

Johannes Ahrend Witt

Dr. med.

Human leukocyte antigen class I molecules and immune selection in microsatellite-unstable colorectal cancer

Fach/Einrichtung: Pathologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Kloor

In den letzten Jahrzehnten wurde eine enorme Vielzahl an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben verschiedener Populationen und Regionen archiviert. Dieses Material wäre von hohem Wert, um umfassende Studien zu verschiedenen Erkrankungen, wie Krebserkrankungen oder Infektionserkrankungen, durchzuführen. Aufgrund ihrer niedrigen DNA-Qualität können herkömmliche molekularbiologische Methoden zur Untersuchung dieser Proben nur eingeschränkt, oder gar nicht, angewendet werden. Aus diesem Grund habe ich einen robusten und zuverlässigen Ansatz entwickelt, welcher dazu dient, HLA-A*02 Allele in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe zu identifizieren. Bei HLA-A*02 handelt es sich um die größte HLA-A Allelgruppe in der deutschen Bevölkerung. Die Unterscheidung zwischen HLA-A*02- und Non-HLA-A*02-Allelen basiert auf einem zuvor beschriebenen Einzelnukleotid-Polymorphismus im *HLA-A*-Gen. Um zu überprüfen, dass dieser Polymorphismus für die Unterscheidung von HLA-A*02- und Non-HLA-A*02-Allelen geeignet ist, habe ich alle 2862 HLA-A-Allele aus der IPD-IMGT/HLA Datenbank automatisiert analysiert. Ich habe die Methode in einem unabhängigen Kollektiv mit 90 Personen, für welche der HLA-Typ mit einem routinemäßig angewendeten next-generation sequencing-Ansatz bestimmt wurde, validiert. 90 % (n=81) der Proben waren analysierbar. Der HLA-A*02-Status wurde für alle 41 Patientinnen und Patienten mit mindestens einem HLA-A*02-Allel und alle 40 Patientinnen und Patienten mit keinem HLA-A*02-Allel korrekt ermittelt. Dies entspricht einer Sensitivität und Spezifität von 100 % (95 % Konfidenzintervall: 91,40 bis 100 % bzw. 91,19 bis 100 %).

Basierend auf dieser entwickelten Methode habe ich eine Kohorte von 73 Patientinnen und Patienten mit Mikrosatelliten-instabilem Kolorektalen Karzinom, für welche das Mutationsmuster von 41 codierenden Mikrosatelliten bereits bestimmt wurde, in zwei Gruppen eingeteilt: Patientinnen und Patienten mit mindestens einem HLA-A*02-Allel (G_{pr} Gruppe, n=36) und Patientinnen und Patienten ohne HLA-A*02-Allel (G_{non} Gruppe, n=37). Außerdem habe ich die overall ligand likelihood OLL_G definiert, um die Gruppen-spezifische Sichtbarkeit von Mutationen in codierenden Mikrosatelliten auf der Zelloberfläche von Tumorzellen nährungsweise zu bestimmen. Diese berücksichtigt die Häufigkeit von HLA-A-Allelen in beiden Gruppen G_{pr} und G_{non} . Hiervon ausgehend habe ich untersucht, ob immunogene Mutationen in codierenden Mikrosatelliten, welche gut durch die gegebenen HLA-A-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden, seltener vorkommen im Vergleich zu weniger immunogenen Mutationen.

Als ersten Teil der Analyse habe ich alle 41 Mutationen in codierenden Mikrosatelliten mit dem Leseraster „minus 1“ (Insertion von zwei Nukleotiden, Deletion von einem Nukleotid) betrachtet. Hier zeigte sich keine Korrelation zwischen der Mutationsfrequenz in codierenden Mikrosatelliten und der HLA-A-abhängigen Immunogenität der resultierenden Frameshift-Peptide ($p=0.4985$, Pearson's $r=-0.0007$). Darüber hinaus habe ich die acht am häufigsten mutierten codierenden Mikrosatelliten mit einer Mutationsfrequenz von über 25 % separat analysiert. In dieser Konstellation zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Mutationsfrequenz und der geschätzten Immunogenität der Frameshift-Peptide ($p=0.01231$, Pearson's $r=-0.77254$). Dies könnte widerspiegeln, dass häufige Mutationen in codierenden Mikrosatelliten während der Pathogenese von Mikrosatelliten-instabilen Tumoren in Abhängigkeit vom HLA-A-Typ negativ selektioniert werden.

Die negative Selektion von Mutationen wird nicht nur vom HLA-Typ, sondern möglicherweise auch von HLA-unabhängigen Faktoren bestimmt. Hinsichtlich der Entstehung Mikrosatelliten-instabiler Tumore könnte hier die Länge der auftretenden Frameshift-Peptide eine zentrale Rolle spielen, da diese die Zahl der bei der Degradation durch das Proteasom entstehenden Peptide beeinflusst.

Insgesamt unterstreicht meine Arbeit die zentrale Rolle von immunologisch vermittelten Selektionsprozessen während der Genese von Mikrosatelliten-instabilen Tumoren. Die negative Selektion von Mutationen in codierenden Mikrosatelliten umfasst wahrscheinlich sowohl HLA-Typ-abhängige, als auch HLA-Typ-unabhängige Aspekte. Aus diesem Grund sollten zukünftige Studien darauf abzielen, beide Perspektiven zu vereinen. Eine zentrale Rolle könnte dabei die Entwicklung multidimensionaler Modelle einnehmen, welche die komplexen biologischen Prozesse des Immunoeditings potenziell besser abbilden.