

Alterations in the HLA-B*57:01 Immunoepitome by Flucloxacillin and Immunogenicity of Drug-Haptenated Peptides

Univ. Prof. Dr. Hendrik Jan Ankersmit

Vortragshalterin: Fatemeh Hefzolehhe

10.05.2021

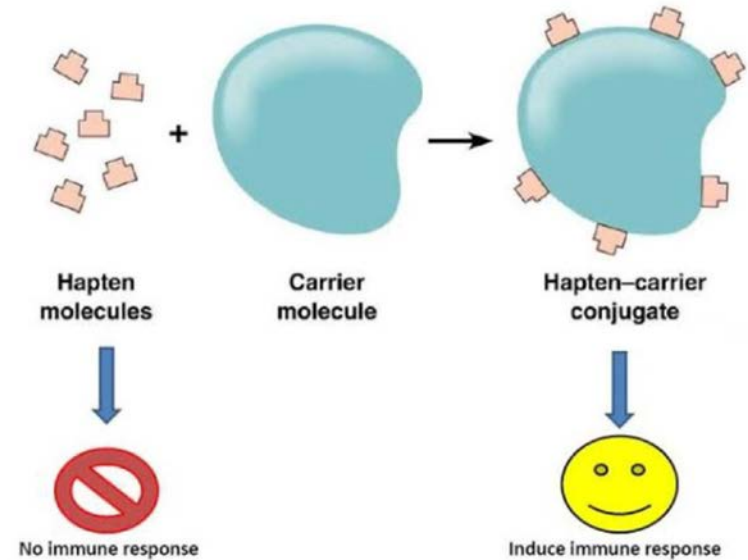
Idiosyncractic drug-induced liver injury (DILI)



1/3 von Arzneimittel Nebenwirkungen zählen zur unerwarteten Hypersensibilität
Immunreaktion —> spezielle T-Zellen (CD4⁺ & CD8⁺)

Haptene

Kleine chemische Stoffe (Arzneimittel Fragmente),
gebunden mit (HLA-System) Peptiden →
Immunreaktionen (T-Zellen)



Flucloxacillin & Abacavir

- Flucloxacillin: Beta-Lactam Antibiotikum für die Behandlung von gram-positiven bakteriellen Infektionen



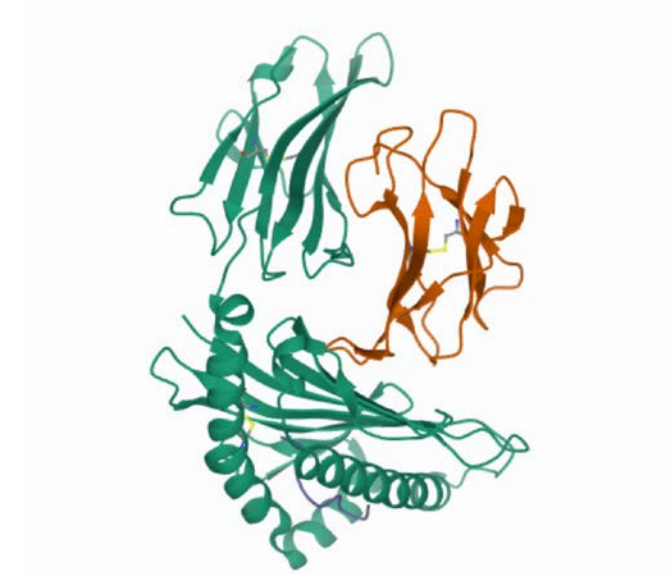
- Abacavir: Arzneimittel für die Behandlung von HIV Patienten



Arzneimittel Hypersensibilität

1. Genetik:

Allomorphe HLA-B*57:01 & HLA-B*57:03 (HLA-System)



2. Umweltfaktoren



Stress



Hygiene

Human Leukocyte Antigen (HLA)-peptide complex

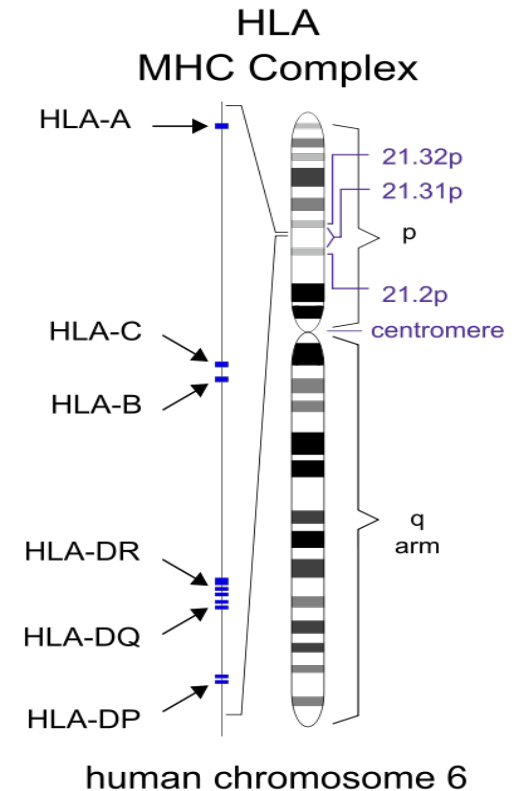
HL-Antigene → Glykoproteine/ Oberfläche von Leukozyten

- Gene auf dem Chromosom 6
 1. HLA-Klasse I (HLA-A, HLA-B & HLA-C)
 2. HLA-Klasse II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR,....)
 3. HLA-Kasse III (C2, C4 & Bf)

Synthese

Klasse I & II (Immunglobulin): lymphatischen Organen (Thymus, Knochenmark)

Klasse III (Plasmaproteine): in der Leber

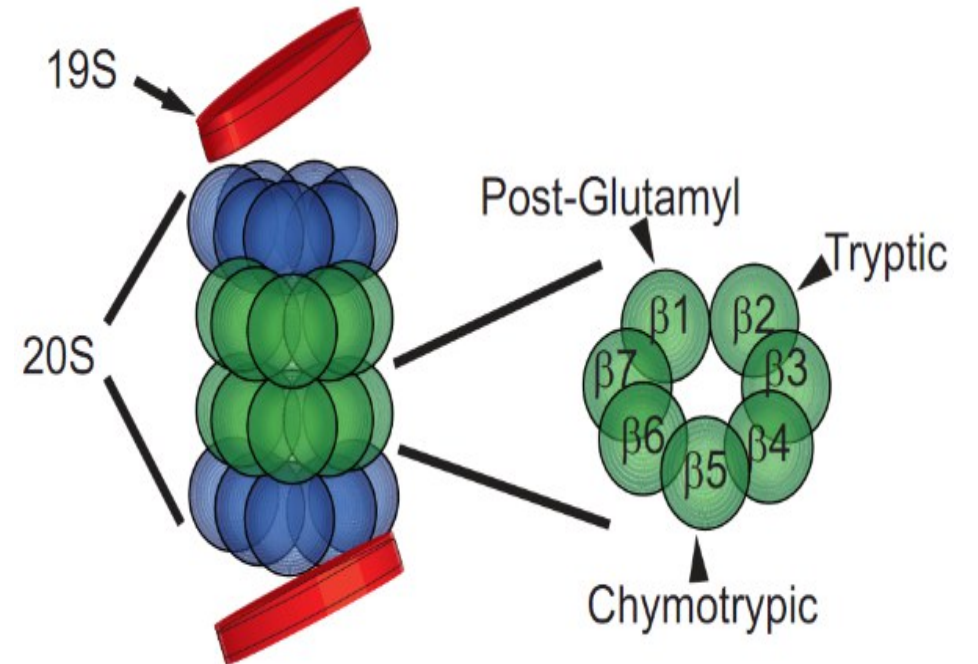


Proteasom

- Zelluläre Proteinkomplexe
- Abbau unnötiger Proteine
- Zellkern, Zytoplasma & Mitochondrien

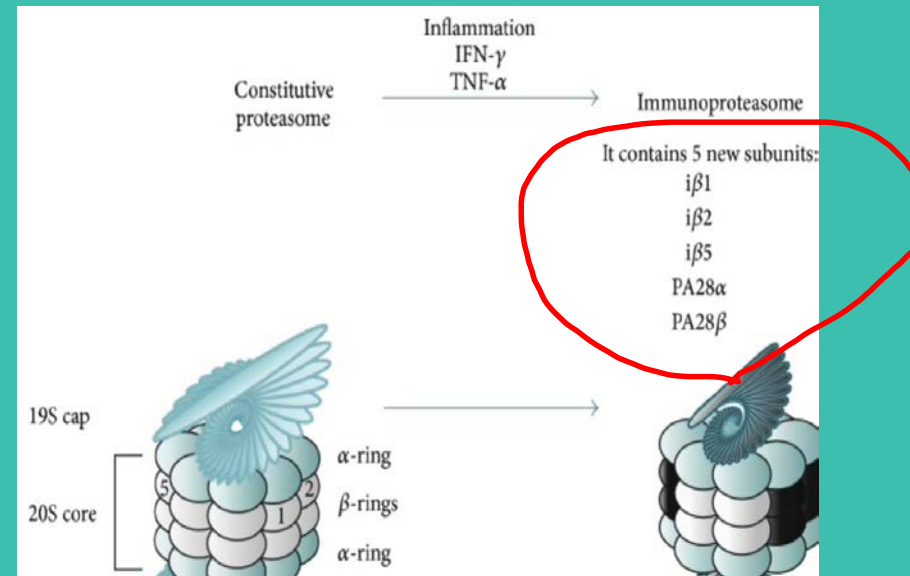
Eukaryotische Proteasom —>

- 26S-Proteasom
- Molekulargewicht: ca. 2.000 kDa
- 3 Komponente:
 - Eine katalytische 20S Untereinheit
 - Zwei regulatorische 19S Untereinheiten



Proteasom & Immunoproteasom

Interferon-gamma: Zytokine gebildet von T-Zellen nach Erkennung eines Antigens



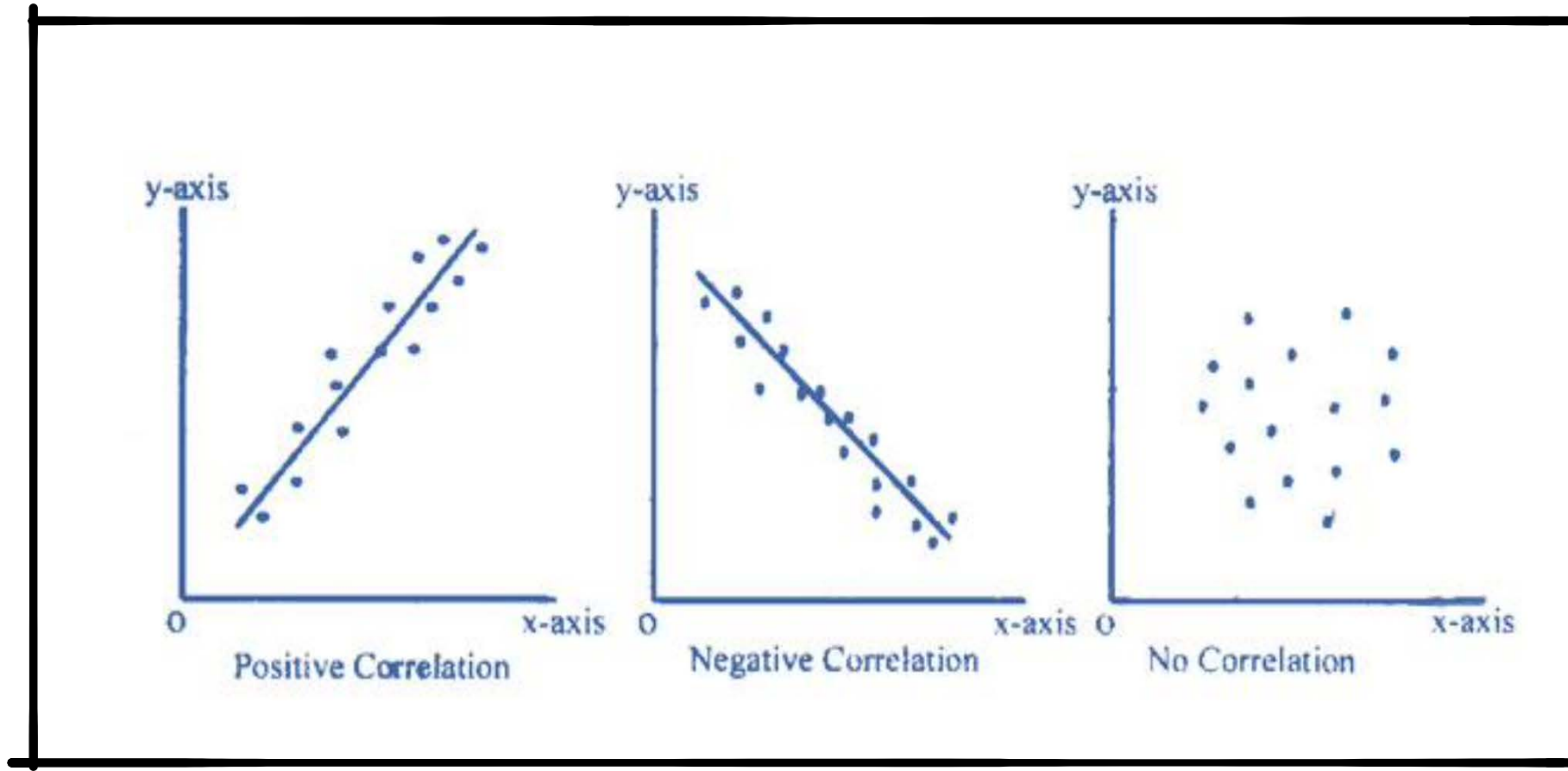
- Immunoproteasom enthält 5 neue Untereinheiten
- Eine stärkere Antigenpräsentation im Vergleich zum normalen Proteasom

Antigenpräsentation: Körper eigene & Körperfremde Antigene werden auf spezialisierte Proteinkomplexe geladen und so für bestimmte Immunzellen sichtbar gemacht

Material & Methoden

Ergebnisse

Korrelation



Korrelationskoeffizient nach Spearman

(r_s) Korrelationskoeffizient nach Spearman

Positiver Zusammenhang: $(r_s) > 0$

Negativer Zusammenhang: $(r_s) < 0$

Kein Zusammenhang: $(r_s) = 0$



Je näher (r_s) bei 0 liegt, desto schwächer die Zusammenhang

Je näher (r_s) bei -1 oder 1 liegt, desto stärker die Zusammenhang

Effect of FLX Treatment on the Proteome and Immunopeptidome of B721-5701 Cells

○ Voraussetzung:

Flx. Verändert Antigen-Processing & Antigenpräsentation von HLA-B Zellen

- HLA-B Zellen (B721-5701) —> 5 Tage Behandlung mit Flx.

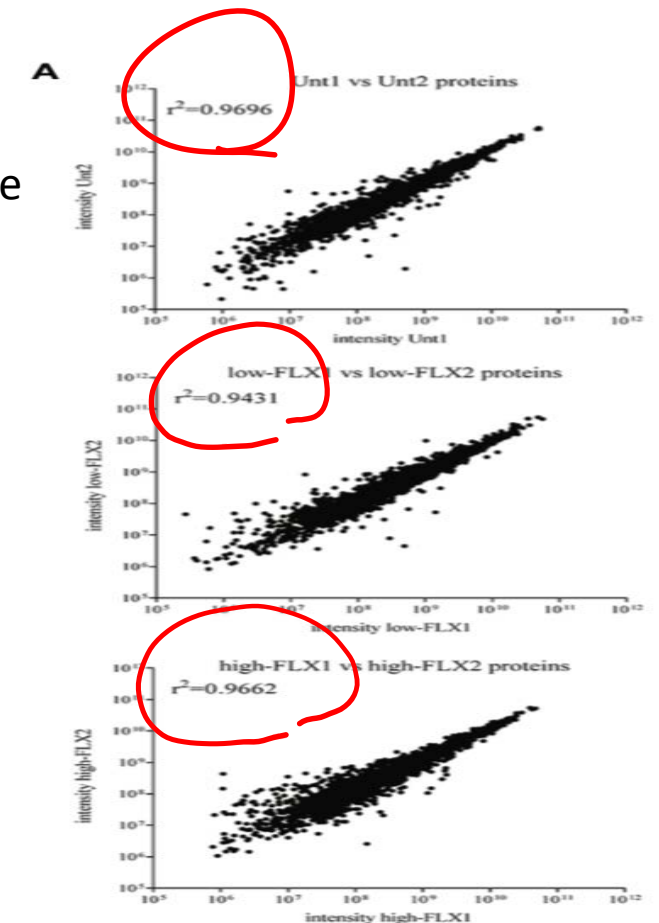
Proteom: Die Gesamte Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zell Kompartiment

Untreated: Kontrollgruppe

Flx.: 150 µg/ml (low)

Flx.: 453 µg/ml (high)

LC-MS/MS Verfahren

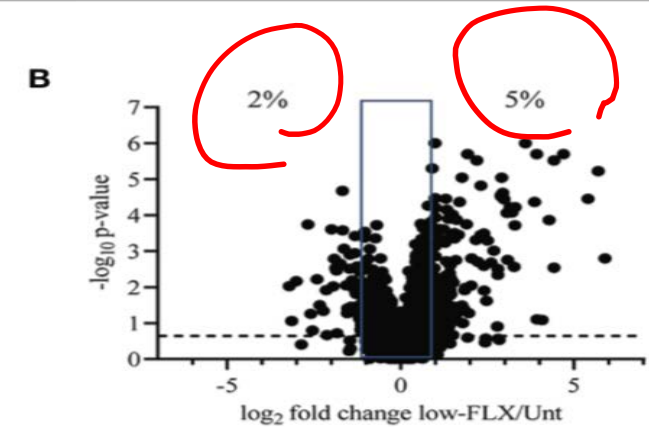


Hohe Spearman Korrelation (> 0,943) —> Keine Veränderungen im Proteom von HLA-B-Zellen

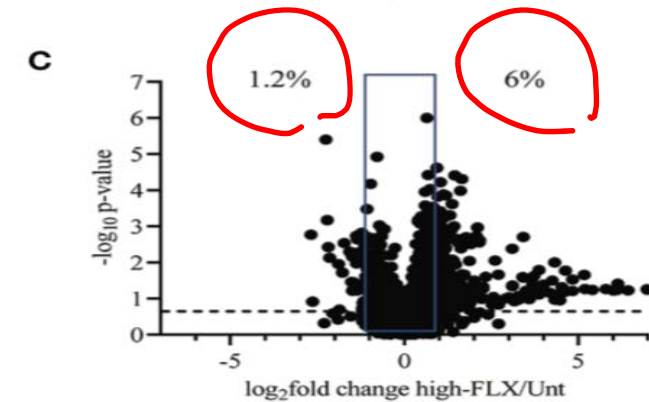
Pathway-Analyse: Leistungsfähige Methode zur Analyse des Genoms (Genexpressionsanalyse)

Ingenuity Pathway Analysis

Flx. 150 µg/ml (low)/ Kontrollgruppe



Flx. 453 µg/ml (high)/ Kontrollgruppe



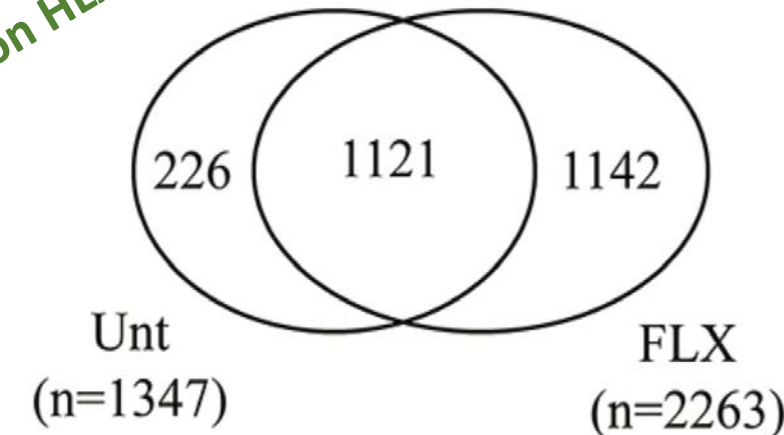
Veränderungen in der relativen Anzahl von Proteinen war nicht im Zusammenhang mit spezifischen Signalwegen → Ähnliche Genausprägung???

Immunozeptidum Analyse → LC-MS/MS: Verbindung von Flüssigchromatographie (LC, bzw. HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS)

Dabei dient die Chromatographie zur Auftrennung und die Massenspektrometrie zur Identifikation von Substanzen

- B-Zellen (B721-5701) Behandlung mit Flx. 150 µg/ml (low) für 5 Tage

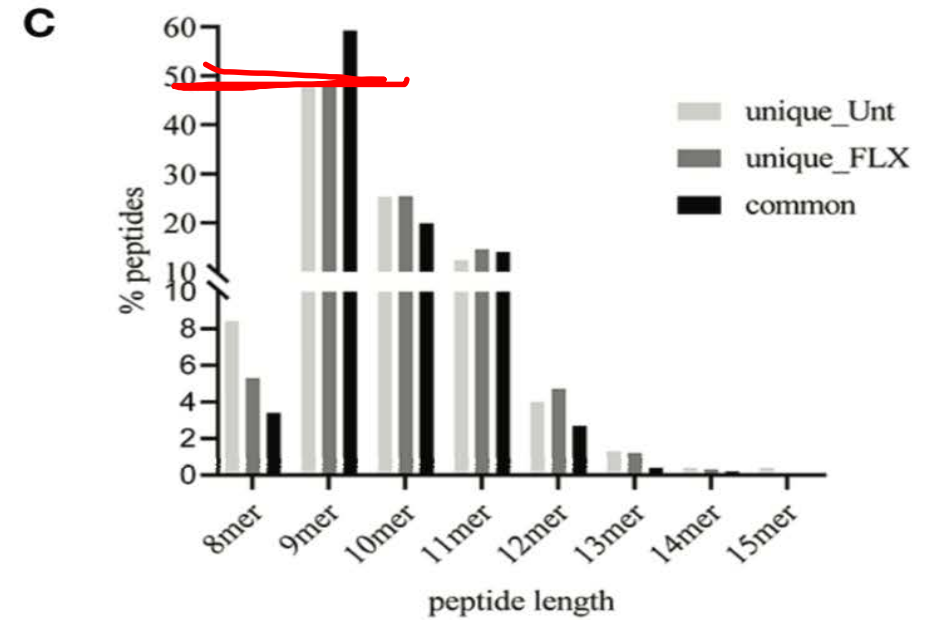
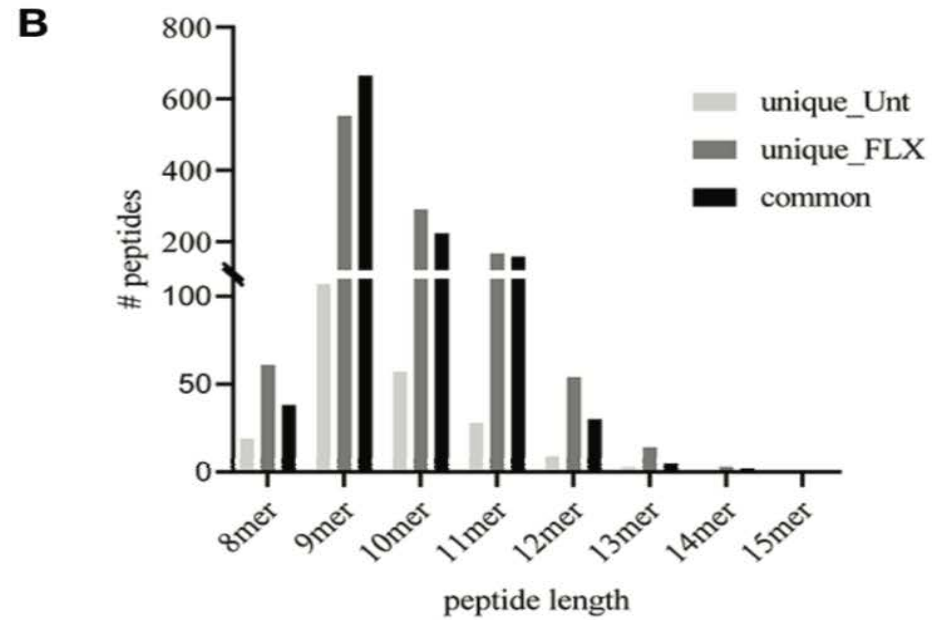
Immunozeptidum: peptide von HLA-System



Insgesamt **3610** Peptide:

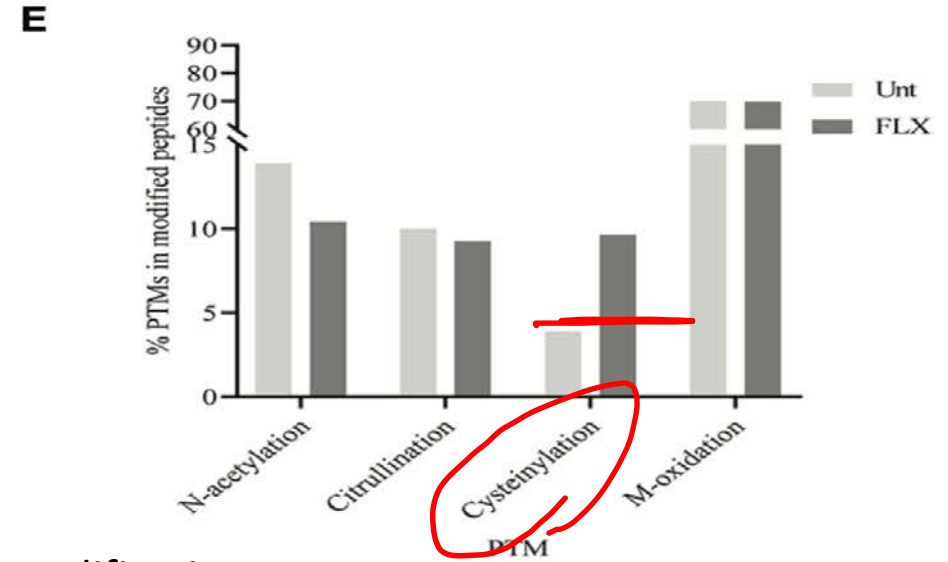
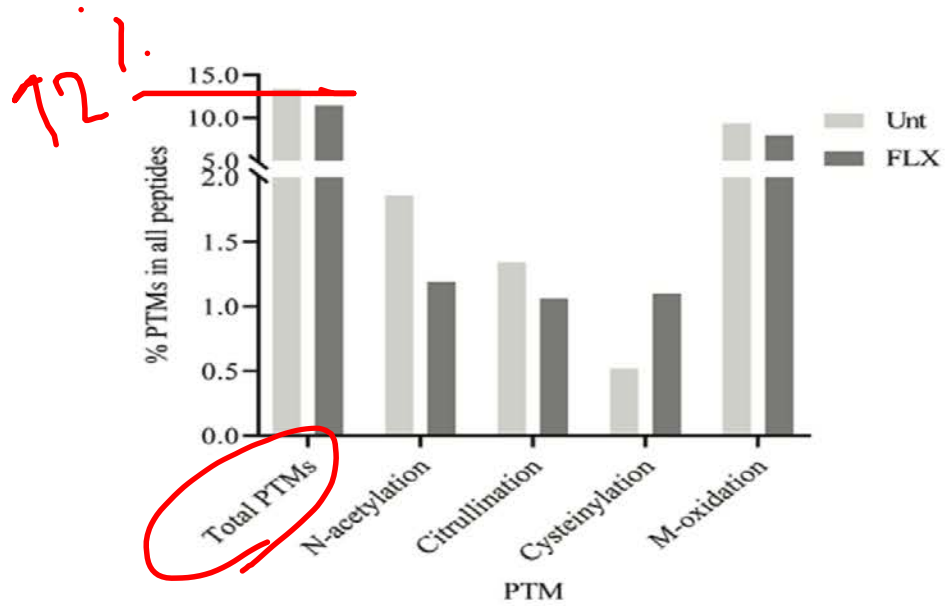
1121 Peptide gemeinsam
1142 nur bei der Flx. Gruppe
226 nur bei der Kontrollgruppe

Immunopeptidum Analyse → LC-MS/MS



**Peptide mit 9 bis 11 Aminosäuren am häufigsten
Fast die Hälfte Peptide mit 9 A. S.**

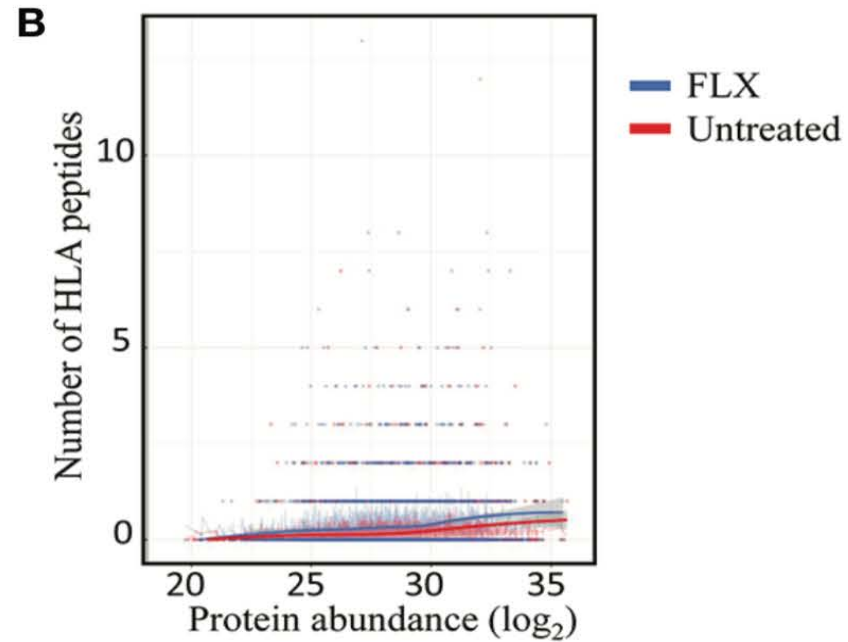
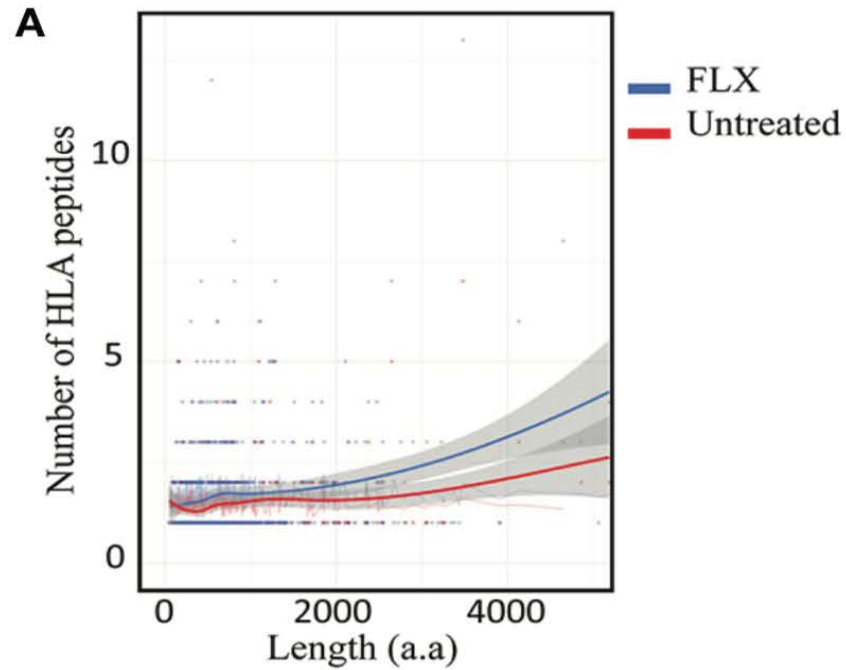
Immunopeptidum Analyse → LC-MS/MS



PTM: Post-translational modification

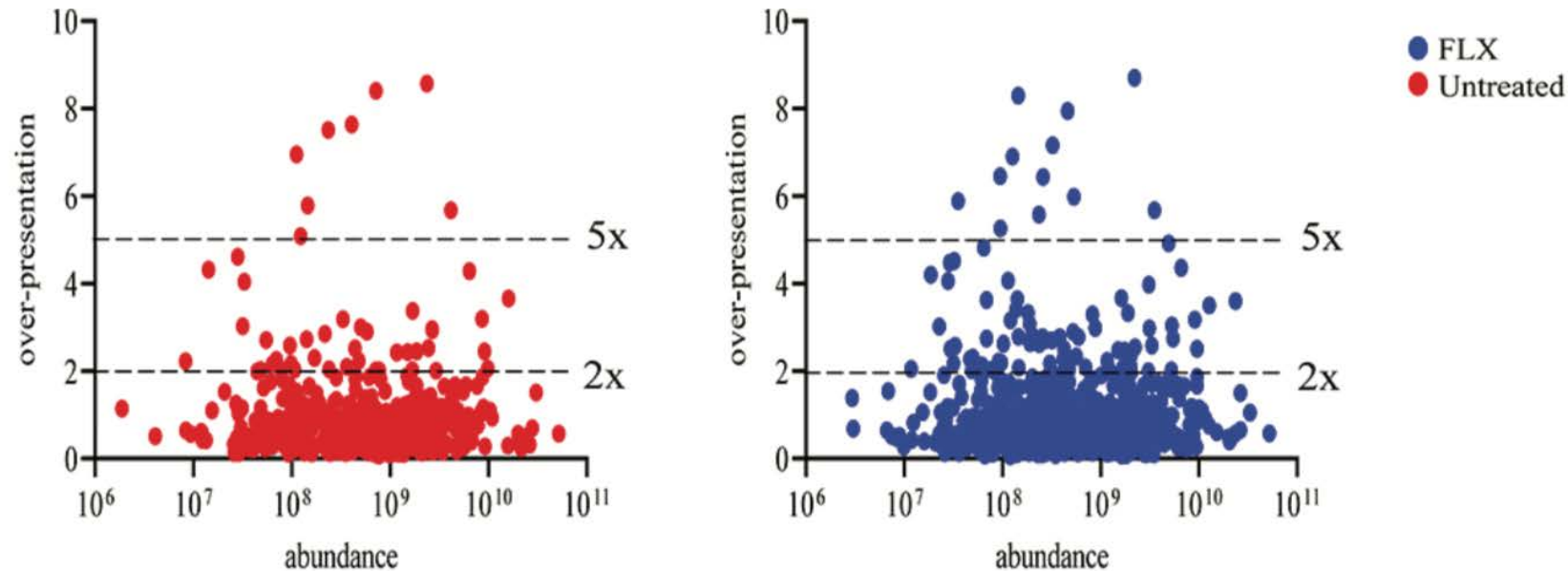
12% total modifizierte Peptide
Peptide gebunden am Cystein fast verdoppelt bei der Flx. Gruppe

Immunozeptidum Analyse → LC-MS/MS



Direkter Zusammenhang zwischen der Länge und Anzahl von Proteinen mit der Anzahl von HLA-Peptiden

Immunopeptidum Analyse → LC-MS/MS



Flx. Gruppe: Hohe Anzahl von Proteinen mit Überpräsentation

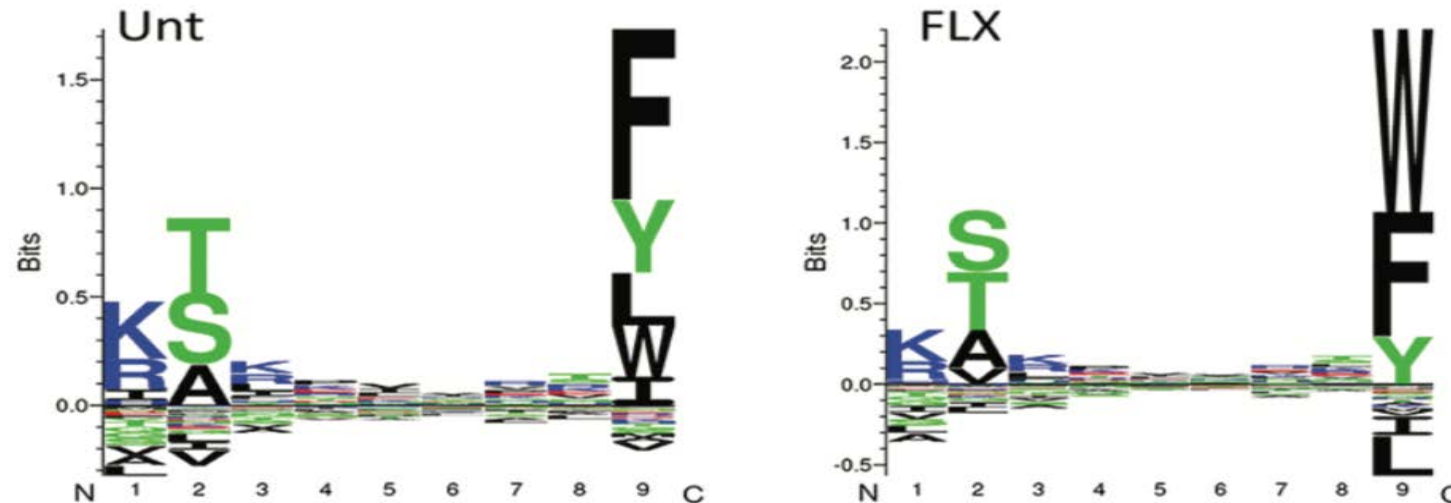
Diese Veränderungen etwas anderes als Zellproteom Veränderungen, aber höchstwahrscheinlich beeinflussen Antigen-Processing und Antigenpräsentation

FLX Treatment Increases HLA-B*57:01- Presented Peptides Containing Tryptophan in the PΩ Position (C-terminus)

Gibbs Cluster Analyse: Bestimmung der Sequenzmotiven von Peptiden

Ankerstelle: Bindungsstelle von Peptiden, meistens in den Positionen 2 & 9

W: Tryptophan
F: Phenylalanin
Y: Tyrosin
T: Threonine
S: Serin
A: Alanin
V: Valin



Aminosäuren Übereinstimmung bei der Ankerstelle zwischen Flx. Gruppe und Kontrollgruppe

Peptide mit höher Anzahl von Tryptophan (W) bei der Flx. Gruppe → höhere Bindungsneigung

Abacavir

Verändert die Aminosäuresequenz in der Anker Position (Leucin oder Isoleucin statt Tryptophan, Phenylalanin oder Tyrosin)

—> **Neoepitop**

Flucloxacillin

Hohe Anzahl von Tryptophan in der Anker Position

—> **Verstärkt das Epitop der Zellen**

Identification of FLX-Haptenated Self-Peptides Derived From sHLA in B721-5701 Cells

- Bindung von Arzneimitteln mit den Peptiden → Neoepitopen und Immunreaktionen
- Identifizierung von Peptiden gebunden mit Flx.

TABLE 1 | Unmodified and flucloxacillin (FLX)-modified peptides found in B721-5701_HLA cell preparations.

| Peptide | FLX-conjugated residue in the protein | Peptide Length | Mass | m/z | z | Protein Accession | Protein Description |
|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|------------|----------|---|--------------------|--------------------------------|
| KAAKLKEY | na | 9 | 1,077.6545 | 539.8342 | 2 | P09429 HMGB1_HUMAN | High mobility group protein B1 |
| KAAK (+453.06)LKEY | K150 | 9 | 1,530.7102 | 511.2447 | 3 | | |
| RTKKVGIVGKY | na | 11 | 1,247.7714 | 624.897 | 2 | P61513 RL37A_HUMAN | 60S ribosomal protein L37a |
| RTKK (+453.06)VGIVGKY | K7 | 11 | 1,700.8269 | 567.9514 | 3 | | |
| TAAQITQRKW | na | 10 | 1,201.6524 | 602.34 | 2 | P18465 I1B57_HUMAN | HLA class I histocompatibility |
| TAAQITQRK (+453.06)W | K145 | 10 | 1,654.7124 | 828.3697 | 2 | | |

3 Peptide → Bindung mit Flx. durch Aminosäure Lysin

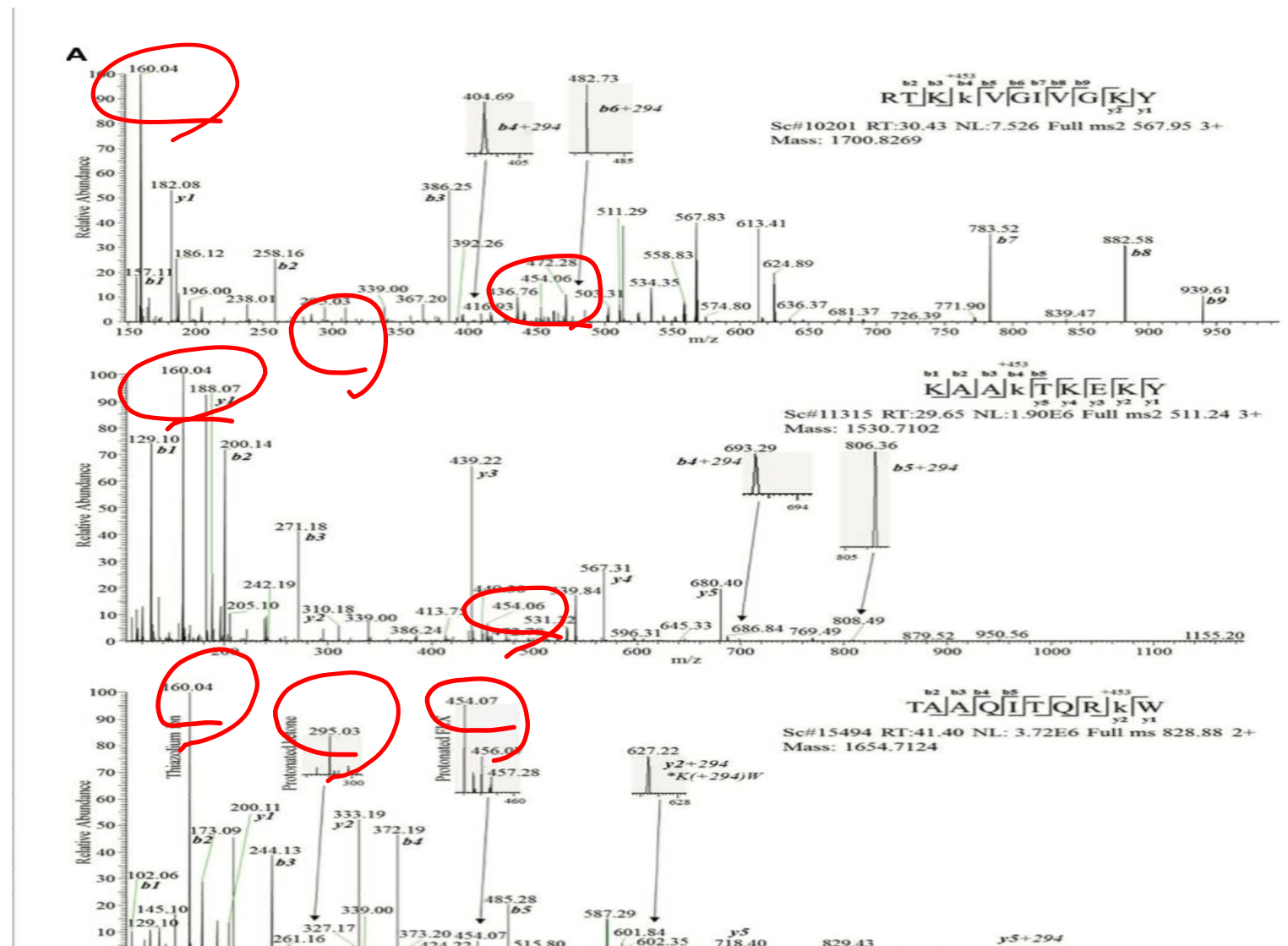
TAA: Peptide von HLA-System

Funktion

KAA: Peptide von High Mobility Group (HMG) Proteine → → → DNA Reparatur, Transkription,...

RTKK: Peptide von 60S ribosomal Protein

Massenspektrometrie



Flx. Fragmente (160, 295, 454) auf die zerlegten Peptidsequenzen

The Immunogenic Potential of FLX- Peptides Depends on the Peptide Sequence and the Drug- Conjugated Amino Acid Position

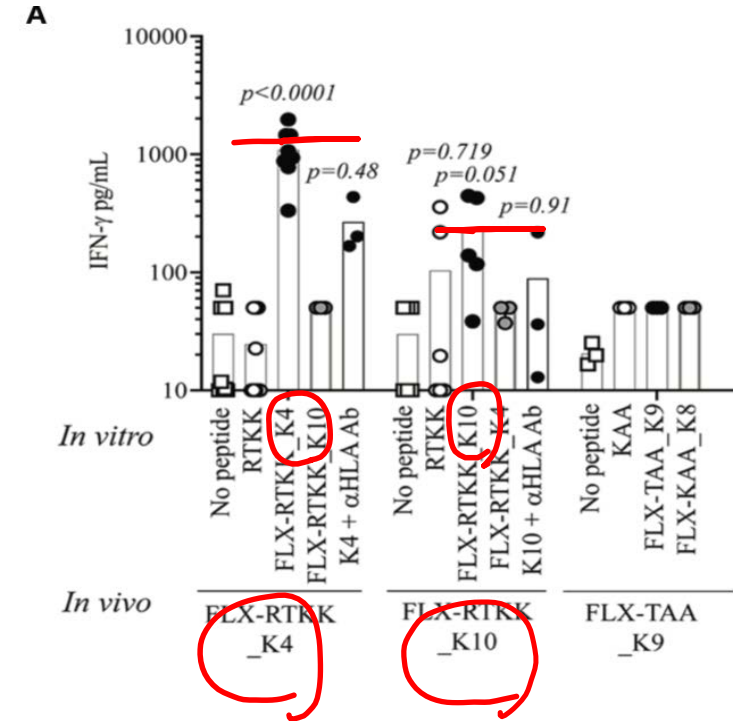
Immunogenität von Flx.-Peptiden

In-Vivo:

Transgene Mäuse wurden bei den verschiedenen Flx.-Peptidsequenzen immunisiert

In-Vitro:

Milzzellen von Mäusen: Anregung für 5 Tage mit 10 µg/ml Flx.-Peptidsequenzen



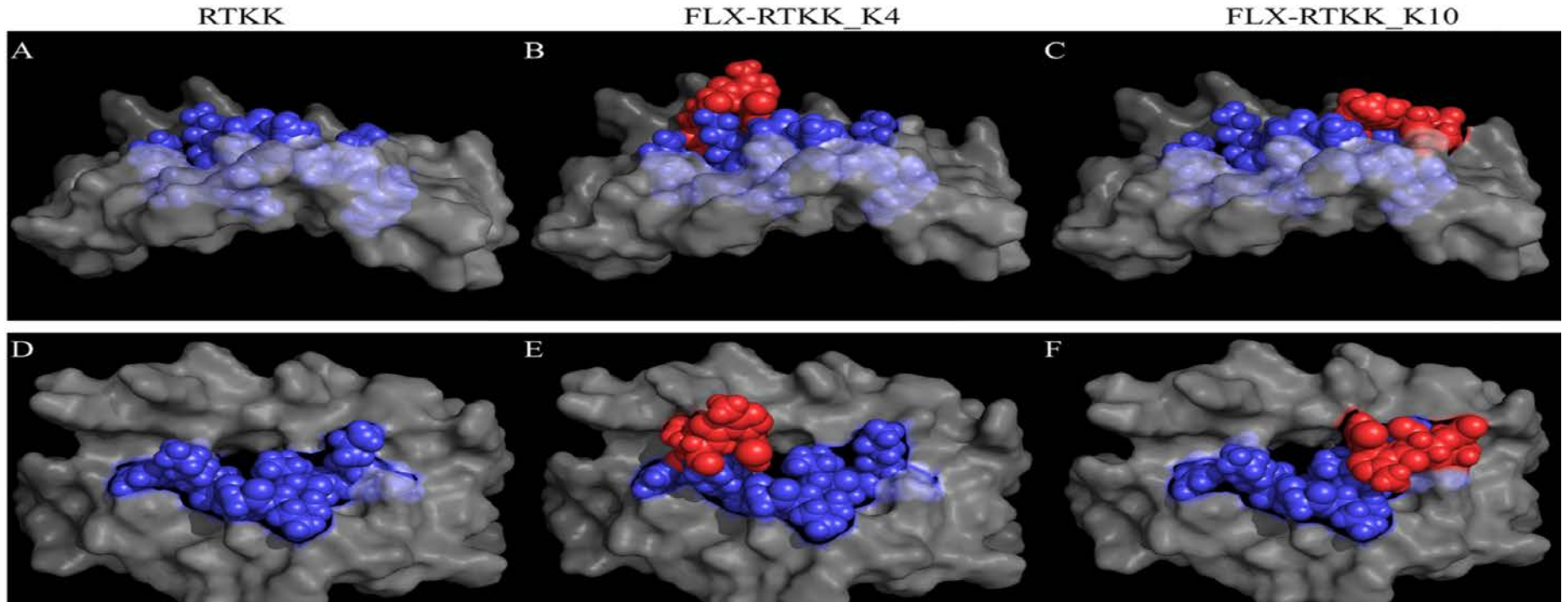
Direkter Zusammenhang zwischen den gleich eingesetzten Flx.-Peptidsequenzen und INF-gamma Sekretion

In-Silico Analyse

Rot: Flx.

Blau: Peptidsequenzen

Grau: HLA



Flx.-RTKK-K4 → zentrale Position

Flx.-RTKK-K10 → äußere Seite

Möglicher Zusammenhang zwischen der Bindungsstelle und Immunogenität von Peptiden

Diskussion

- 1. Trotz keiner signifikanten Veränderungen im Proteingehalt von, mit Flx. Behandelten HLA-B Zellen, es wurde eine Vielfalt im Peptidvorrat bei diesen Zellen berichtet, welche Antigen-Processing und Antigenpräsentation beeinflussen kann**
- 2. Kovalente und nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Arzneimittel und Peptiden sind bedeutsam bei der Entstehung von Lebertoxizität**
- 3. Eine höhere Anzahl von A. S. Tryptophan bei mit Flx. Behandelten HLA-B Zellpeptiden könnte Immunoproteasom Processing anregen & eine höhere Bindungsneigung im Vergleich zu normalen HLA-B Zellpeptiden hervorrufen, welche nach dem Absetzen von Medikament für eine längere Zeit noch beibehalten und die Gewebe-Schädigungen als Folge haben kann!**

4. Immunogenität von Peptiden gebunden mit Arzneimittel hängt von A. S. Lysin als Bindungsstelle ab

5. Weitere Recherchen ist erforderlich um die Mechanismen, bei denen ein Arzneimittel das Zell-Epitop verändert und ein neues Epitop (Neoepitop) beim HLA System gestaltet und daraus folgend T-Zell Reaktion hervorruft, besser zu kennen

Vielen Dank!