

Benjamin Kreifelts  
Dr. med.

## **Rejektionsdiagnostik im peripheren Blut mittels Genexpressionsanalyse (Teil A: In-vitro Untersuchungen)**

Geboren am 16.02.1977 in Köln  
Staatsexamen am 30.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie  
Doktorvater: Prof. Dr. St. Meuer

Nach wie vor handelt es sich bei der akuten Transplantatabstoßung um eine häufige Komplikation nach Nierentransplantation und einen wichtigen Faktor im Hinblick auf Transplantatversagen. Der Goldstandard bei der Diagnose der akuten Rejektion stellt die Transplantatbiopsie mit konsekutiver histologischer Aufarbeitung des Biopsats dar. Da dieses Verfahren jedoch nicht frei von Fehlerquellen (sampling error) und aufgrund seiner Invasivität mit Komplikationen behaftet ist, sind in den vergangenen Jahren verstärkt Versuche unternommen worden, weniger invasive diagnostische Alternativen zur Transplantatbiopsie zu entwickeln. Es konnte gezeigt werden, daß es innerhalb des Transplantats, aber auch in den PBMC des Patienten im Rahmen einer akuten Rejektionsepisode zu einer spezifischen Veränderung der Expression von Zytokinen und anderen immunrelevanten Genen kommt, die in hohem Maße mit der histologischen Diagnose der akuten Transplantatrejektion korreliert. Somit zeigt die Messung dieser Genexpressionsveränderungen in den PBMC das Potential als nicht-invasive diagnostische Alternative zur Transplantatbiopsie.

Neben der akuten Nierentransplantatrejektion können in der Post-Transplantationsphase allerdings auch eine Vielzahl anderer Komplikationen auftreten, die klinisch und histologisch schwer von einer typischen Rejektion zu unterscheiden sind, von denen hier vor allen Dingen immunsuppressionsbedingte virale und bakterielle Infektionen, sowie die Toxizität der Immunsuppressiva und Perfusionsstörungen zu nennen sind. Da auch diese Komplikationen Einfluß auf die Genexpression in PBMC nehmen können, müssen die spezifischen, im Rahmen der akuten Transplantatrejektion auftretenden Genexpressionsveränderungen von den durch anderweitige Komplikationen hervorgerufenen Expressionsveränderungen abgegrenzt werden. Ziel der Arbeit war es, in einem ersten Schritt an einem in-vitro-Modell eine Kombination von Genen zu finden, deren Expressionsveränderung in PBMC eine Unterscheidung von allogener, viraler und bakterieller Stimulation zuläßt (Teil A). Dazu wurden die PBMC gesunder Spender mit EBV-transformierten B-Lymphozyten, E.coli-Bakterien, Tetanustoxoid und allogenen PBMC stimuliert. Zunächst wurde der stimulierende Effekt der eingesetzten Antigene im Rahmen von Proliferationstests überprüft. Anhand der Ergebnisse wurden die Stimulationsbedingungen optimiert. Anschließend wurde die Expression von insgesamt 44 Genen untersucht. Zehn der untersuchten Gene zeigten eine deutlich unterschiedliche Expression unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Unter den zehn Genen wurden zwei Kombinationen von jeweils vier Genen gefunden, deren Expressionsanalyse für die allermeisten PBMC-Proben (97% bzw. 96%) eine korrekte Zuordnung zu der jeweiligen Stimulationsart zuließen. Die informativen Gene waren im einzelnen: IFN-gamma, IL-6, MIG, IL-2 und LKLF. In Parallelexperimenten wurde das Differenzierungspotential der Genexpressionsanalyse mit dem der durchflußzytometrischen Messung früher Aktivationsmarker verglichen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde dann die Expression der 10 in-vitro differentiell exprimierten Gene an PBMC-Proben von Nierentransplantationspatienten (12 Rejektionen, 33 Nicht-Rejektionen) untersucht, mit dem Ziel, das Differenzierungspotential der in-vitro gefundenen Genexpressionsmuster in-vivo zu verifizieren (Teil B).

Es zeigte sich, daß es bei den in-vitro unterschiedlich exprimierten Genen in-vivo keinen signifikanten Genexpressionsunterschied zwischen der Gruppe der Rejektionspatienten und der Nicht-Rejektionspatienten gab. Auch mittels der Diskriminanzanalyse ließ sich auf der Basis der erhobenen Daten keine Differenzierung der beiden Patientengruppen erreichen.

Im Folgenden wurde an einem Teilkollektiv der Patientenproben die Expression von 104 immunrelevanten Genen gemessen, um auf diese Weise Gene zu identifizieren, deren Expression in PBMC die Differenzierung der beiden Patientengruppen erlaubt. Die Expressionsdaten wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen und ihr Differenzierungspotential in der Diskriminanzanalyse hin untersucht. 13 Gene wurden für die Messung am gesamten Patientenkollektiv ausgewählt. An diesem Gesamtkollektiv ergab sich für die folgenden Gene ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Rejektionspatienten und Nicht-Rejektionspatienten: HSP-70, MIP-2 alpha, NSE, PU.1, TREM-1, TRX und xCT. Drei weitere Gene (COX-2, IL-7 und IL-18) waren für die Differenzierung der beiden Gruppen im Rahmen der Diskriminanzanalyse nutzbar.

Mittels der Diskriminanzanalyse und der ROC-Analyse war unter Einbeziehung von fünf Parametern die korrekte Klassifizierung von 87% Prozent der Proben möglich (Sensitivität: 75%, Spezifität: 91%). Bei Wahl eines anderen Cut-off-Wertes in der ROC-Analyse ergibt sich ein ausgeglicheneres Verhältnis von Sensitivität (83%) und Spezifität (85%).

In einem auf den signifikanten Expressionsunterschieden der Gene beruhenden Test konnten mit Hilfe von vier Parametern (PU.1, TREM-1, TRX, xCT) sogar 98% der Proben (44/45) richtig klassifiziert werden (Sensitivität: 100%, Spezifität: 97%).

Als mögliche Ursachen für die falsch negativen und falsch positiven Testergebnisse in der Diskriminanzanalyse konnten in einer eingehenden Analyse der einzelnen Fälle folgende Faktoren ausgemacht werden: ein größerer zeitlicher Abstand zwischen Blutentnahme und Rejektionsdiagnose durch Biopsie, das Zusammentreffen mehrerer Komplikationen bei einem rejektionsfreien Patienten, sowie das Auftreten von Komplikationen bei rejektionsfreien Patienten, die im weiteren Verlauf eine akute Rejektionsepisode erlitten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer falschen histologischen Diagnose.

Insgesamt betrachtet stellt die vorliegende Arbeit eine komplementäre Erweiterung der bisherigen Studien zur nicht-invasiven Nierentransplantatrejektionsdiagnostik mittels Genexpressionsanalyse in PBMC dar, die einerseits die differentielle Expression einiger neuer Parameter-Gene in den PBMC von Patienten mit akuter Transplantatrejektion und solchen ohne Rejektion aber mit anderweitigen Komplikationen beschreibt, und andererseits das Differenzierungspotential dieser Parameter-Gene bei der Abgrenzung der beiden Patientengruppen voneinander belegt. Für die Zukunft wäre nun die Bestimmung der hier beschriebenen Rejektions-Parameter in der Nachsorge von Transplantationspatienten im Rahmen einer prospektiven Studie mit dem Ziel der weiteren Validierung der Parameter, der Überprüfung ihrer möglichen Markerfunktion für die subklinische Rejektion, sowie der genauen Bestimmung des diagnostischen Fensters zu wünschen.