

Andreas Heinold
Dr. sc. hum.

Molekulargenetische Charakterisierung der Minor-Histokompatibilitäts-Antigene und Untersuchungen zu ihrer Relevanz in der Organtransplantation

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Opelz

Auch bei HLA-identischen Organtransplantationen kommt es zu immunologischen Abstoßungsreaktionen. Diese Abstoßungsreaktionen zeigen, dass neben den Haupthistokompatibilitätsantigenen (HLA) noch andere Alloantigene (Nicht-HLA) existieren. Als mögliche Auslöser werden die von HLA-Molekülen präsentierten Neben-Histokompatibilitätsantigene (Minor-Histokompatibilitätsantigene, mHags) diskutiert. Neben der zellulären Immunreaktion kann auch eine humorale Immunantwort gegen Nicht-HLA-Antigene an der Transplantatabstoßung beteiligt sein. Die hier präsentierte Arbeit ist in drei Teile gegliedert.

Der erste Teil untersucht den Einfluss der autosomal kodierten mHags auf das 5-Jahres-Nierentransplantatüberleben. Für die dazu erforderliche Typisierung der mHags HA-1, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1, ACC-1 und UGT2B17 wurde ein auf der PCR-SSP-Methode basierender Kit entwickelt und hergestellt. Mit diesem Kit wurden Empfänger und Spender kaukasischen Ursprungs von HLA-A, -B und -DR kompatiblen Nierenerstransplantationen typisiert. Aus den zwischen 1988 bis 2004 durchgeführten 38.416 Nierentransplantationen der Collaborative Transplant Study (CTS) erfüllten 702 Transplantationen diese Auswahlkriterien. Die Auswertung ergab unter Berücksichtigung der HLA-Restriktion keine signifikante Assoziation der mHag-Inkompatibilität mit dem Transplantatüberleben. Bei dieser Arbeit handelt es sich um die erste, in großem Maßstab durchgeführte Studie zur Rolle der autosomalen mHags bei Nierentransplantationen.

Im zweiten Teil wurde der Einfluss nicht-synonymer Nukleotidpolymorphismen der Adhäsionsproteine L-Selektin, PECAM-1 und ALCAM auf das Transplantatüberleben untersucht. Von diesen Polymorphismen wird angenommen, dass sie mit einer verstärkten Transmigration von Leukozyten einhergehen oder bei hämatopoetischen Stammzelltransplantationen als mHags wirken. Aus der CTS-Datenbank wurden zwei unabhängige Kohorten gebildet, die aus 954 bzw. 1.002 Nierentransplantationen bestanden. Die polymorphen Codons (Codon 206 und 213 von L-Selektin; Codon 125, 563 und 670 von PECAM-1; und schließlich Codon 258 von ALCAM) wurden mittels eines eigens hierfür entwickelten PCR-SSP Kits typisiert. Bei dieser ersten, in großem Umfang durchgeführten, genetischen Assoziationsstudie zur Relevanz der Polymorphismen der Adhäsionsmoleküle L-Selektin, PECAM-1 und ALCAM bei Nierentransplantationen hatten die Empfänger- und Spendergenotypen keinen signifikanten Einfluss auf das Transplantatüberleben. Die Auswertung der Inkompatibilitäten für die polymorphen Positionen ergab lediglich bei L-Selektin Codon 213 ein signifikantes Ergebnis: Bei der ersten Kohorte war die Transplantatüberlebensrate bei den L-Selektin Codon 213 inkompatiblen Transplantationen signifikant höher als bei den kompatiblen Transplantationen ($P = 0,043$). Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht durch die Untersuchung der zweiten Kohorte bestätigt werden.

Im Gegensatz zur hämatopoetischen Stammzelltransplantation haben somit die hier untersuchten autosomal kodierten mHags ebenso wie die Polymorphismen der Adhäsionsmoleküle bei Nierentransplantationen offenbar keinen signifikanten Einfluss auf den Transplantationserfolg. Dank

der jahrzehntelangen Daten- und Probenversickungen der CTS-Studienteilnehmer konnten diese bisher umfassendsten retrospektiven Studien zum Einfluss der mHags und der polymorphen Adhäsionsmoleküle auf den Verlauf von Nierentransplantationen mit einer hohen Fallzahl durchgeführt werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde eine neue Methode zur Charakterisierung der Spezifität von Alloantikörpern etabliert. Obwohl donorspezifische Antikörper gegen Nicht-HLA-Moleküle mit einer reduzierten Transplantatüberlebensrate assoziiert sind, wurden bisher nur sehr wenige Nicht-HLA-Antikörper-Spezifitäten bestimmt. Die hier entwickelte Methode besteht aus zwei Schritten: Immunpräzipitation von Zelloberflächenantigenen mit einem alloreaktivem Serum, gefolgt von einer massenspektrometrischen Identifikation der präzipitierten Proteine mittels MALDI-TOF. Hieraus resultierte auch die Bezeichnung SIMT (Sequenzielle Analyse mit Immunpräzipitation gefolgt von MALDI-TOF) für diese neue Methode. Zur Etablierung der SIMT-Methode wurden Lymphozyten aus dem peripheren Blut von zwei Spendern mit bekannten HLA-Merkmalen (HLA-B27-positiv und -negativ) zusammen mit einem Anti-HLA-B27-Serum bei der Immunpräzipitation eingesetzt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Eluats der Immunpräzipitation wies nur der HLA-B27-positive Spender bei der Silberfärbung des Gels eine Proteinbande auf der Laufhöhe von 40 kDa auf, nicht aber der HLA-B27-negative Spender. Das 40 kDa Alloantigen konnte durch die anschließende MALDI-TOF Analyse als HLA-B27 identifiziert werden. Die Methode wurde auch mit Plasmapheresematerial validiert. Die Plasmapherese wird therapeutisch zur Desensibilisierung von immunisierten Transplantationspatienten angewandt. Während einer Plasmapherese fallen ca. 4-5 Liter an, sodass dieses Material in großen Mengen für Labordiagnostik zur Verfügung steht. Der Einsatz von Plasmapheresematerial zur Detektion von Alloantikörpern wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die eindeutige Identifizierung von Alloantigenen aus dem Serum sowie aus dem Plasmapheresematerial beweist, dass die SIMT-Methode eine exakte Bestimmung von Alloantikörper-Spezifitäten ermöglicht und auch Perspektiven für die Entdeckung bisher unbekannter Alloantigene öffnet.