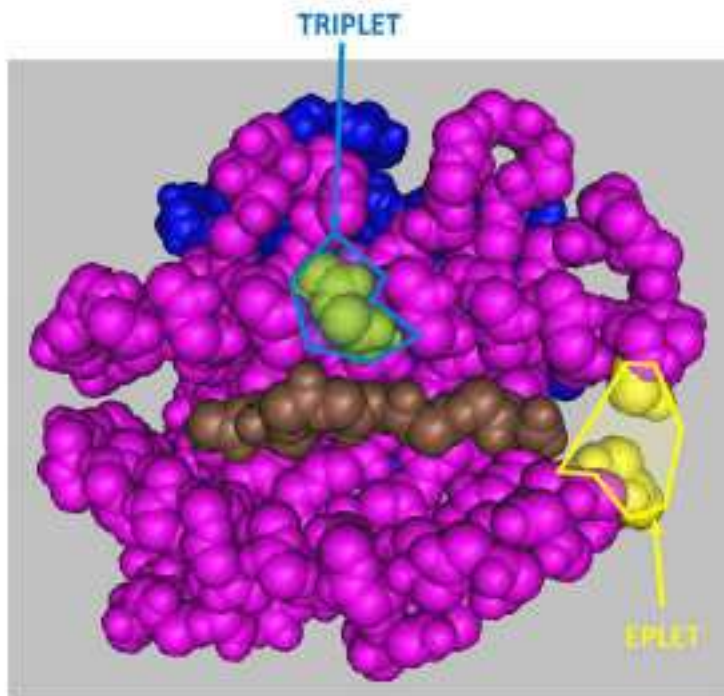


Prof. René Duquesnoy

HLAMatchmaker

- ✓ E' un algoritmo che determina la compatibilità tra donatore e ricevente valutando un modello molecolare tridimensionale dell'interfaccia epitopo-paratopo del complesso antigene-anticorpo.
- ✓ La prima versione considerava ogni Ag HLA come una stringa di corte sequenze lineari di residui aminoacidici polimorfici, dette **triplette**
- ✓ La versione attuale è invece basata sulle **eplets**, sequenze anche discontinue di aminoacidi, ma in posizione accessibile agli anticorpisono e tra di loro spazialmente vicini nel raggio di 3 Å .
- ✓ E' richiesto il typing esteso del donatore a 4 digit, non solo per i loci ABDR, ma anche C, DRB_{3/4/5}, DP e DQA₁/DQB₁

Differenza tra tripletta ed eplet



Come funziona HLAMatchmaker?

Donor HLA Typing	HLA (Antigen) Mismatches	Mismatched Eplets		HLA (Eplet) Mismatches		
		Verified	Unverified	Verified	Unverified	Total
Donor 1						
A*03:01	1	144KR, 161D	71QS, ^a 182TDP, ^b 276L ^c	2	3	5
A*30:01	1	17RS, 56R	71QS, ^a 182TDP, ^b 276L ^c	2	3	5
B*08:01	1	156DA, 180E	177DT	2	1	3
B*49:01	1	41T	76EN, 152RE	1	2	3
Total	4			7	6	13
Donor 2						
A*01:01	1	44KM, 76ANT, 90D, ^d 144KR, 163R, 163RG, 166DG	151HA, 182TDP, 276L	7	3	10
A*25:01	1	62RR, 90D, ^d 149TAH, 163R, 163RW	156WA	5	1	6
B*07:02	1	65QIA, 69AA, 70IAQ, 163EW, 180E	66IY, 152RE, 156RA, 177DK	5	4	9
B*44:03	1	41T, 80TLR	76EN	2	1	3
Total	4			18 ¹⁹	9	27

Da : Sypek et al. AJKD, vol.71; 720-731 2018

Donatore e ricevente devono essere tipizzati a 4 digit di risoluzione

Rappresentazione dei mismatch a livello di Ag HLA e a livello di eplet ottenuti mediante HLAMatchmaker tra un potenziale ricevente (A*02:01, A*32:01; B*18:01, B*35:01) e due potenziali donatori. Gli eplet verificati rappresentano epitopi confermati di legame con l'Ab, quelli non verificati sono descrizioni teoretiche di epitopi. Rimangono non verificati la maggior parte degli epitopi su alleli rari o non comuni. Tra questi ultimi possono essere presenti anche strutture polimorfiche prive di importanza biologica

HLAMatchmaker: A MOLECULARLY BASED ALGORITHM FOR HISTOCOMPATIBILITY DETERMINATION. III. EFFECT OF MATCHING AT THE HLA-A,B AMINO ACID TRIPLET LEVEL ON KIDNEY TRANSPLANT SURVIVAL¹

RENE J. DUQUESNOY,^{2,6} STEVE TAKEMOTO,³ PETER DE LANGE,⁴ ILIAS I. N. DOXIADIS,⁴
GEZIENA M. TH. SCHREUDER,⁴ GUIDO G. PERSIJN,⁵ AND FRANS H. J. CLAAS⁴

Sono state valutate due ampie casistiche (UNOS ed Eurotransplant) di trapianti a 0 mm DR e con diversi gradi di mm ai loci A e B : organi con mismatches a livello dei loci A e B, ma che presentavano un basso carico di eplet mismtch avevano la stessa sopravvivenza di quelli a 0 A e 0 B mismatch intesi a livello antigenico.

TABLE 4. Effect of HLA-A,B triplet mismatching on graft survival of zero-HLA-DR-mismatched kidneys in Eurotransplant

Mismatch group	0 AB Ag	0 trp	1 trp	2 trp	3 trp	4 trp	5–9 trp	10–19 trp	20–29 trp
Number of recipients	3426	231	218	377	450	629	3448	6078	943
% Graft survival after									
1 yr	89.3	89.2	86.7	85.7	89.1	88.4	85.1	85.4	84.3
2 yr	87.1	85.1	84.3	82.1	86.7	84.1	81.5	80.6	80.0
3 yr	83.7	82.3	80.7	78.3	82.4	81.1	77.4	76.7	76.1
5 yr	76.8	75.6	76.4	72.9	75.4	75.9	69.9	69.8	68.5

Epitope matching per i pazienti immunizzati

Dove l'epitope matching dà il suo meglio è nel trovare donatori compatibili per i pazienti altamente immunizzati

0041-1337/03/7506-889/0

TRANSPLANTATION

Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins, Inc.

Vol. 75, 889–897, No. 6, March 27, 2003

Printed in U.S.A.

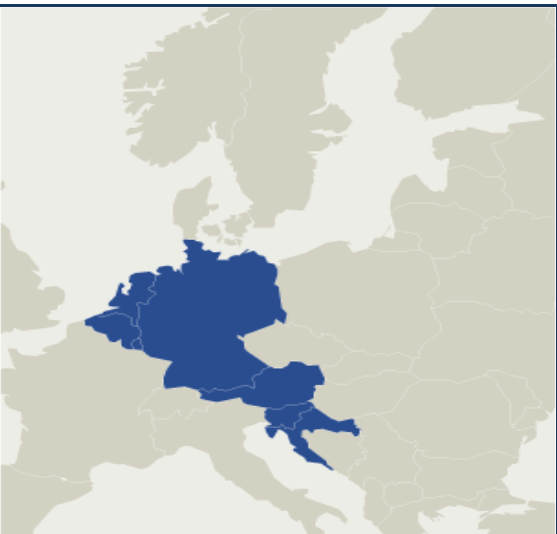
HLAMATCHMAKER: A MOLECULARLY BASED ALGORITHM FOR HISTOCOMPATIBILITY DETERMINATION. IV. AN ALTERNATIVE STRATEGY TO INCREASE THE NUMBER OF COMPATIBLE DONORS FOR HIGHLY SENSITIZED PATIENTS¹

RENE J. DUQUESNOY,^{2,4} JUDY HOWE,² AND STEVE TAKEMOTO³

Gli AA. hanno valutato la probabilità di trovare un donatore con 0, al massimo 2 mismatch a livello di epitopi (triplette) per pazienti con PRA>85%.

Usando HLAMatchmaker la probabilità di trovare un donatore compatibile è maggiore utilizzando, come criterio di allocazione, i mismatch accettabili, piuttosto che limitando il match all'identità antigenica HLA.

L'epitope matching è un po' come lo spread : l'Italia ha l'INKA, la Germania, dal 2004, l' Acceptable Mismatch (AM) Program....



L'Eurotransplant ha subito accettato quest'approccio per la ricerca di donatori per pazienti altamente sensibilizzati attuando l'Acceptable Mismatch Program e dimostrando in breve tempo una riduzione dei tempi di attesa per questi pazienti ed un'eccellente sopravvivenza del trapianto, paragonabile a quella dei pazienti non sensibilizzati

The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome

Frans H. J. Claas,^{1,2} Marian D. Witvliet,¹ René J. Duquesnoy,³ Guido G. Persijn,⁴ and Ilias I. N. Doxiadis^{1,2,5}
(*Transplantation* 2004;78: 190–193)

In questo Programma è definito Mismatch Accettabile ogni mismatch antigenico contro cui i pazienti non abbiano mai formato Ab (Virtual Crossmatch negativi) o quelli identificati dal programma HLAMatchmaker

TABLE 1. Validation of the HLA-Matchmaker19 by direct crossmatches

HLA-A mismatch			
0 triplet 1 triplet	Expected negative	Observed negative	
	18 25	18 25	
HLA-B mismatch			
0 triplet 1 triplet	Expected negative	Observed negative	
	54 133	54 131	

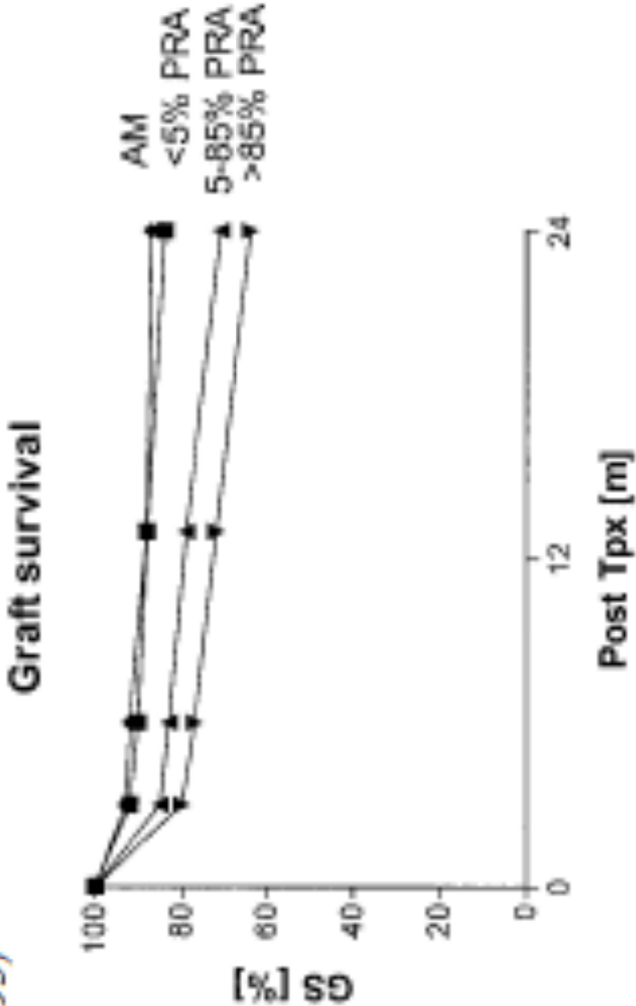
HLA, human leukocyte antigen.

(Transplantation 2004;78: 190–193)

Trattasi di CDC cross match

Dall’ inserimento del Programma “Accettable Mismatch” in Eurotransplant il tempo di attesa dei pazienti iperimmuni si è ridotto del 50% con sopravvivenza a breve termine

(e a lungo termine) sovrapponibile a quella dei pazienti non sensibilizzati



Quantitative eplet matching theory : ruolo del carico di epitopi

	HLA (Antigen) Mismatches	HLA (Eplet) Mismatches		
		Verified	Unverified	Total
Donor 1	1	2	3	5
	1	2	3	5
	1	2	1	3
	1	1	2	3
	4	7	6	13
Donor 2	1	7	3	10
	1	5	1	6
	1	5	4	9
	1	2	1	3
	4	18	9	27

vs

19

Pur a parità di mismatch HLA, il Donatore 1 ha potenzialmente un minor numero di target anticorpali (solo per i verificati 7 vs 19) e quindi è a minor rischio di determinare una risposta immune umorale

Da : Sypek et al. AJKD, vol.71; 720-731 2018

American Journal of Transplantation 2013; 13: 3114–3122
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2013 The American Society of Transplantation
and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/ajt.12478

Class II HLA Epitope Matching—A Strategy to Minimize *De Novo* Donor-Specific Antibody Development and Improve Outcomes

C. Wiebe^{1,2}, D. Pochinco³, T. D. Blydt-Hansen⁴,
J. Ho¹, P. E. Birk⁴, M. Karpinski¹, A. Goldberg⁴,
L. J. Storsley¹, I. W. Gibson^{3,5}, D. N. Rush¹
and P. W. Nickerson^{1,2,3,*}

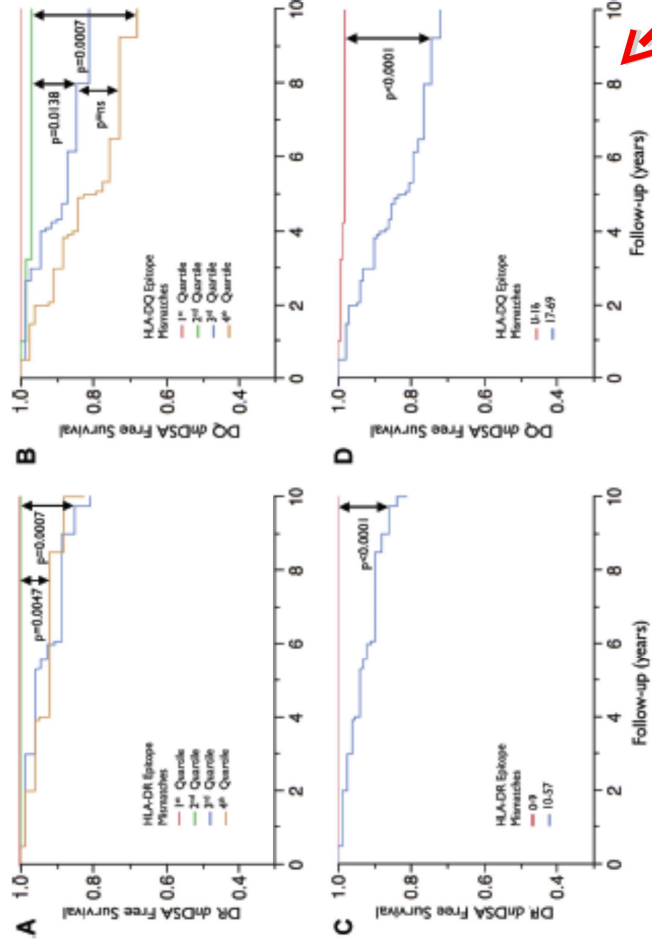


Table 2: Multivariate models of *dn*DSA predictors¹

Model	HLA Loci	Predictors	Odds ratio (per unit change)	Odds ratio (over entire range)	p-Value
A: Clinical predictors	HLA-DR	Nonadherence	6.0 (2.1–17.0)	–	<0.001
		HLA-DR epitope mismatch load	1.06 (1.03–1.10)	32.8 (4.6–258.7)	<0.001
		Clinical rejection preceding <i>dn</i> DSA	2.6 (1.5–4.6)	120.4 (7.9–2138.0)	<0.001
	HLA-DQ	Nonadherence	8.5 (3.6–20.0)	–	<0.001
		HLA-DQ epitope mismatch load	1.04 (1.0–1.02)	14.0 (2.9–70.7)	<0.001
		Younger age	1.03 (1.0–1.10)	8.9 (1.7–47.9)	<0.01
B: Epitope predictors (adherent patients, n = 247)	HLA-DR	48YQ (TerEp# undefined) 14SEH (TerEp#1006) 71DRA/71DEA (TerEp#1018)	4.7 (1.2–16.6) 1.6 (0.9–2.8) 4.0 (1.4–10.4)	22.1 (1.5–276.3) 7.3 (0.5–63.9) 15.6 (2.0–108.8)	<0.02 NS <0.01
	HLA-DQ	45GE/52LL/71RKA (TerEp#2001) 52PL/140T/182N (TerEp#2014) 52PQ/84EV (TerEp#2004)	0.7 (0.04–3.4) 3.0 (1.2–7.4) 2.4 (1.1–4.9)	0.4 (0.001–11.4) 9.2 (1.4–52.3) 5.8 (1.3–24.1)	NS <0.02 <0.02

¹Odds ratios with 95% confidence intervals. *dn*DSA, *de novo* donor-specific antibody; HLA, human leukocyte antigen.

Gli AA. hanno dimostrato che i pazienti che sviluppano DSA *de novo* anti DR o anti DQ hanno un maggior numero di epitope mismatch locus specifici (A e B). Quindi eplet mismatch ai loci DR e DQ sono associati a AMR e a glomerulopatia del trapianto. Sono anche riusciti ad indicare una soglia ottimale di epitope mismatch che determini una minima o addirittura nulla formazione di DSA: <10 per HLA DR e <17 per HLA DQ (C e D)

Studi clinici che esaminano il ruolo dei mismatch a livello di eplet nel trapianto di organi solidi (anni 2006-2016)

Table 3. Summary Table of Clinical Studies Examining Eplet Mismatches in Solid-Organ Transplantation

Study	Organ	Outcome Measure	Study Design	Key Findings
Dankers et al ²² (2006)	Kidney	De novo DSA formation	Retrospective cohort study	Strong correlation between no. of class I triplet mismatches and percentage of patients producing DSA ($r^2 = 0.99$, $P < 0.0001$) No patients with 0 triplet mismatches produced de novo DSA compared to 94% of patients with ≥ 10 mismatches
Weber et al ²³ (2013)	Kidney	De novo DSA formation	Prospective cohort study	There were more locus-specific EpMMs in patients who developed de novo DSA (HLA-DQ, 31.4 vs 13.2; HLA-DR, 3.25 vs 1.73) EpMM thresholds for low risk for de novo DSA were identified (10 for HLA-DQ, 17 for HLA-DR) In a multivariate model, locus-specific EpMMs were an independent predictor of de novo DSA (OR of 1.04 per mismatch)
Sapin-Pichhadze et al ²⁴ (2014)	Kidney	Transplant glomerulopathy	Nested case-control study	Increased odds of transplant glomerulopathy with higher EpMMs (ORs of 2.84 and 4.63 for 37-40 and ≥ 40 mismatches, respectively, vs ≤ 37) OR for transplant glomerulopathy was 1.25 (95% CI, 1.04-1.50) for every 10 EpMMs when modeled as a continuous variable
Kozmolluoglu et al ²⁵ (2015)	Kidney	De novo DSA and sensitization	Prospective cohort study	EpMM score was associated with risk for developing class II de novo DSA, but not class I de novo DSA or sensitization Electrostatic mismatch score was associated with class I and class II de novo DSA formation and sensitization
Weber et al ²³ (2015)	Kidney	Rejection and graft loss	Prospective cohort study	Higher EpMM and poor adherence acted synergistically to determine risk for rejection and graft loss Graft loss 33% vs 8% for HLA-DR EpMM ≥ 10 and poor adherence vs EpMM < 10 with good adherence
Singh et al ²⁶ (2016)	Kidney	Sensitization	Retrospective cohort study	HLA-DQB1 EpMM (but not DQA1 or -DRB1) $\geq 10/4/6$ eplet mismatch) was associated with becoming highly sensitized following graft failure (OR, 1.34; 95% CI, 1.01-1.80)
Walton et al ²⁷ (2016)	Lung	Chronic lung allograft dysfunction	Retrospective cohort study	Class II EpMM was a significant predictor of this outcome (HR, 3.77 [95% CI, 1.71-8.35] for top quartile vs bottom quartile); this association was not seen for class I EpMM
Sullivan et al ²⁸ (2016)	Heart (pediatric)	Graft failure	Retrospective cohort study	Recipients with 10-20 or ≥ 20 class I EpMM experienced increased graft loss compared with recipients with < 10 class I EpMMs (HRs of 1.23 [95% CI, 1.06-1.40] and 1.37 [95% CI, 1.08-1.70], respectively)

Abbreviations: CI, confidence interval; DSA, donor-specific antigen; EpMMs, eplet mismatches; HR, hazard ratio; OR, odds ratio.

Tutti questi studi concludono che strategie per ridurre il numero dei mismatch a livello di eplet, sono premiate da una minor formazione di Ab anti HLA, ridotta incidenza di AMR, insufficienza del graft e minor incidenza di ritrapianti a causa della sensibilizzazione

Da : Sypek et al. AJKD, vol.71; 720-731 2018

Pensiamo ai giovani :

Pediatr Transplantation 2016; 20: 926–930

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Pediatric Transplantation

DOI: 10.1111/ptr.12762

Donor selection in pediatric kidney transplantation using DR and DQ eplet mismatching: A new histocompatibility paradigm

Bryan CF, Chadha V, Warady BA. (2016) Donor selection in pediatric kidney transplantation using DR and DQ eplet mismatching: A new histocompatibility paradigm. *Pediatr Transplant*, 20: 926–930. DOI: 10.1111/ptr.12762.

**Christopher F. Bryan¹, Vimal Chadha²
and Bradley A. Warady²**

¹Midwest Transplant Network Laboratory,
Westwood, KS, USA, ²Division of Nephrology,
Children's Mercy Hospital, Kansas City, MO, USA



Ovviamente chi si gioverebbe maggiormente di un miglioramento nel match HLA sarebbero i pazienti giovani:

In questo studio retrospettivo gli AA. hanno dimostrato che il 40% degli organi offerti con 1 mm DR ed il 64% di quelli con 2 mm DR erano sopra la soglia dei 10 eplet mm indicata da Wiebe

Ragionare in termini di epitopi permette di comprendere meglio la reattività anticorpale osservata dopo un evento sensibilizzante

Un mismatch antigenico, infatti, può indurre la comparsa di Ab reattivi non solo con l'Ag immunizzante, ma anche con altri Ag che condividono epitopi con quel determinato Ag



Comparsa di anticorpi non donatore specifici nel post - trapianto

????????????????????

Immunogenicità dei mismatches HLA

Biology of Blood and Marrow Transplantation 14:1064-1071 (2008)
© 2008 American Society for Blood and Marrow Transplantation
1083-8791/08/1409-0001\$32.00/0
doi:10.1016/j.bbmt.2008.07.001

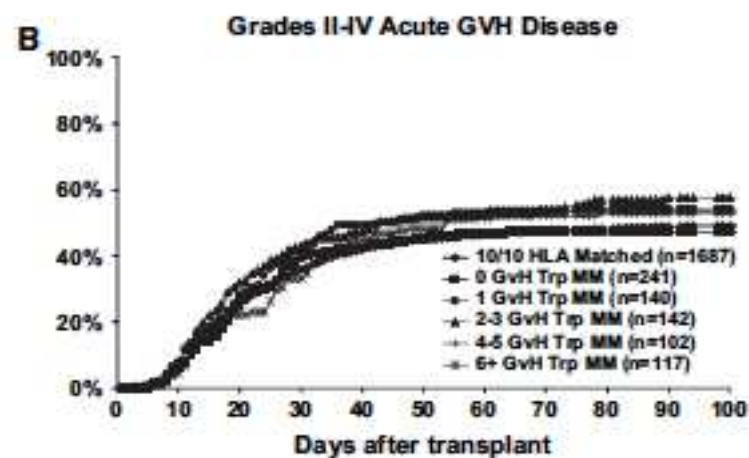
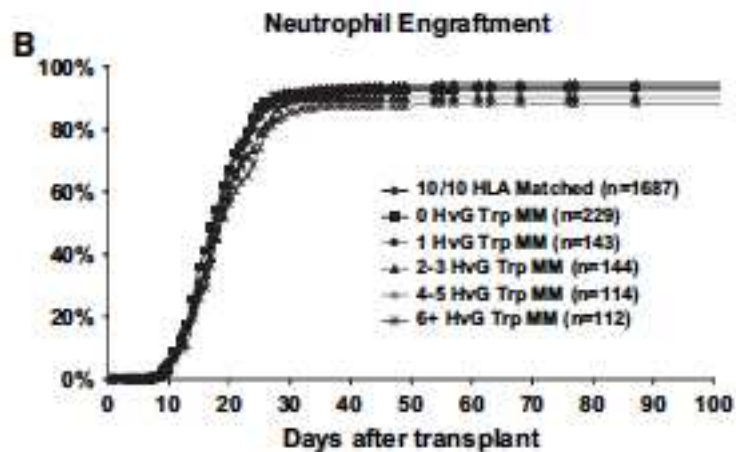
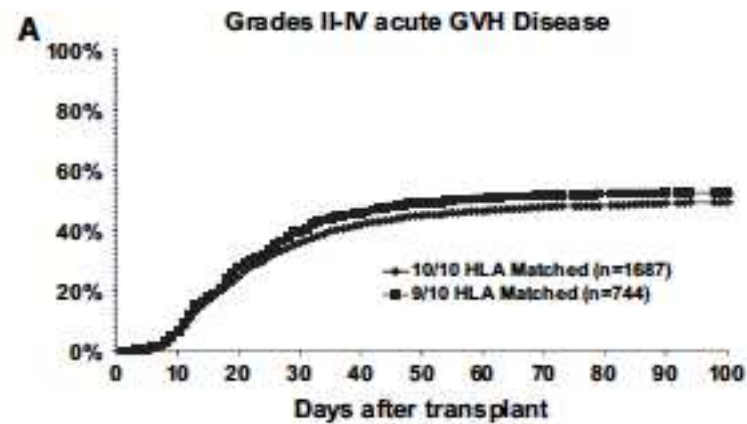
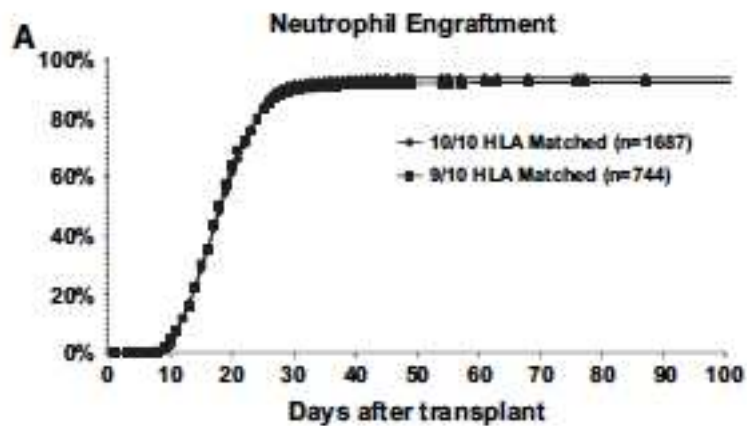


HLAMatchmaker-Defined Triplet Matching Is Not Associated with Better Survival Rates of Patients with Class I HLA Allele Mismatched Hematopoietic Cell Transplants from Unrelated Donors



*Rene Duquesnoy,¹ Stephen Spellman,² Michael Haagenson,³ Tao Wang,⁴ Mary M. Horowitz,⁴
Machteld Oudshoorn⁵*

Ma nemmeno Duquesnoy ed il suo HLAMatchmaker, che considera le basi strutturali degli epitopi sugli Ag HLA, è riuscito a dimostrare, contrariamente a quanto avviene per il trapianto renale, una correlazione positiva tra il grado di mismatch a livello di epitopi (prima versione = triplette) e la sopravvivenza del paziente, l'engraftment e la GHVD



Da Duquesnoy et al. 2008

Il mancato effetto positivo del match basato sulle triplette risiede nel fatto che HLAMatchmaker considera la compatibilità a livello umorale : si basa cioè sull'identificazione strutturale di epitopi antigenici esposti sulla superficie delle molecole HLA ed accessibili agli Ab

Ma anche HLAmatchmaker non fornisce tutte le risposte

Fornisce infatti informazioni solo sulla risposta umorale B cellulare, non su quello che accade prima e che si riferisce al processamento dell' antigene, la sua presentazione e l'attivazione delle cellule T.

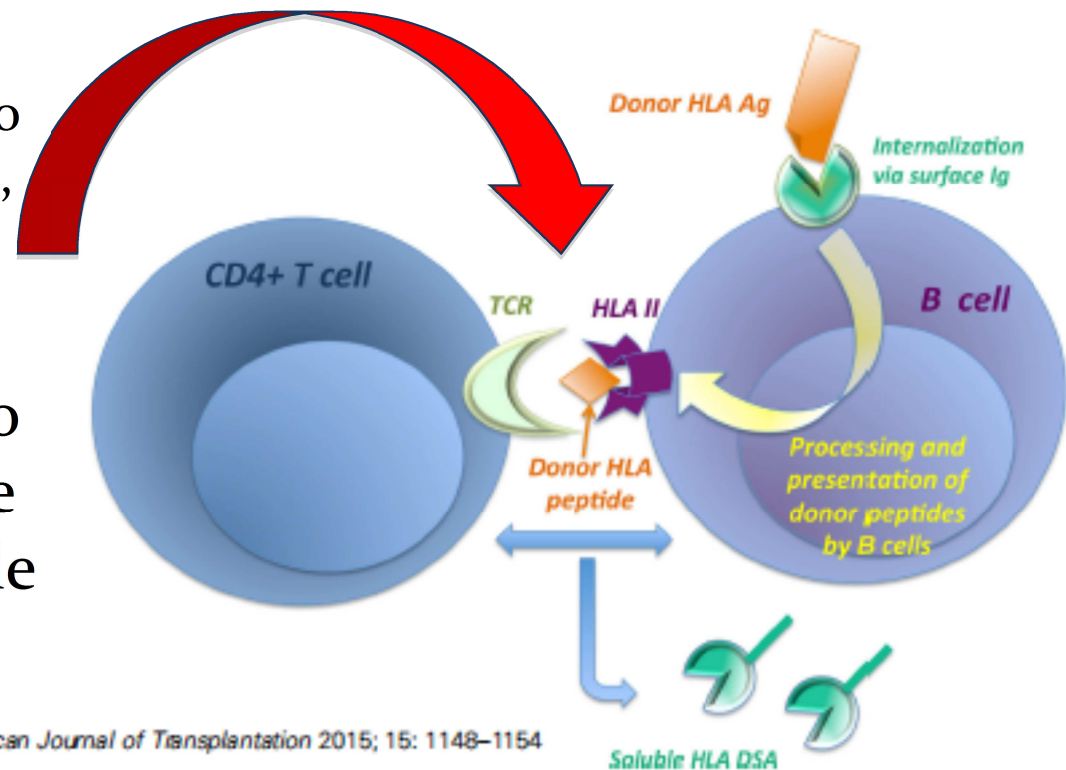
ENTRANO IN SCENA I LINFOCITI T

Abbiamo imparato che i pazienti sviluppano Ab contro un ristretto numero di mismatch a livello di epitopi, ma ci sono pazienti che non sviluppano anticorpi nonostante un elevato grado di mismatch con i loro donatori.

Uno dei fattori coinvolti è probabilmente legato al fenotipo HLA di Classe II del ricevente e come questo può influenzare le interazioni tra le cellule B e le cellule TCD₄⁺.

Tali interazioni necessitano dell'indiretto riconoscimento dei peptidi del donatore, presentato dagli Ag di Classe II sulle cellule B.

Le cellule B, infatti internalizzano l'Ag del donatore, lo processano e ne presentano i peptidi alle cellule TCD₄⁺ mediante gli Ag HLA di Classe II



A questo punto arriva il PIRCHE – (I o II)

Per spiegare la generazione o non generazione di DSA *de novo* in pazienti non immunizzati che ricevono e perdono un trapianto con simili mismatch. L'algoritmo PIRCHE predice gli epitopi che sono presenti a livello dei mismatch HLA e che sono coinvolti nella risposta immune T-cellulo mediata

Che è l'acronimo di :

P redicted

I ndirectely

R ecognizable

C lass II presented

H LA

E pitopes

(**I o II** – HLA **C** lass I or II)

Human Immunology 74 (2013) 290–296

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm



Predicted indirectly recognizable HLA epitopes presented by HLA-DR correlate with the *de novo* development of donor-specific HLA IgG antibodies after kidney transplantation

Henny G. Otten^{a,1}, Jorg J.A. Calis^{b,1}, Can Keşmir^b, Arjan D. van Zuilen^c, Eric Spierings^{a,*}

^a Department of Immunology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

^b Department of Theoretical Biology/Bioinformatics, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

^c Department of Nephrology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

La risposta anticorpale anti HLA dipende non solo dagli antigeni del donatore, ma anche dal fenotipo HLA del ricevente

Ad es. il fenotipo HLA DR del ricevente influenza la produzione di anticorpi specifici anti Bw4 ed il grado di sensibilizzazione anticorpale verso Ag di classe I.

La produzione di Ab anti Bw4 correla con la presenza del fenotipo DR₁ o DR₃ del ricevente

Allo stesso modo il fenotipo HLA DRB₁*15:01 pare aumentare la produzione di Ab anti A₂, nei trapianti con mismatch A₂

(*Fuller et al. Transplantation 1999; 68:173-182; Dankers et al. Hum. Immunol. 2004;65.13-19; Papassavas et al. Transplantation 2002; 73:642-651*)



Queste osservazioni suggeriscono un ruolo per un riconoscimento indiretto di peptidi donatore-specifici sulle molecole HLA di Classe II delle APC (Antigen Presenting Cell) del paziente e potrebbe spiegare il ruolo della risposta T-helper nel determinare la produzione di DSA di Classe IgG.

Matching donor and recipient based on predicted indirectly recognizable human leucocyte antigen epitopes

K. Geneugelijk  | E. Spierings

Int J Immunogenet. 2018;45:41-53.

Le cellule T giocano un ruolo chiave sia sia nell'alloreattività mediata dagli stessi linfociti T che dai linfociti B.

Esistono 3 distinte modalità di interazione tra i linfociti T e le molecole HLA allogeniche :

- 1. Riconoscimento diretto** : riconoscimento diretto delle molecole HLA allogeniche localizzate sulla superficie cellulare da parte delle cellule T
- 2. Riconoscimento indiretto** : riconoscimento degli epitopi non corrispondenti presentati dagli Ag HLA non allogenici: questo richiede il processamento e la presentazione dell'Ag
- 3. Riconoscimento semidiretto** : riconoscimento del complesso allogenico HLA-peptide trasferito da una cellula allogenica ad una APC nonallogenica

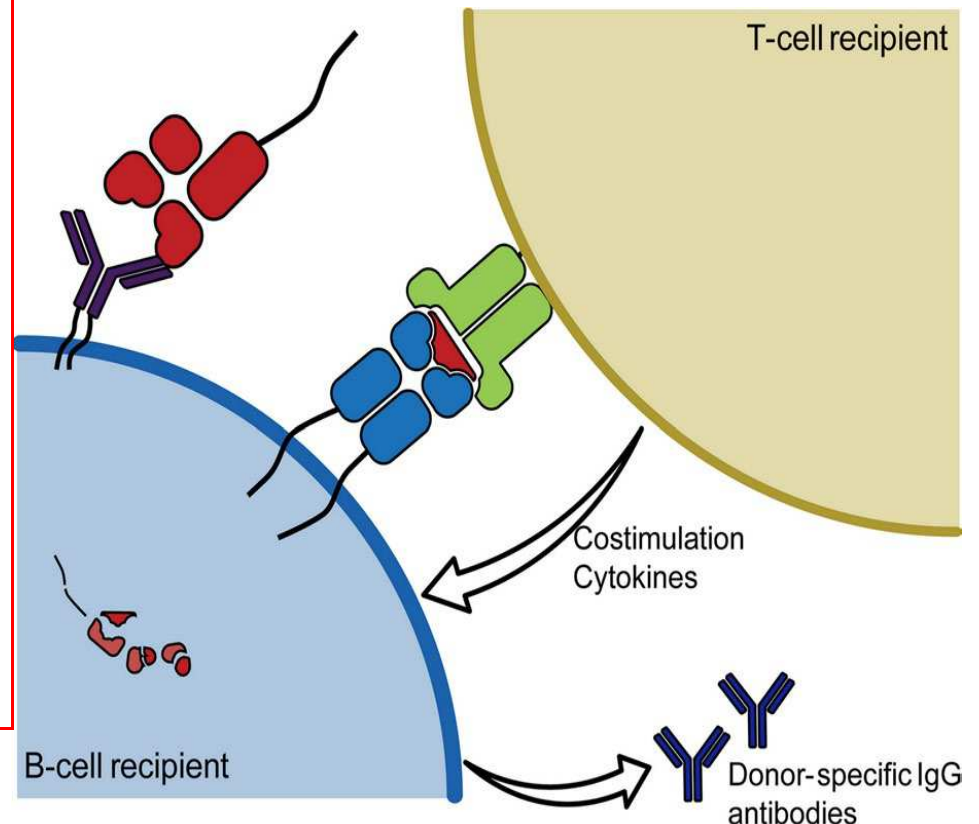
Molecole HLA diverse tra donatore e ricevente vengono riconosciute ed internalizzate dai linfociti B del ricevente.

Dopo processazione intracellulare gli epitopi HLA mismatched vengono esposti sulla superficie cellulare nel contesto degli Ag HLA di Classe II.

Le cellule TCD4⁺ del ricevente, interagiscono con i linfociti B, stimolano la produzione di citochine che determinano:

- la differenziazione da cellule B *naïve* a cellule B di memoria e plasmacellule
- lo switch isotipico da IgM a IgG
- la sintesi di Ab IgG Donatore specifici.

Riconoscimento indiretto



Il riconoscimento indiretto gioca un ruolo chiave nella GVHD e nel rigetto

PIRCHE predice, per ogni mismatch tra donatore e ricevente il numero dei peptidi, derivati da questi mismatch, che possono essere presentati nel contesto di molecole HLA di Classe I e Classe II (mediante il “core predictor”: NetMHCII).

Viene ritenuto cruciale il nonamero aminoacidico che occupa la tasca di legame.

PIRCHE ignora i leganti HLA presenti sia nel donatore che nel ricevente detti self-epitopi in quanto non determinano una risposta T rilevante.

Per tutti i mismatch di Classe I, il valore di PIRCHE II rende ragione della potenziale risposta anticorpale contro gli epitopi HLA di Classe I.

Review Article

Predicting Alloreactivity in Transplantation

Kirsten Geneugelijk, Kirsten Anne Thus, and Eric Spierings

Laboratory for Translational Immunology, UMC Utrecht, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht, The Netherlands

Correspondence should be addressed to Kirsten Geneugelijk; c.c.a.geneugelijk-2@umcutrecht.nl

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Immunology Research
Volume 2014, Article ID 159479, 12 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/159479>

Valori di PIRCHE

Per ogni coppia donatore-ricevente può essere calcolato il numero totale di epitopi riconoscibili : dal PIRCHE I quelli che teoricamente saranno riconosciuti dalle cellule TCD8+ citotossiche e quelli II dalle cellule TCD4+ helper.

Elevati livelli di PIRCHE I sono associati ad elevati livelli di alloreattività TCD8+ dopo il trapianto, mentre elevati livelli di PIRCHE II sono associati ad elevati livelli di reattività CD4+.

Nel trapianto di CSE è opportuno analizzare entrambi i valori di PIRCHE, mentre nel trapianto di organi solidi l'analisi viene solitamente ristretta al modello II, dal momento che è quello associato all'attivazione dei linfociti T helper.

PIRCHE e trapianto di CSE

- ✓ Trapianti unrelated 9/10 con bassi valori di PIRCHE I e II avevano lo stesso outcome di trapianti unrelated 10/10.
- ✓ Anche l'effetto GVL sembra legato ai valori di PIRCHE : alti valori di PIRCHE I erano correlati a minor incidenza di ripresa di malattia rispetto ai trapianti di sangue cordonale a basso PIRCHE I. Nessuna associazione per PIRCHE II.
- ✓ PIRCHE I potrebbe indicare un effetto anti neoplastico promuovendo l'alloreattività CD8+ contro le cellule leucemiche.

PIRCHE e trapianto di organi solidi

Su 2787 trapianti di rene, con maggior effetto su Ab anti Classe II che I

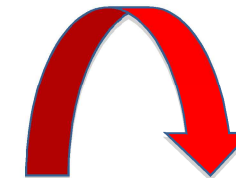
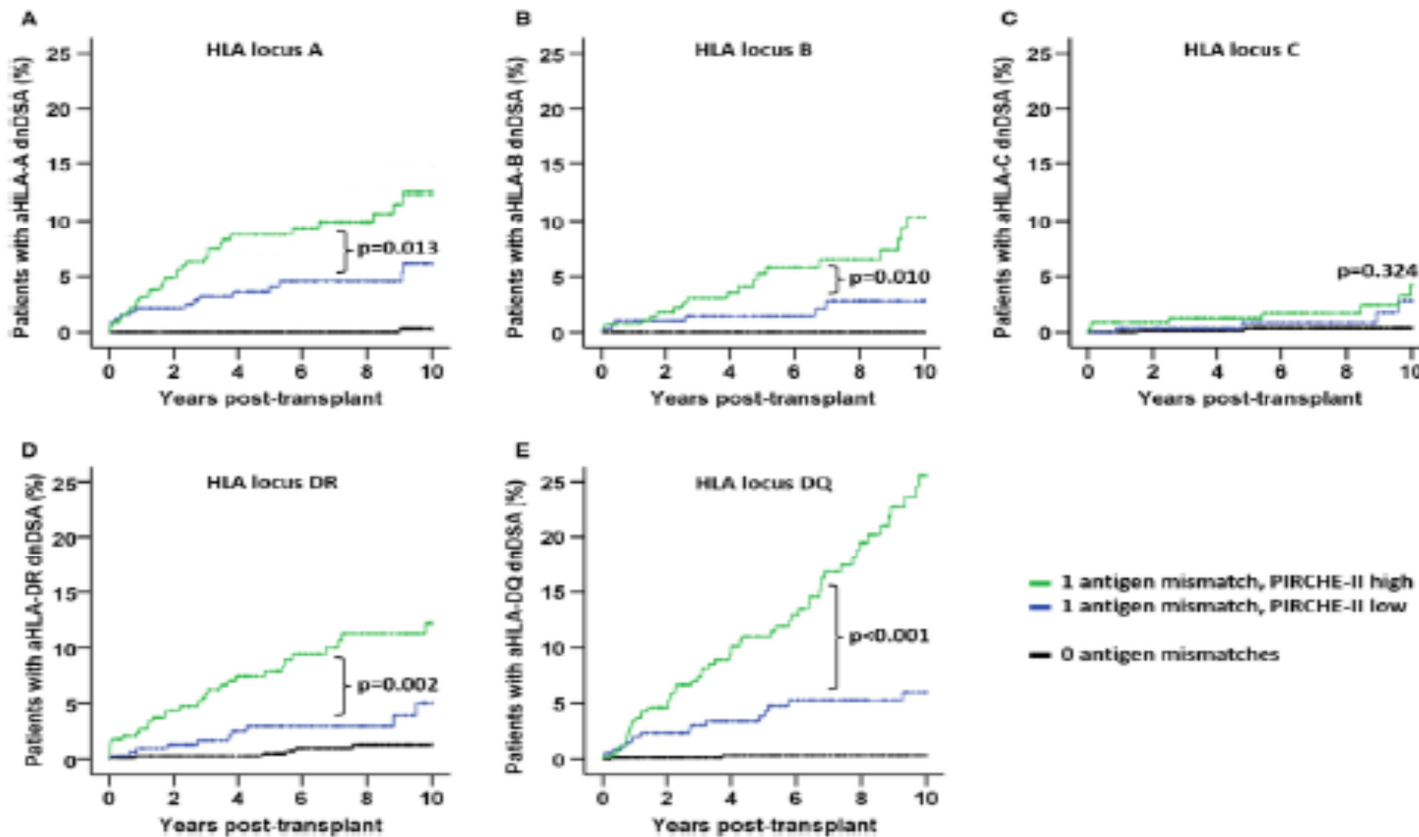
American Journal of Transplantation 2017; 17: 3076–3086
Wiley Periodicals Inc.

© 2017 The American Society of Transplantation
and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/ajt.14393

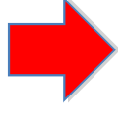
Donor–Recipient Matching Based on Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes Independently Predicts the Incidence of *De Novo* Donor-Specific HLA Antibodies Following Renal Transplantation

N. Lachmann^{1,*}, M. Niemann², P. Reinke^{3,†},
K. Budde³, D. Schmidt³, F. Halleck³, A. Prüss⁴,
C. Schönemann¹, E. Spierings⁵ and O. Staack³



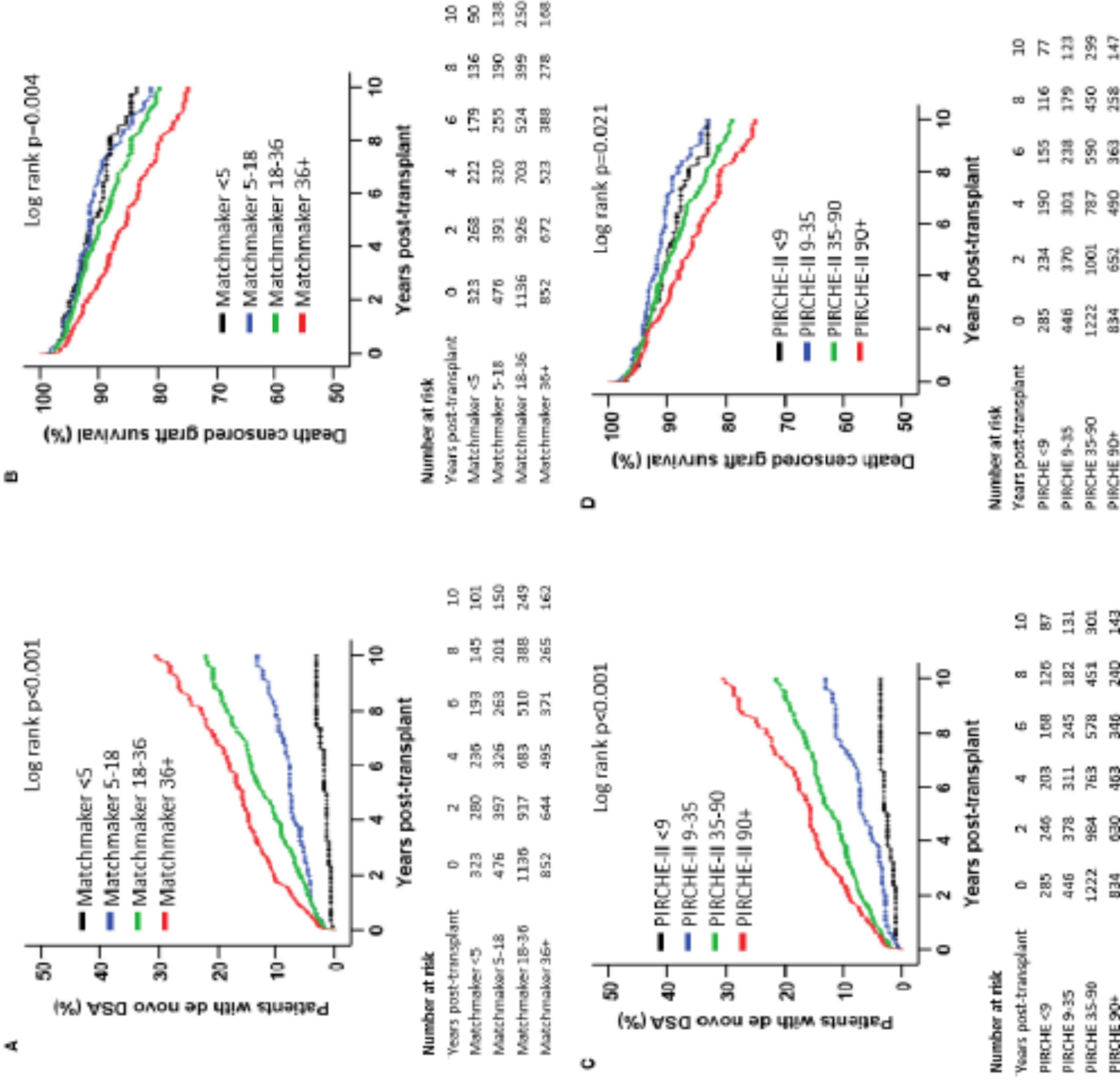
Incidenza cumulativa di DSA *de novo* stratificati secondo lo score PIRCHE in pazienti con 0 - 1 epitope mismatch al singolo locus HLA

Epitope mismatch e outcome



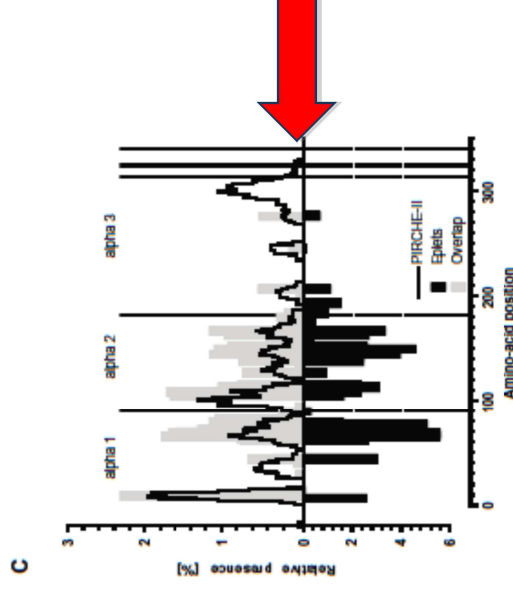
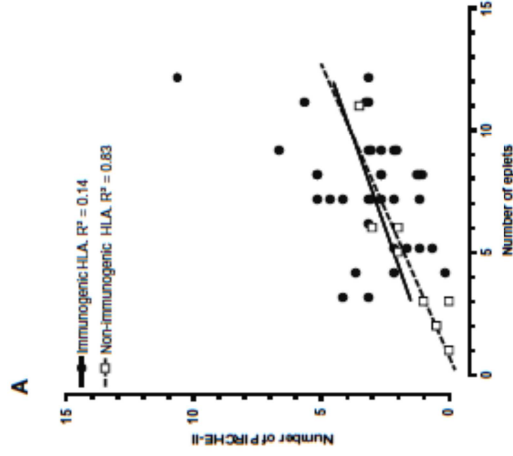
La probabilità di DSA *de novo* correla sia con lo score HLAMatchmaker (A) che con lo score PIRCHE-II (C).

Allo stesso modo, seppure in grado minore, gli score HLA Matchmaker (B) e PIRCHE-II (D) correlano con la sopravvivenza del trapianto a 10 anni.

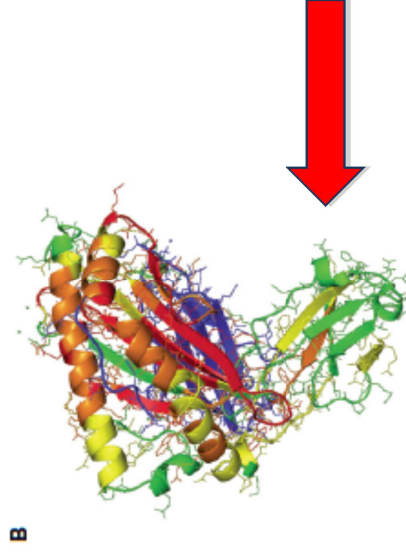


HLAMatchmaker e PIRCHE

Esiste una correlazione tra il numero di eplets determinate da HLAMatchmaker ed il valore di Pirche-II (A)



Localizzazione di PIRCHE-II rispetto alle eplets in una coorte simulata di 10.000 trapianti (C)



I residui aminoacidici polimorfici di PIRCHE-II sono localizzati per la maggior parte nel dominio α -3 e nel foglietto β della molecola HLA di Classe I (B), mentre le eplets sono localizzate sulla superficie delle molecole HLA, accessibili agli Ab.

In particolare i colori indicano la relativa presenza di un aa. nell'Ag immunogeno di Classe (verde = 0; giallo = 1-4; arancio = 5-9; rosso >10).

Utilità clinica di PIRCHE : valutazione del rischio e selezione del donatore

- ✓ L'algoritmo PIRCHE può aiutare nell'identificare mismatch HLA permissivi quando non sia disponibile un donatore HLA compatibile
- ✓ Il numero totale di PIRCHE I e II riflette il carico immunogeno indiretto che hanno le singole combinazioni donatore-ricevente e può essere usato come misura del rischio di risposta alloreattiva post-trapianto
- ✓ Nei trapianti di organi solidi un elevato valore di PIRCHE-II si associa ad aumentato rischio di graft failure e devono quindi essere strettamente monitorati richiedendo spesso regimi immunosoppressivi più intensi
- ✓ In futuro potrebbe essere utilizzato anche per selezionare i donatori, dove sono ovviamente da preferire quelli con minor valore di PIRCHE-II
- ✓ In vista di ritrapianti, e torniamo ai pazienti giovani, scegliere donatori con basso PIRCHE-II

Un epitope based matching pensa al futuro e può rimediare agli errori del passato

Dal momento che gli epitopi sono definiti in base alla loro capacità a legare gli anticorpi, un match basato su di essi è la logica conseguenza per contenere la risposta anticorpale e vi è infatti accordo generale che tale tipo di match migliorerebbe l'outcome dei trapianti.

Vi è anche accordo generale che un tale tipo di match supera il match antigene-fondato e offre nuove opportunità per minimizzare il rischio della formazione di DSA *de novo* ed aumentare il successo dei trapianti

I due maggiori benefici dall'uso di un match basato sugli epitopi (o sulle eplets) nei sistemi di allocazione sono :

1. Evitare di allocare organi con un carico elevato di epitopi immunogeni, prevenendo così future sensibilizzazioni con lo sviluppo di Ab anti HLA, fatto questo molto importante in vista di ritrapianto

1. Selezionare i donatori più adeguati per i pazienti altamente sensibilizzati identificando gli epitopi accettabili nei confronti di quelli

MA

✓ Per determinare gli epitopi in modo corretto è necessario tipizzare donatori e riceventi in alta risoluzione

Anche se talvolta in urgenza può essere difficile ottenere una tipizzazione a 4 digit per tutti i loci, ricordiamoci della popolazione con cui abbiamo a che fare e che esistono i così detti alleli comuni o ben definiti (CWD), che ci possono aiutare nella definizione del terzo e del quarto digit, considerando il gruppo etnico di appartenenza, il typing allelico più comune basato sulle frequenze alplotipiche e le frequenze degli alplotipi estesi nella popolazione.

*Attenzione per soggetti non di origine caucasica!
Gli alleli CWD sono derivati dalla popolazione caucasica, quindi per altre popolazioni l'attribuzione degli alleli potrebbe essere non corretta.*

Ed inoltre :

- ✓ Non è ancora stata completamente determinata la rilevanza biologica e la relativa immunogenicità di tutti gli eplet
ma su questo i lavori sono in corso :
7° International Immunogenetics Workshop. Mapping of Serologic Epitopes.
<http://ihiws.org/mapping-of-serologic-epitopes>
- ✓ Deve essere completata anche la sequenza aminoacidica di tutti gli alleli HLA nel database PIRCHE
solo il 10% dei circa 22.000 alleli HLA attualmente riconosciuti ha una sequenza aminoacidica completa
- ✓ Dovrebbe essere esteso il calcolo del PIRCHE II non solo alle molecole predette in base alla presentazione da parte delle molecole DRB₁, ma anche dagli eterodimeri DQA₁-DQB₁ e DPA₁-DPB₁ e DRB₃, 4 e 5.
- ✓ Non ultimo esiste il timore che tale approccio possa ridurre l'accesso al pool dei donatori

E nel frattempo?

In attesa che la terra venga proclamata definitivamente piatta.....

Visto che i programmi per valutare il match a livello di epitopi sia pensando ai linfociti B che T esistono e non costano nulla,

USIAMOLI.

Se non in modo prospettico, almeno retrospettivamente: come fece Mendel **contiamo** il carico di eplets o il valore di PIRCHE per queste allocazioni INKA basate su tutto fuorchè sul match HLA e vediamo se correlano con un andamento peggiore dei trapianti,

Ma facciamolo insieme.



Buttiamo il cuore oltre l'ostacolo!

. In its current state, epitope-based matching reminds us of the early days of HLA compatibility when limited understanding was available but was nevertheless, applied in the clinical transplant setting. So the question can be raised: are we ready to explore the implementation of epitope-based matching in organ transplantation?

Renè Dusquenoy – agosto 2017





*Grazie per avermi
invitato, ma
soprattutto grazie
per avermi
ascoltato*