



# DER V119I POLYMORPHISMUS VON PROTEINASE-3 - EIN MINOR HISTOKOMPATIBILITÄTS ANTIGEN

Britta Eiz-Vesper<sup>1</sup>, Barbara Khattab<sup>1,2</sup>, Nicole Fuchs<sup>1</sup>, Arnold Ganser<sup>2</sup>, Bernd Hertenstein<sup>2</sup> and Rainer Blasczyk<sup>1</sup>

Abteilung für Transfusionsmedizin<sup>1</sup>, Abteilung für Hämatologie und Onkologie<sup>2</sup>

Medizinische Hochschule Hannover

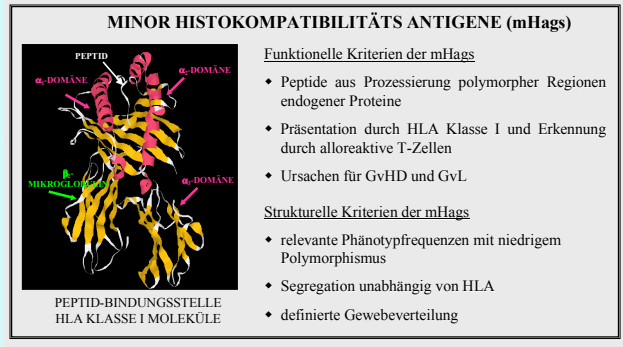
## EINLEITUNG

Mechanismen und induzierende Antigene der Graft-versus-Host-Erkrankung und des Graft-versus-Leukemie-Effektes sind erst im Ansatz bekannt. Als verursachende Antigene werden die Minor Histokompatibilitäts Antigene (mHags) diskutiert. mHags sind Peptide, die aus der Prozessierung von polymorphen zelleigenen Proteinen entstehen und in HLA Molekülen allelspezifisch präsentiert werden (Abbildung 1). Im Falle einer Transplantation könnte demnach jedes zelleigene Protein als mHag fungieren, wenn Polymorphismen vorhanden sind. Differenzen zwischen Empfänger und Spender bestehen und die Peptide durch HLA Moleküle den alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen des Spenders präsentiert werden.

Aufgrund der geringen Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut ist die Charakterisierung von mHag-spezifischen T-Zellepitopen problematisch. Umfangreiche und langwierige Zellkulturen zur Etablierung von spezifischen T-Zelllinien/T-Zellklonen sind erforderlich. Unser Ziel war es, eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis von Antigen-spezifischen T-Zellen nach ex vivo Stimulation zu etablieren.

In dieser Studie verwendeten wir Peptide einer polymorphen Proteinase-3 (PR3) Region (Abbildung 2) und untersuchten, ob diese Peptide spezifische T-Zellen induzieren und daher als mHags fungieren können. Für die Untersuchungen verwendeten wir Peptide (spPR3-119V und spPR3-119I), mit den polymorphen Aminosäuren Valin bzw. Isoleucin an Position 5 im Peptid. Diese diallelischen Peptide werden durch HLA Klasse I-Moleküle allelspezifisch den HLA-A\*0201-restringierten T-Zellen präsentiert.

ABBILDUNG 1



## METHODEN

Profiling des PR3-V119I Polymorphismus mit sequenzspezifischer PCR (PCR-SSP)

↓

Isolation von mononukleären Zellen (PBMCs)  
HLA-A\*0201-positiver Spender

↓

pH 3.3 Säureelution der nativ präsentierten Peptide  
aus den HLA Klasse I Molekülen

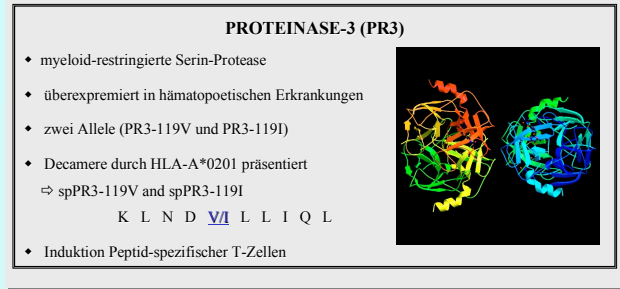
↓

Rekonstitution der trimeren HLA Komplexe durch  
rekombinantes β2-Mikroglobulin und spPR3-119V und spPR3-119I

↓

Detektion der Expression von intrazellulärem Interleukin-2 (icIL-2) in der Durchflußzytometrie

ABBILDUNG 2



## ERGEBNISSE

### VERTEILUNG DES V119I POLYMORPHISMUS - PCR-SSP

Die Verteilung des Valin/Isoleucin Polymorphismus für 221 untersuchte Spender ist in Tabelle 1 gezeigt. 47 % der Spender waren heterozygot für den PR3-119 Genort, 33 % der Spender waren Valin-homozygot und 20 % homozygot für Isoleucin. Die Verteilung der Allele innerhalb der untersuchten Population war also relativ homogen, mit 56% für das Valin-Allel und 44% für das Isoleucin-Allel.

### NACHWEIS PEPTID-SPEZIFISCHER T-ZELLEN - DURCHFLUßZYTOMETRIE

Zum Nachweis der PR3-Peptid-spezifischen T-Zellen nach Antigenstimulation wurde zunächst der Anteil an CD3/icIL-2/CD8-positiven T-Lymphozyten. Die Ergebnisse sind beispielhaft in Abbildung 4 gezeigt. Als Negativ-Kontrolle wurden säureeluierte Zellen ohne Peptide inkubiert. Zur T-Zell-Stimulationskontrolle wurde den Zellen PMA und das Kalziumionophor A23187 gegeben.

Die Ergebnisse zeigen, daß - nach Peptid- und anschließender HLA Klasse I Rekonstitution mit rekombinantem β2-Mikroglobulin und den Peptiden spPR3-119V bzw. spPR3-119I - Peptid-spezifische T-Zellen bei den für das jeweilige Allel negativen Personen (PR3-119V bzw. PR3-119I negativ) nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse konnten unter Verwendung des Nachweises eines zweiten T-Zell-Stimulationsmarkers - nämlich der Expression von CD69 auf der T-Zelloberfläche - bestätigt werden (Abbildung 4). Ein signifikanter Anstieg der CD69-Expression wurde detektiert, wenn PR3-119V-homozygote Zellen mit dem diskordanten spPR3-119I-Peptid und wenn PR3-119I-homozygote Zellen mit dem diskordanten spPR3-119V-Peptid inkubiert wurden.

TABELLE 1

VERTEILUNG DES PROTEINASE-3 V119I POLYMORPHISMUS (in %)					
PR3	PR3	PR3	FREQUENZEN		
V/V	I/I	V/I	V	I	
33	20	47	56	44	
Spenderzahl = 221					

ABBILDUNG 3

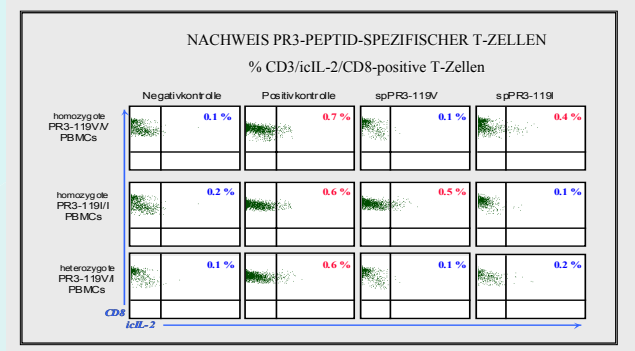
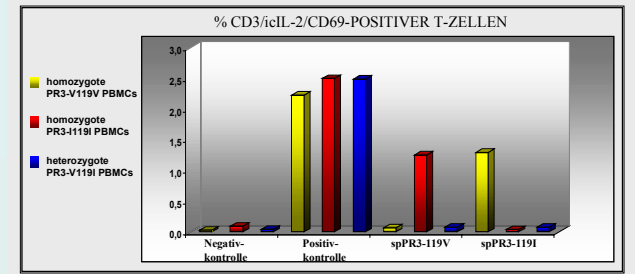


ABBILDUNG 4



## ZUSAMMENFASSUNG & DISKUSSION

PR3 erfüllt die strukturellen Kriterien eines mHags

- Phänotypfrequenzen für den PR3-V119I Polymorphismus sind homogen  
⇒ 56% der Spender mit V-Allel und 44% der Spender mit I-Allel
- Vererbung von Proteinase 3 ist unabhängig von HLA  
⇒ PR3 wird auf dem Chromosom 19 kodiert
- PR3 zeigt eine definierte Gewebeverteilung  
⇒ PR3 wird vorwiegend in myeloiden Zellen exprimiert

PR3 erfüllt die funktionellen Kriterien eines mHags

- Induktion PR3-Peptid-spezifischer T-Zellen anhand erhöhter icIL-2- und CD69-Expression nachweisbar  
⇒ spPR3-119V und spPR3-119I induzieren bei den für das jeweilige Allel-negativen PBMCs eine T-Zellaktivierung

Der V119I Polymorphismus von Proteinase-3 ist ein potentielles Minor Histokompatibilitäts Antigen in der allogenen Stammzelltransplantation.