

Aus der „Stabsstelle HLA-Labor des Klinikumsvorstandes“ am Universitätsklinikum der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Gekle

**Implementierung einer Festphasen Assay-basierenden Verträglichkeitsprobe zum
Ausschluss Donor-spezifischer Antikörper für Nierentransplantatempfänger nach
Konditionierung mit therapeutischen Antikörpern**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Susanne Apel
geboren am 14.05.1976 in Weißenfels

Betreuer: PD Dr. rer. nat. rer. medic. habil. Gerald Schlaf

Gutachter: PD Dr. rer. nat. rer. medic. habil. Gerald Schlaf
Prof. Dr. med. Paolo Fornara
Prof. Dr. med. Monika Lindemann, Essen

04.07.2017

27.03.2018

Referat

Antikörper gegen Spender-HLA-Merkmale, sogenannte Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper (DSA), repräsentieren die häufigste Ursache für hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen. Ein negativer Kreuztest, das heißt der Ausschluss dieser DSA, wird deshalb als maßgebliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation angesehen. Zur Zeit gilt der komplementabhängige Lymphozytotoxizitäts (CDC)-Kreuztest hierfür als Standardmethode. Dessen Validität kann jedoch durch artefizielle Komplementaktivierungen beeinträchtigt werden. Diese können sich z.B. als Folge von im Patientenserum enthaltenen Therapeutika wie den monoklonalen Antikörpern Rituximab und Basiliximab ergeben, da diese Antikörper oft Bestandteile der immunsuppressiven Therapie darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der ELISA-basierende Kreuztest (AMS-/AbCross-ELISA) bei Patienten unter Rituximab- oder Basiliximab-Therapie artefaktfreie Resultate erzielt und somit eine geeignete Alternative zum CDC-Standardkreuztestverfahren darstellt.

27 Seren von Patienten unter Rituximab- und vier Seren von Patienten unter Basiliximab-Therapie wurden vergleichend jeweils mittels CDC-basierendem und ELISA-basierendem Kreuztest untersucht. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil Panel-reaktiver Antikörper der Empfänger bestimmt. Für Empfänger mit nachweisbaren Panel-reaktiven Antikörpern wurden zusätzlich virtuelle Kreuztests durchgeführt, um die Validität der *de facto* Kreuztestergebnisse zu überprüfen.

In allen getesteten Fällen gelang im CDC-Kreuztest kein valider Ausschluss bzw. Nachweis von DSA. Hier kam es durch die therapeutischen Antikörper zur Komplementaktivierung und folglich zu falsch positiven Ergebnissen. Im Gegensatz dazu stimmten die Ergebnisse der ELISA-basierenden Verträglichkeitsproben mit denen der virtuellen Kreuztests in allen Fällen überein. DSA konnten sicher ausgeschlossen bzw. nachgewiesen werden. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich die methodische Überlegenheit des ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens gegenüber dem CDC-Standardkreuztestverfahren. Folglich sollte in Situationen, in denen der CDC-basierende Kreuztest keine plausiblen Ergebnisse liefert, der ELISA-basierende Kreuztest als alternatives oder komplementäres Verfahren eingesetzt werden.

Apel, Susanne: Implementierung einer Festphasen Assay-basierenden Verträglichkeitsprobe zum Ausschluss Donor-spezifischer Antikörper für Nierentransplantatempfänger nach Konditionierung mit therapeutischen Antikörpern, Halle(Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 68 Seiten, 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i> , MHC)	1
1.1.1 Struktur und physiologische Funktion der MHC-Moleküle	1
1.1.2 Genetische Lokalisation des humanen MHC-Komplexes	3
1.1.3 Genetische Variabilität der HLA-Merkmale - Polygenie, Polymorphismus, kodominante Vererbung	5
1.2 HLA-Merkmale und Transplantation	6
1.2.1 Klassifizierung der Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit ihres zeitlichen Verlaufs nach der Transplantation	7
1.2.2 Donor-spezifische Antikörper (DSA)	9
1.3 Überblick über Nachweismethoden zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper	10
1.3.1 Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitätskreuztest	10
1.3.2 Durchflusszytometrischer Kreuztest	11
1.3.3 Virtueller Kreuztest	11
1.3.4 ELISA-basierende Kreuztestverfahren	13
1.4 Therapeutische Antikörper	14
1.4.1 Rituximab (MabThera ^R)	14
1.4.2 Basiliximab (Simulect ^R)	15
2 Zielstellung	16
3 Materialien und Methoden	17
3.1 Geräte	17
3.2 Lösungen und Puffer	17
3.3 AbCross HLA-ELISA zur Darstellung Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper	19
3.4 Sonstige Materialien	20

3.5	Patientenseren	20
3.6	AbCross HLA-Klasse I/II ELISA	20
3.6.1	Testprinzip des HLA-Klasse I/II ELISA	20
3.6.2	Aufbereitung des Spendermaterials	21
3.6.3	Durchführung des AbCross HLA-Klasse I/II ELISA	22
3.7	Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (<i>Complement-Dependent-Cytotoxicity Crossmatch, CDC-CM</i>)	25
3.7.1	Testprinzip des CDC-CM	25
3.7.2	Aufbereitung des Spendermaterials aus Vollblut	27
3.7.3	Durchführung des CDC-CM	28
3.8	Virtueller Kreuztest zur theoretischen Bestimmung Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper	30
3.8.1	Suchtest zur Detektion von anti-HLA-Antikörpern (Antikörperscreening)	30
3.8.2	Spezifizierung von anti-HLA-Antikörpern	30
3.8.3	Serologische Typisierung von HLA-Merkmalen (Phänotypisierung)	31
3.8.4	Niedrig auflösende Genotypisierung von HLA-Allelen der Klasse I und II	34
4	Ergebnisse	37
4.1	Untersuchung der Seren Rituximab-behandelter Patienten auf Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper in Vorbereitung auf eine ABO-Blutgruppeninkompatible Nierentransplantation	37
4.2	Untersuchung der Seren Basiliximab-behandelter Patienten auf Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper zur Analyse akuter Abstoßungsreaktionen	40
5	Diskussion	43
5.1	Konditionierung mit Rituximab und Basiliximab führt zu falsch positiven Testergebnissen im Standard-Kreuztestverfahren	43
5.2	Der ELISA-basierende Kreuztest schließt eine diagnostische Lücke in der Transplantationsmedizin	46
5.3	Schlussfolgerung	49
5.4	Limitationen der Arbeit	50
6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	53

8	Thesen	61
	Selbständigkeitserklärung	ix
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	x
	Lebenslauf	xi
	Danksagung	xii

Abkürzungsverzeichnis

<i>ADCC</i>	<i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i> , antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AHG	Anti-Humanglobulin
<i>APC</i>	<i>Antigen Presenting Cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
<i>CD</i>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<i>CDC</i>	<i>Complement Dependent Lymphocytotoxicity Assay</i> , komplementabhängiger Lymphozytotoxizitätstest
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
DSA	Donor-spezifische Antikörper
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<i>EMA</i>	<i>European Medicines Agency</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
<i>HRP</i>	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
mAK	monoklonaler Antikörper
MB	Megabasen
<i>MHC</i>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
<i>MIC</i>	<i>MHC-Class-I-Related-Chain</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
<i>NIH</i>	<i>National Institute of Health</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PRA	Panel-reaktive Antikörper
<i>RCLB</i>	<i>Red Cell Lysis Buffer</i>
RT	Raumtemperatur
RA	Rheumatoide Arthritis

Abkürzungsverzeichnis

RiLiBÄK	Richtlinien der Bundesärztekammer
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSP-PCR	<i>Sequence Specific Primer</i> -Polymerasekettenreaktion
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Umdrehungen

Abbildungsverzeichnis

1	Struktur der HLA Moleküle	2
2	Genetische Organisation des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes	4
3	Überblick über die Klassifizierung der Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit ihres zeitlichen Verlaufs	7
4	Schematische Darstellung des AbCross HLA-Klasse I ELISA	21
5	Schematische Darstellung des CDC-CM; Antikörperbindung und Zelllyse	26
6	Differenzierung vitaler und letaler Zellen im CDC; Fluoreszenzdoppelfärbung . .	27
7	Reaktionsprotokoll für die serologische Typisierung	33
8	Reaktionsprotokoll für die Auswertung der HLA-Klasse-I Genotypisierung	35
9	Reaktionsprotokoll für die Auswertung der HLA-Klasse-II Genotypisierung	36

Tabellenverzeichnis

1	Anzahl der derzeit bekannten HLA-Allele und HLA-Antigene, Stand 12/2016 . . .	6
2	Geräte	17
3	Komponenten des AbCross-Komplettsystems	19
4	Sonstige Materialien	20
5	Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 1. Inkubationsschritt	22
6	Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 2. Inkubationsschritt	23
7	Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 3. Inkubationsschritt	24
8	Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 4. Inkubationsschritt	24
9	Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 5. Inkubationsschritt	25
10	Pipettierschema Dichtegradientenzentrifugation	27
11	Pipettierschema CDC-CM, 1. Inkubationsschritt	28
12	Pipettierschema CDC-CM, 2. Inkubationsschritt	29
13	Pipettierschema CDC-CM, 3. Inkubationsschritt	29
14	Pipettierschema CDC-CM, 4. Inkubationsschritt	29
15	Score-System zur Auswertung des CDC-CM (NIH)	30
16	Gegenüberstellung der Ergebnisse von komplementabhängigem Lymphozytotoxizitäts- (CDC-CM) und ELISA-Kreuztest (ELISA-CM) für Patienten der Rituximab-Gruppe	37
17	Virtuelle Kreuztestergebnisse der immunisierten Patienten aus der Rituximab-Gruppe	39
18	Gegenüberstellung der Ergebnisse von komplementabhängigem Lymphozytotoxizitäts- (CDC-CM) und ELISA-Kreuztest (ELISA-CM) für Patienten der Basiliximab-Gruppe	40
19	Ergebnisse des virtuellen Kreuztestes der Spender-Empfängerkombinationen aus der Basiliximab-Gruppe	41
20	Darstellung der HLA-Merkmale des hochimmunisierten Patienten 2 aus der Basiliximab-Gruppe und seines Lebendnierenspenders	42

1 Einleitung

1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex, MHC*)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen, der als Humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA-System) bezeichnet wird, wurde erstmals im Jahr 1958 durch J. Dausset beschrieben. Dausset fand im Blut polytransfundierter Patienten einen Antikörper gegen ein Antigen, das er MAC nannte und welches dem heute als HLA-A2 bezeichneten Merkmal entspricht. Ausgehend von dieser Entdeckung gelang es in den folgenden Jahren, weitere Merkmale zu identifizieren sowie einen Zusammenhang zwischen dem Transplantatüberleben und der HLA-Kompatibilität transplanteder Nieren mit den Empfänger-Merkmalen herzustellen (Dausset, 1958; Batchelor und Joysey, 1969; Dausset et al., 1970) .

1.1.1 Struktur und physiologische Funktion der MHC-Moleküle

Bei den MHC-Molekülen handelt es sich um peptidbindende Glykoproteine, die eine zentrale Rolle in der Immunreaktion spielen. Nach Bindung von Peptidfragmenten präsentieren sie diese als Antigene an T-Lymphozyten und leiten so die Immunantwort ein. In Abhängigkeit von der MHC-Klasse werden Antigene endogenen (MHC-I) oder exogenen (MHC-II) Ursprungs und unterschiedlicher Größe präsentiert. Wird ein solcher MHC-Peptid-Komplex von einem spezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt, so wird durch diese Interaktion die T-Zell-vermittelte Pathogenabwehr eingeleitet (Engelhard, 1994).

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer schweren hochpolymorphen α -Kette (Molekulargewicht ca. 44 kDa) und dem kleineren nicht polymorphen β_2 -Mikroglobulin (Molekulargewicht ca. 11,5 kDa), das der α -Kette nichtkovalent angelagert ist (Abbildung 1). Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 und α_3), einem Transmembranteil und einer kurzen zytoplasmatischen Region. Die α_3 -Domäne und das β_2 -Mikroglobulin sind hochkonserviert und ähneln in ihrem Aufbau der konstanten Region der Proteine aus der Immunglobulin-Superfamilie. Durch die Interaktion des β_2 -Mikroglobulins mit der α_3 -Domäne wird die Gesamtkonformation des MHC-Klasse-I-Moleküls stabilisiert und die Peptidpräsentation erst ermöglicht (Björkman et al., 1987). Die polymorphen α_1 - und α_2 -Domänen bilden die Wände der Antigenbindungsstelle für Proteinfragmente mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren (Murphy et al., 2009).

MHC-Klasse II Moleküle weisen ebenfalls eine heterodimere Zusammensetzung auf, wobei sie aus einer schwereren α -Kette mit einem Molekulargewicht von 33-35 kDa und einer leichteren β -Kette mit einem Molekulargewicht von 26-29 kDa bestehen (Abbildung 1). Jede der beiden Ketten setzt sich aus einer polymorphen Region ($\alpha 1$ bzw. $\beta 1$), die die Antigenbindungsstelle bildet, einer Domäne mit geringer Variabilität ($\alpha 2$ bzw. $\beta 2$), die strukturelle Ähnlichkeit zu den Immunglobulinen aufweist, einer transmembranären Domäne sowie einem kurzen zytoplasmatischen Stück zusammen. Im Unterschied zu den HLA-Klasse-I-Merkmalen sind die spaltbildenden Domänen offen gestaltet, wodurch größere Peptide mit einer Länge von 16 bis 20 Aminosäuren gebunden und präsentiert werden können (Klein und Sato, 2000; Wassmuth, 2005; Murphy et al., 2009).

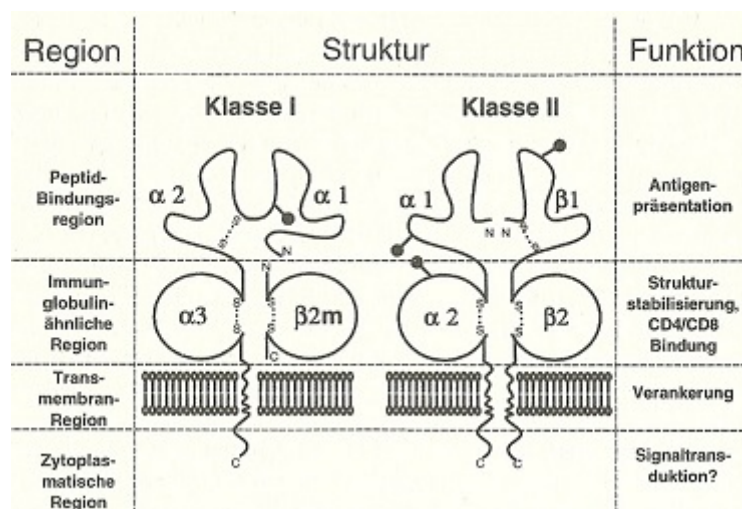


Abbildung 1: **Struktur und Funktion von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen.** MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer hochpolymorphen α -Kette, deren Domänen 1 und 2 die Antigenbindungsstelle bilden und dem monomorphen β_2 -Mikroglobulin, welches gemeinsam mit der $\alpha 3$ -Domäne der Strukturstabilisierung dient. Die beiden Ketten der MHC-Klasse-II-Moleküle sind gleichermaßen an der Bildung der Antigenbindungsstelle (polymorphe Bereiche $\alpha 1$ und $\beta 1$) sowie an der Strukturstabilisierung (nicht polymorphe Regionen $\alpha 2$ bzw. $\beta 2$) beteiligt. [Quelle: (Wassmuth, 2005)]

T-Zellen sind nicht in der Lage, freie Antigene zu erkennen. Sie werden nur dann aktiviert, wenn ihnen Peptidantigene, an MHC-Moleküle gebunden, präsentiert werden. Diese Einschränkung bezeichnet man als MHC-Restriktion. MHC-Klasse-I-Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten exprimiert werden, sind vorwiegend für die Präsentation endogener Peptide an CD8-positive zytotoxische T-Zellen verantwortlich. MHC-Klasse-II-Moleküle, die konstitutiv nur auf sogenannten professionellen anti-

genpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden sind, präsentieren exogene Peptide an CD4-positive T-Helferzellen (Klein und Sato, 2000; Murphy et al., 2009). Stress-induziert können diese Moleküle aber auch auf anderen Zellen exprimiert werden. Hierzu gehören neben aktivierten T-Zellen auch Endothelzellen und die Tubulusepithelzellen der Niere, für die insbesondere im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen transplantierte Nieren eine erhöhte Expression von HLA-DR-Molekülen gezeigt wurde (Hall et al., 1984; Wen et al., 2013).

1.1.2 Genetische Lokalisation des humanen MHC-Komplexes

Die Gene des HLA-Systems sind mit Ausnahme des Gens, das das β_2 -Mikroglobulin kodiert, auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.1-6p21.3) lokalisiert. Der gesamte Komplex klassischer HLA-Gene umfasst eine Größe von mindestens 3,6 Mb und besteht aus drei Regionen (Abbildung 2). Die Region der HLA-Klasse-I-Gene befindet sich auf der telomeren, die der HLA-Klasse-II-Gene auf der dem Zentromer zugewandten Seite. Zwischen diesen beiden Bereichen liegt der historisch als HLA-Klasse-III-Region bezeichnete Genabschnitt, der weder HLA-Klasse-I noch HLA-Klasse-II ähnliche Gene beinhaltet. Es handelt sich vielmehr um einen Genabschnitt, der eine äußerst heterogene Gruppe von Molekülen unterschiedlichster Funktion kodiert. Dazu gehören unter anderem Gene für Komplementfaktoren (C2, C4, B), Zytokine ($\text{TNF}\alpha$, LTA, LTB), Chaperone (Hitze-schockproteine, HSP) und Komponenten der Cytochrom P450-Superfamilie (CYP21A2). In allen Regionen liegen zahlreiche Pseudogene, die nicht exprimiert werden (Trowsdale et al., 1991; The MHC sequencing consortium*, 1999; Mungall et al., 2003; Shiina et al., 2009).

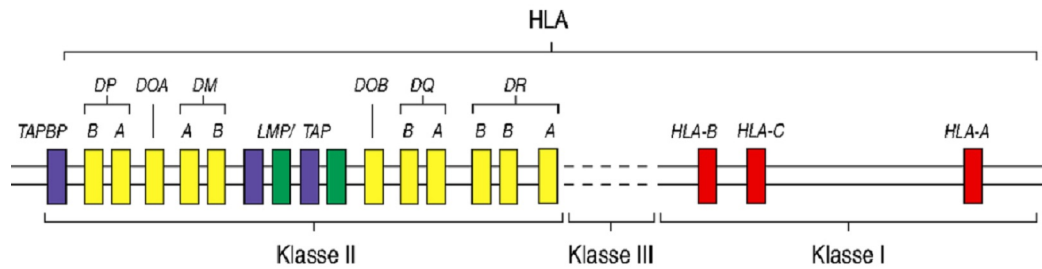


Abbildung 2: **Genetische Organisation des humanen Haupthistokompatibilitätskomplexes.** Dargestellt ist der Aufbau der für antigenpräsentierende HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle kodierenden MHC-Gene des Menschen. In der Klasse-I-Genregion (rot) liegen die drei Hauptgene für die jeweilige α -Kette des MHC-I-Proteins (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Das Gen für das β_2 -Mikroglobulin liegt, obwohl es ebenfalls einen Teil des MHC-Klasse-I-Moleküls kodiert, auf einem anderen Chromosom (Chromosom 15). In der Klasse-II-Genregion befinden sich die Gene für die α - und β -Ketten (jeweils mit A und B bezeichnet) der MHC-II-Moleküle DR, DQ und DP (gelb). Gene für Moleküle, die an der HLA-Klasse-I-spezifischen Antigenprozessierung beteiligt sind (*TAP*, *TAPBP*, *LMP*) und die *HLA-DM*- und *DO*-Gene, die Bedeutung für die Bindung von Peptiden an HLA-Klasse-II-Moleküle haben, sind ebenfalls in der HLA-Klasse-III-Genregion kodiert. Zwischen beiden Abschnitten befinden sich die Gene der HLA-Klasse-III-Region (gestrichelte Linie). Quelle: (Murphy et al., 2009)

In der HLA-Klasse-I-Genregion findet man drei Genorte (HLA-A, -B, -C), die die α -Ketten der klassischen, d.h. serologisch definierten und transplantationsrelevanten HLA-Klasse-I-Moleküle kodieren und in bestimmten Abschnitten (Domänen) hochpolymorph sind. Ebenfalls hier lokalisiert liegen die wenig polymorphen Gene der nichtklassischen HLA-Moleküle HLA-E, HLA-F und HLA-G, deren Produkte durch Induktion einer gesteigerten Immuntoleranz eine protektive Rolle bei entzündlichen Prozessen und Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises spielen (Lee et al., 1998; Pietra et al., 2010; Rouas-Freiss et al., 2014; Zidi et al., 2016). HLA-G-Moleküle, die zuerst auf Trophoblastzellen der Plazenta gefunden wurden, sind außerdem an der maternalen Toleranz während der Schwangerschaft beteiligt (Alegre et al., 2014; Rebmann et al., 2014). Auf der zentromeren Seite des Komplexes liegen die Gene der MIC-(*MHC-Class-I-Related-Chain*) Familie, die ebenfalls hochpolymorph sind (Bahram et al., 1994). Sie kodieren Proteine, die streß-induziert auf der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert werden und als Liganden für den NKG2D-Rezeptor dienen. Dieser befindet sich auf der Oberfläche von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die über Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen akti-

viert werden (Groh et al., 1996; Bauer et al., 1999; Vivier et al., 2002; Carapito und Bahram, 2015). Das Gen für das β_2 -Mikroglobulin, welches nichtkovalent mit der α -Kette assoziiert ist, liegt hingegen auf dem Chromosom 15 (Murphy et al., 2009).

Die HLA-Klasse-II-Moleküle werden durch die drei Genorte HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP kodiert. In der HLA-DR Region befindet sich ein Gen (DRA) für die α -Kette und bis zu vier exprimierte Gene (DRB 1,3,4,5) für die β -Kette des HLA-DR Moleküls. Das HLA-DRB1-Gen, das die HLA-Merkmale DR 1-18 kodiert, wird konstitutiv exprimiert, während HLA-DRB3, -DRB4 und -DRB5 mit ihren Genprodukten nur bei bestimmten Haplotypen vorhanden sind. In der HLA-DQ-, sowie die HLA-DP-Region liegt jeweils ein Gen zur Expression der α - und β -Ketten.

Weitere Gene in der HLA-Klasse-II-Region kodieren Moleküle, die in den Transport und die Prozessierung zu präsentierender Antigene involviert sind (TAP1:TAP2-Peptidtransporter = TAP, Tapasin = TAPBP, Proteasomgene = LMP, DO- und DM-Molekül = DM, DOA, DOB) (The MHC sequencing consortium*, 1999).

1.1.3 Genetische Variabilität der HLA-Merkmale - Polygenie, Polymorphismus, kodominante Vererbung

Um auf ein breites Spektrum von Pathogenen reagieren zu können, muss ein hoher Grad an Diversifikation der HLA-Moleküle innerhalb einer Population gewährleistet sein. Diese Variabilität beruht auf drei Mechanismen: Polygenie, Polymorphismus und kodominante Vererbung der Merkmale. Wie bereits beschrieben, existieren für jede MHC-Klasse mehrere Genorte (Polygenie). Somit exprimiert jeder Mensch die Produkte von drei verschiedenen HLA-Klasse-I-(A-, B-, C-) und drei bzw. vier verschiedenen HLA-Klasse-II-(DR-, DQ-, DP-) Genorten. Diese Merkmale werden kodominant vererbt, so dass jeder Mensch je ein mütterliches und ein väterliches Allel des gleichen Genortes besitzt, die auch beide exprimiert werden. Sind beide Allele identisch, spricht man von Homozygotie, bei unterschiedlichen Allelen von Heterozygotie bezüglich dieses Merkmals. Heterozygote Individuen exprimieren demnach bis zu 14 verschiedene HLA-Merkmale (je drei mütterliche und drei väterliche HLA-Klasse-I- plus jeweils vier mütterliche und vier väterliche HLA-Klasse-II-Merkmale) komplett homozygote Individuen dagegen maximal 6 Merkmale. Die Gesamtheit der Allele aller HLA-Genorte eines Chromosoms wird als Haplotyp bezeichnet (Wassmuth, 2005).

Die Gene des MHC-Komplexes weisen darüber hinaus einen hochgradigen Polymorphis-

mus auf, so dass für jedes HLA-Merkmal zahlreiche allelische Varianten existieren (multiple Allelie). Dieses Phänomen trägt in erster Linie zur Vielfalt der HLA-Moleküle innerhalb der Population bei. Bisher wurden bereits mehr als 16.000 Allele beschrieben, darunter über 4.000 Allele allein für das HLA-B-Molekül (Tabelle 1). Der MHC-Komplex ist somit als Genkomplex mit dem höchsten bekannten Polymorphismusgrad anzusehen (Murphy et al., 2009).

Tabelle 1: Anzahl der derzeit bekannten HLA-Allele und HLA-Antigene, Stand 12/2016

HLA-Klasse	A	B	C	DRB	DQB	DPB
HLA-Allele	3.830	4.647	3.382	2.252	1.054	740
HLA-Antigene	2.703	3.408	2.391	1.661	727	740

[Quelle: (EMBL-EBI und Services, 2017)]

Die Polymorphismen treten fast ausschließlich in den Regionen auf, die der Antigenpräsentation dienen. Molekül-stabilisierende Regionen wie z.B. die $\alpha 3$ -Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls unterliegen einer derart ausgeprägten allelischen Variabilität nicht (Murphy et al., 2009).

1.2 HLA-Merkmale und Transplantation

HLA-Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung körperfremder Zellen. Bei der Transplantation nicht HLA-identischer Organe wird mit ihrer Hilfe eine Immunantwort ausgelöst. Diese kann über zwei Wege induziert werden. Zum einen können HLA-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen des Spenders mit spendereigenen Peptiden einen immunogenen Komplex bilden, der zur Aktivierung alloreaktiver T-Zellen des Empfängers führt (direkter Weg). Zum anderen können alloreaktive T-Zellen auch über antigenpräsentierende Zellen des Empfängers, die aus Spender-HLA-Molekülen abgebaute Peptide als Antigen präsentieren, aktiviert werden (indirekter Weg). Während über den indirekten Weg die initiale Sensibilisierung verläuft, ist der direkte Weg vor allem an der Aufrechterhaltung des Abstoßungsprozesses beteiligt (Lechler und Batchelor, 1982; Benichou et al., 1992; Benichou, 1999).

Eine größtmögliche Übereinstimmung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger ist somit von erheblichem Vorteil für die Nachhaltigkeit einer Transplantation. Zahlrei-

che Studien zeigten den Zusammenhang zwischen der Anzahl der sogenannten HLA-“mismatches“ und dem Transplantatüberleben (Opelz et al., 1994; Opelz und Döhler, 2007; Süsal und Opelz, 2013; Williams et al., 2016). Den stärksten Einfluß scheinen hierbei die HLA-DR Merkmale, gefolgt von HLA-B- und HLA-A-Merkmalen zu besitzen (Feucht und Opelz, 1996). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch HLA-C und HLA-DP-Inkompatibilitäten erhebliche negative Effekte auf das Transplantationsergebnis haben können (Frohn et al., 2001; Tran et al., 2011; Jolly et al., 2012).

1.2.1 Klassifizierung der Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit ihres zeitlichen Verlaufs nach der Transplantation

Basierend auf dem zeitlichen Verlauf der Immunreaktion werden Abstoßungsreaktionen in hyperakut, akut und chronisch eingeteilt (Abbildung 3).

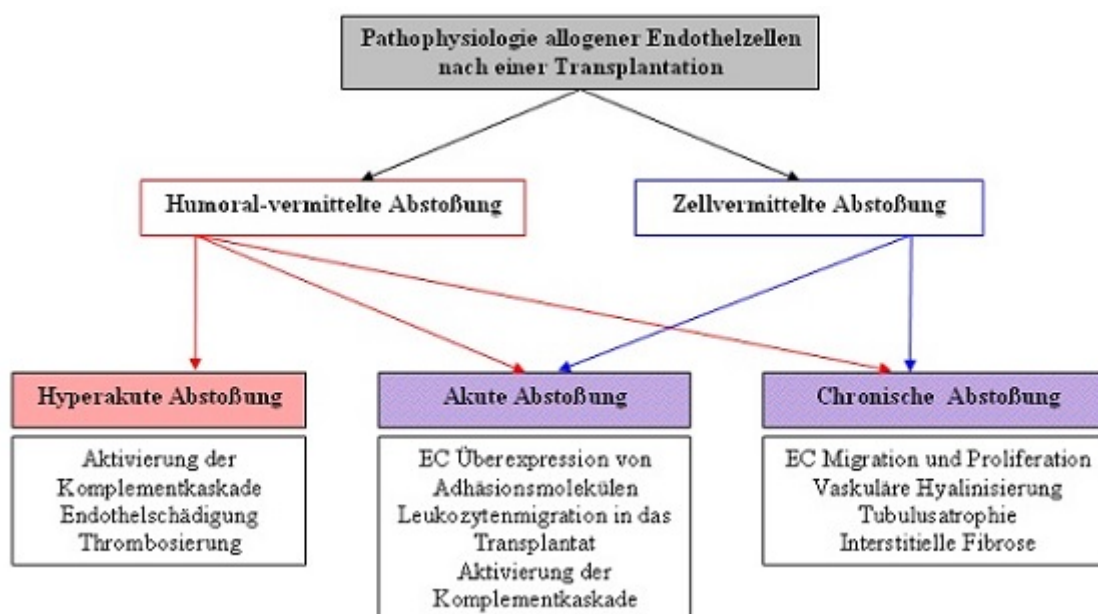


Abbildung 3: **Überblick über die Klassifizierung der Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit ihres zeitlichen Verlaufs.** Dargestellt ist die Klassifizierung der Abstoßungsreaktionen solider Organe in Abhängigkeit ihres zeitlichen Verlaufs. Den einzelnen Abstoßungsreaktionen sind die ihnen zugrunde liegenden Mechanismen zugeordnet. Während die hyperakute Abstoßung allein humoral vermittelt wird, beruhen akute und chronische Abstoßungsreaktionen auf dem Zusammenwirken humoraler und Zell-vermittelter Mechanismen. [Quelle: modifiziert nach (Piotti et al., 2014)]

Als hyperakute Abstoßungsreaktion bezeichnet man die irreversible Schädigung eines Transplantates innerhalb von Minuten bis maximal 48 Stunden nach der Transplantation. Ursächlich für diese Art von Transplantatabstoßung sind präformierte, zytotoxische Antikörper gegen Antigene, die sich auf den Endothelien der Blutgefäße des Transplantates befinden. Hierzu zählen in erster Linie anti-HLA-Antikörper und AB0-Blutgruppenspezifische Antikörper, die nach Bindung an Endothelzellen zur Aktivierung des Komplementsystems führen. Die Komplementaktivierung führt zu einer ausgeprägten Schädigung des Endothels und einer Freisetzung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wodurch es zur Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt. Letztendlich wird durch Thrombosierung der Gefäße die Organdurchblutung unterbunden; es kommt zum Organinfarkt und somit zum Verlust der Transplantatfunktion (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966; Piotti et al., 2014; Becker et al., 2016).

Akute Abstoßungsreaktionen treten in den ersten Tagen bis Wochen nach der Transplantation auf. Man unterscheidet die Zell-vermittelte akute Abstoßungsreaktion von der ebenfalls akuten Antikörper-vermittelten (humoralen) Abstoßungsreaktion. Der zellvermittelten Abstoßungsreaktion liegen die bereits in Kapitel 1.2 erläuterten Mechanismen zu Grunde. Durch Einwanderung von T-Zellen in das interstitielle Gewebe des Transplantates kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen des Spenderorgans, die dann vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren und Entzündungsmediatoren produzieren. Die Ausbildung eines Entzündungsherdes mit nachfolgender Nekrotisierung führt zur nachfolgenden Zerstörung des Transplantates. (Cornell et al., 2008; Becker et al., 2016). Die humorale d.h. Antikörper-vermittelte akute Abstoßungsreaktion beruht zum einen auf präformierten, zum anderen auf *de novo* synthetisierten Alloantikörpern. Erstere sind in vielen Fällen zum Zeitpunkt der Transplantation nicht detektierbar, führen jedoch aufgrund des immunologischen Gedächtnisses und der daraus resultierenden beschleunigten Antikörperneubildung über die Aktivierung des Komplementsystems zur Rejektion des Transplantates. Bioptisch nachweisbares Korrelat dieser humoral vermittelten Abstoßungsreaktion ist häufig das Komplement-Spaltprodukt C4d, das in den Kapillaren abgelagert wird. Der immunhistochemische Nachweis von C4d ist demnach ein wichtiges Diagnosekriterium für die humorale Abstoßungsreaktion (Feucht et al., 1993; Cooper et al., 2011; Haas et al., 2014; Gonzalez-Molina et al., 2016). Grundsätzlich wird die akute Abstoßungsreaktion in nahezu allen Fällen als Zusammenspiel zellulärer und humoraler Mechanismen betrachtet.

Die chronische Abstoßungsreaktion, die als Begriff vielfältige pathologische Mechanismen bezeichnet, entwickelt sich über Monate bis Jahre und beruht sowohl auf alloreaktiven, als auch auf nicht alloreaktiven Mechanismen. Alloreaktivität wird sowohl zellulär als auch humoral vermittelt. Durch alloreaktive T-Zellen wird eine chronische Entzündung ausgelöst, durch die es zur Atrophie der Tubuli, zur interstitiellen Fibrose und schließlich zum irreversiblen Organversagen kommt. Im Tiermodell konnte außerdem eine durch alloreaktive IgG-Antikörper ausgelöste beschleunigte Arteriosklerose in transplantierten soliden Organen gezeigt werden. Nicht auf Alloreaktivität beruhende Ursachen der chronischen Transplantatabstoßung sind zum einen auf Ischämieperfusionschäden aus der Transplantationsdurchführung, die im weiteren Verlauf nachteilige Effekte auf das Organ haben können zum anderen auf toxische Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie zurückzuführen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere der Calcineurin-Inhibitor Ciclosporin zu erwähnen. Dieses Immunsuppressivum führt bei längerdauernder Therapie durch Fibrosierung des Interstitiums und Atrophie der Tubuli nicht selten zum Funktionsverlust des Organs (Cornell und Colvin, 2005; Murphy et al., 2009).

1.2.2 Donor-spezifische Antikörper (DSA)

Bereits in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass für hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen überwiegend präformierte oder *de novo* synthetisierte und gegen Oberflächenmarker der Spenderlymphozyten gerichtete Antikörper verantwortlich sind (Kissmeyer-Nielsen et al., 1966; Patel und Terasaki, 1969). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei den das Antigen repräsentierenden Molekülen in den meisten Fällen um HLA-Merkmale des Spenders handelt. Die vom Empfänger gebildeten Antikörper wurden aufgrund der Tatsache, dass sie spezifisch gegen Merkmale eines bestimmten Spenders gerichtet sind, als Donor-spezifisch bezeichnet.

Aus neueren Untersuchungen weiß man, dass neben anti-HLA-Antikörpern auch Donor-spezifische Antikörper existieren, die gegen andere Oberflächenmarker auf den Endothelzellen gerichtet sind. Zielstrukturen dieser Antikörper sind z.B. AB0-Blutgruppenantigene oder die in Analogie mit den HLA-Merkmalen hochpolymorphen MICA-Moleküle. Präformierte Antikörper gegen MICA verkürzten das Transplantatüberleben, selbst wenn der Transplantatempfänger keine anti-HLA-Antikörper entwickelt hatte (Mehra et al., 2013).

1.3 Überblick über Nachweismethoden zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper

1.3.1 Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitätskreuztest

Der heute als Standardverfahren verwendete komplementabhängige Lymphozytotoxizitätstest (CDC) wurde vor bereits vor etwa 50 Jahren von Patel und Terasaki entwickelt (Patel und Terasaki, 1969). Nach Inkubation der Spenderlymphozyten mit dem Empfängerserum binden Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper des Empfängers an die HLA-Moleküle auf den Spenderzellen. Durch Zugabe von Kaninchenkomplement wird die Komplementkaskade über den klassischen Weg aktiviert und die Antikörper-markierten Zellen lysiert. Ein positives Testergebnis ist also an das Vorhandensein komplementaktivierender Donor-spezifischer Antikörper gebunden. Die lysierten Zellen werden im nächsten Schritt durch Ethidiumbromid rot gefärbt, während nicht durch DSA markierte und folglich nicht durch die Komplementkomponenten attackierte vitale Zellen durch Acridinorange grün gefärbt werden (Schlaf et al., 2014a). Das Testprinzip sowie die Testdurchführung werden in Kapitel 3.7 genauer erläutert.

Hat der Spender ausschließlich Antikörper gegen HLA-Klasse-II-Merkmale gebildet, erreicht der CDC-Kreuztest bei Verwendung unfraktionierter Peripherer Blutlymphozyten (PBL) nur eine geringe Sensitivität, da sich Klasse-II-Merkmale nur auf maximal 20 % der PBL (B-Lymphozyten, Monozyten) befinden. Selbst bei einer starken Antigen-Antikörper-Reaktion werden deshalb nur schwach positive Scores erreicht (Tabelle 15). Eine Erhöhung der Sensitivität kann zum einen durch die Verwendung separierter T- und B-Lymphozyten, zum anderen durch den Einsatz polyklonaler anti-human-IgG-Antikörper (Anti-Humanglobulin, AHG) als quasi zwischengeschaltete Sekundärantikörper erreicht werden. Bei diesem modifizierten AHG-verstärkten Kreuztest bewirken die Sekundärantikörper eine forcierte Komplementaktivierung und daraus resultierend eine erhöhte Testsensitivität (Schlaf et al., 2014a). Ein weiterer Nachteil des CDC-Kreuztestes als zellulärer Vitalitätstest ist die strikte Abhängigkeit seiner Interpretierbarkeit von intakten Spenderlymphozyten. Eine erhebliche Einschränkung erfährt die Spezifität des CDC-Kreuztestes auch dadurch, dass neben den Spender-spezifischen anti-HLA-Antikörpern auch andere komplementfixierende Antikörper detektiert werden. Somit kommt es bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Systemischer Lupus Erythematoses) oder unter Behandlung mit therapeutischen Antikörpern bereits unter theore-

tischen Gesichtspunkten zwangsläufig zu falsch positiven Ergebnissen bei Verwendung des CDC-Kreuztestes (Schlaf et al., 2012, 2014b). Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 5.2 ausführlich eingegangen.

1.3.2 Durchflusszytometrischer Kreuztest

Eine dem AHG-verstärkten Kreuztest vergleichbar hohe Sensitivität erreicht der durchflusszytometrische Kreuztest (*Fluorescence-Activated Cell Sorter-Crossmatch*, FACS-CM). Nach Bindung der DSA aus dem Empfängerserum an HLA-Moleküle auf den Spenderlymphozyten erfolgt die Detektion der DSA über eine indirekte Fluoreszenzmarkierung mittels monoklonaler oder polyklonaler anti-human-Ig-Sekundärantikörper. Dieses Verfahren ermöglicht den Nachweis komplementfixierender und nicht-komplementfixierender Antikörper. Allerdings kann das Testergebnis in erheblicher Weise durch die unspezifische Bindung irrelevanter Antikörper an Fc-Rezeptoren der Donor-B-Lymphozyten beeinflusst werden. Zur Vermeidung dieser unspezifischen Bindungen wurde das Verfahren durch den Zusatz von Pronase, einem Enzym, das Fc-Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt, modifiziert. Allerdings beeinflusste der Pronase-Zusatz auch die Nachweisbarkeit von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche und somit die Reaktionsergebnisse des FACS-basierenden Kreuztestes (Hetrick et al., 2011). Einen anderen Ansatz, unspezifische Bindung über Fc-Rezeptoren zu vermeiden, beschrieben Hajeer et al. (2009). Sie nutzten zur Blockade von Fc-Rezeptoren hitzedenaturiertes Kaninchenserum, wodurch eine erhebliche Verbesserung der Testspezifität erreicht werden konnte (Hajeer et al., 2009). Allerdings ist in Analogie zum CDC-basierenden Kreuztest auch die Interpretierbarkeit des FACS-basierenden Kreuztestes von der initialen Vitalität der Donorzellen in erheblicher Weise abhängig (Altermann et al., 2006).

1.3.3 Virtueller Kreuztest

Im virtuellen Kreuztest werden die anti-HLA Antikörperspezifitäten des Empfängers mit den HLA-Merkmalen des Spenders auf Übereinstimmung verglichen.

Eine im Gegensatz zu den historischen Zellplattenassays verlässlichere Möglichkeit der Bestimmung von Antikörperspezifitäten stellen Festphasen-basierende Verfahren dar. In der niedrig-auflösenden Variante verwenden diese Testsysteme HLA-Moleküle einzelner

Thrombozytenspender (QuikID/GTI, Waukesha, USA) bzw. EBV-transformierter humaner Zelllinien (PRA-STAT/Sang Stat Medical Corp., Palo Alto, USA) als antigene Komponenten zur Darstellung von anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern (Worthington et al., 2001; Tait, 2016). Zu den Festphasen-basierenden Verfahren gehörte auch das DynaChip-System (Invitrogen/Dynal, Bromborough, UK), das das einzige Chip-basierende und somit voll automatisierte Verfahren für die anti-HLA-Antikörper Analyse darstellte, bis es 2011 aus kommerziellen Gründen vom Markt genommen wurde. Es bestand aus einem Mikrochip, der an 106 Positionen mit HLA-Klasse-I- und an 48 Positionen mit HLA-Klasse-II-Molekülen jeweils einzelner Spender besetzt war.

Die hochauflösenden Variante dieser Spezifizierungsassays ermöglicht durch die Verwendung rekombinant hergestellter einzelner immobilisierter HLA-Klasse-I- bzw. HLA-Klasse-II-Moleküle (LATTM/One Lambda, Canoga Park, USA) den Nachweis von Antikörpern gegen häufige singuläre und verschiedene seltene HLA-Phänotypen.

Die Vorteile der Festphasen-basierenden Techniken liegen in ihrer Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit vitaler Zellen und der Möglichkeit der Identifikation sowohl komplementaktivierender als auch nicht-komplementaktivierender Antikörper (Schlaf et al., 2014a).

Eine zweite Möglichkeit zur anti-HLA Antikörperspezifizierung ist die Luminex Technik, die die derzeit am häufigsten verwendete Methode darstellt. Sie beruht auf der Verwendung von Mikropartikeln (Beads), die sich in ihren Fluoreszenzfarbtönen unterscheiden. Diese werden mit verschiedenen HLA-Molekülen eines Spenders (Single Donor Auflösung) oder Einzelantigenen (Single Antigen Auflösung) beladen, an die bei entsprechender Inkubation die im Empfängerserum vorhandenen anti-HLA-Antikörper binden. Die Detektion erfolgt über anti-human-IgG- oder anti-human-IgG/IgM/IgA-Sekundärantikörper, an die Phycoerythrin, ein Fluoreszenzfarbstoff, gekoppelt ist. Dessen Spektralbereich unterscheidet sich von dem in den Beads eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffen. Die Analyse und Auswertung erfolgt mit dem Luminex-Analysesystem, welches zwei Laser enthält. Während der erste Laser das Fluoreszenzspektrum der Beads registriert, erkennt der zweite Laser die Phycoerythrin-markierten Sekundärantikörper. Die Luminex Technik ist die derzeit sensitivste Methode der anti-HLA Antikörperbestimmung (Schlaf et al., 2014a; Tait, 2016) Neben den durch den CDC identifizierbaren DSA werden auch nicht-komplementfixierende Antikörper sowie sehr niedrige Antikörpertiter detektiert. Allerdings korreliert der Nachweis von anti-HLA-Antikörpern in den Luminex Assays nicht immer mit einem Einfluss auf das Transplantatüberleben. Möglicherweise ist die Konzentration der

durch dieses hochsensitive Verfahren detektierten Donor-spezifischen Antikörper generell zu gering, um schädigende Wirkungen auf das Transplantat auszuüben (Gupta et al., 2008; Süsal et al., 2011). Zusätzlich ergaben sich Nachweise von Antikörpern, die lediglich gegen rekombinante aber nicht gegen native HLA-Moleküle gerichtet sind. Diese als sogenannte *Natural Antibodies* bezeichneten Antikörper stellen ein Ernst zu nehmendes Artefakt der Luminex-basierenden Single Antigen Auflösung dar. Viele der nachgewiesenen Antikörper konnten als initial gegen bakterielle Epitope gerichtet identifiziert werden. Eine Bindung an nicht rekombinant hergestellte d.h. native HLA-Antigene des gleichen Phänotypen ist bei ihnen jedoch nicht gegeben (Schlaf et al., 2014a).

1.3.4 ELISA-basierende Kreuztestverfahren

Für den direkten Nachweis von DSA unter Umgehung der Nachteile des CDC-basierenden Kreuztestes wurden zwei Festphasen-basierende Verfahren entwickelt - das Antibody Monitoring System (AMS) HLA Klasse I/II (GTI/LifeCodes, Waukesha, USA) und der AbCross HLA Klasse I/II ELISA (Biorad, Dreieich, Deutschland). Das Testprinzip und die Testdurchführung wird in Kapitel 3.6 detailliert erläutert. Beide Assays nutzen durch monoklonale Fangantikörper immobilisierte HLA-Moleküle des Spenders zur Detektion von DSA im Empfängerserum. Somit ist auch der Nachweis von Antikörpern möglich, die gegen seltene HLA-Antigene eines Spenders gerichtet sind und über einen virtuellen Kreuztest nicht erfaßt werden können, da das komplette Spektrum seltener Antigene im Spezifizierungsassay grundsätzlich keine Berücksichtigung finden kann (Schlaf et al., 2014a). Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung von Zelllysate des Spenders und die somit erreichte Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit vitaler Spenderlymphozyten (Schlaf et al., 2015). *Gombos et al.* (2013) zeigten, dass der AbCross-ELISA gegenüber dem CDC-basierenden Kreuztest eine höhere Sensitivität aufweist und somit zuverlässigere Aussagen hinsichtlich des Transplantüberlebens möglich macht (Gombos et al., 2013). Die Vorteile dieser Systeme werden ausführlich Gegenstand der Diskussion sein (Kapitel 5).

1.4 Therapeutische Antikörper

1.4.1 Rituximab (MabThera^R)

Rituximab ist ein monoklonaler chimärer Antikörper vom IgG1-Isotyp, der aus murinen Fab-Regionen und einem humanen Fc-Teil besteht. Der Fab-Teil bindet an das CD20-Molekül, das auf der Oberfläche adulter B-Lymphozyten und ihrer Vorläuferzellen exprimiert wird. Dieses Molekül scheint an der Steuerung des Calciumeinstroms in die Zellen beteiligt zu sein. Seine genaue biologische Funktion ist bisher jedoch noch unbekannt (Bubien, 1993; Tedder und Engel, 1994; Cragg et al., 2005). Die Fc-Region des Antikörpers ist für die Auslösung seiner Effektorfunktionen verantwortlich. Zu diesen zählen (i) die über Bindung an den Komplementfaktor C1q vermittelte Aktivierung des Komplementsystems über den sogenannten klassischen Weg (komplementabhängige Zytotoxizität, CDC), (ii) Phagozytose durch Makrophagen nach Bindung an Fc γ -Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche (Opsonisierung) und (iii) Aktivierung Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), ebenfalls nach Bindung an Fc γ -Rezeptoren, die auch auf der NK-Zelloberfläche vorkommen (Antikörperabhängige Zellvermittelte Zytotoxizität, ADCC) (Barnett et al., 2013). Ein weiterer Mechanismus, über den Rituximab seine Wirkung entfaltet, ist die Auslösung des programmierten Zelltodes d.h. die Induktion der Apoptose (Deans et al., 2002). Letztlich kommt es über diese Wege zur Depletion der B-Lymphozyten. Plasmazellen als Endstufe der B-Zell-Differenzierung sind nicht betroffen, da sie kein CD20-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen (Tedder und Engel, 1994; Barnett et al., 2013).

Rituximab wurde im Jahr 1998 zunächst zur Therapie maligner Erkrankungen der B-Zelllinie (Non-Hodgkin Lymphom, Chronisch Lymphatische Leukämie) zugelassen. Später wurde die Zulassung auf die Behandlung verschiedener rheumatischer Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Granulomatose mit Polyangitis, Mikroskopische Polyangitis) ausgeweitet (European Medicines Agency, 2016). Im Rahmen der Transplantationsmedizin wird Rituximab bisher außerhalb der Zulassung zur Behandlung akuter Abstoßungsreaktionen und zur B-Zell-Depletion vor AB0-Blutgruppen-inkompatibler Nierentransplantation genutzt (Barnett et al., 2013; Macklin et al., 2017).

1.4.2 Basiliximab (Simulect^R)

Basiliximab ist wie Rituximab ein monoklonaler chimärer (murin/human) Antikörper vom IgG1-Isotyp. Der murine Fab-Teil von Basiliximab ist gegen die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) gerichtet, der auf aktivierten T- und B-Lymphozyten exprimiert wird (Waldmann et al., 1984; Greene et al., 1986; Brisslert et al., 2006). Durch Bindung von Basiliximab an den Rezeptor wird die Anlagerung von Interleukin 2 (IL2) blockiert und somit die IL2-vermittelte Zellproliferation und -differenzierung gestört (Binder et al., 2007).

Verschiedene Studien zeigten, dass unter Basiliximabtherapie bei guter Verträglichkeit akute Abstoßungsreaktionen seltener auftraten bzw. insgesamt weniger schwerwiegend verliefen (Chapman und Keating, 2003; Ferrer et al., 2010; Webster et al., 2010; Umber et al., 2017). Basiliximab ist in Kombination mit Corticosteroiden und Ciclosporin zur Prophylaxe akuter Abstoßungsreaktionen und zur immunsuppressiven Dauertherapie in Kombination mit Corticosteroiden, Ciclosporin und Azathioprin oder Mycophenolatmofetil zugelassen (European Medicines Agency, 2015).

2 Zielstellung

Antikörper, die gegen HLA-Merkmale des Spenders gerichtet sind, stellen die Hauptursache für hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen dar. Da der Nachweis dieser sogenannten Donor-spezifischen Antikörper als Kontraindikation für die Durchführung einer geplanten Transplantation betrachtet wird, ist die Durchführung eines Kreuztestes vor jeder Transplantation obligatorisch. Als Standardverfahren wurde trotz gravierender Nachteile der vor etwa 50 Jahren entwickelte komplementabhängige Lymphozytotoxizitäts (CDC)-Kreuztest durch Eurotransplant und die Richtlinien der Bundesärztekammer festgelegt. Die Validität dieses Testes ist allerdings in hohem Maße von der Verfügbarkeit vitaler Spenderlymphozyten abhängig. Weiterhin zeigte sich, dass der CDC-basierende Kreuztest keine validen Ergebnisse liefert, wenn die Transplantatempfänger mit therapeutischen Antikörpern konditioniert wurden, was zum einen im Rahmen der AB0-Blutgruppen-inkompatiblen Lebendnierenspende, zum anderen zur Prävention und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach der Organtransplantation der Fall ist. Ursächlich hierfür ist offensichtlich die Fähigkeit dieser Antikörper, das Komplementsystem zu aktivieren. Im Falle ihrer Verwendung führte der CDC-basierende Kreuztest, dessen Funktionsprinzip auf der Aktivierung genau dieser humoralen Komponente des Immunsystems beruht, grundsätzlich nicht zu validen Ergebnissen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Validität eines Festphasen-basierenden Testverfahrens (AMS-ELISA/AbCross-ELISA) für Patienten, die mit therapeutischen Antikörpern vorbehandelt worden waren, zu testen. Konkret sollte die Frage beantwortet werden, ob der AMS- bzw. AbCross-ELISA in diesen Fällen eine geeignete Alternative zu dem in diesem Kontext insuffizienten CDC-basierenden Kreuztest darstellt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Modell/Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35 Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr GmbH (Ochsenhausen, Deutschland)
Mikroplatten-Reader	Elx800 Microplate Reader BioTek Instruments, Inc. (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Mikroskop	Olympus Ck2 Olympus Optical und Co., LTD (Tokyo, Japan)
Pipetten	10 µl, 100µl und 1000 µl Maximalvolumen Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Schüttelinkubator	Vortemp UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH (Planegg, Deutschland)
Vortexer	SA8 Bibby Scientific Limited (Staffordshire, Großbritannien)
Zentrifuge (1,5 - 2,0 ml)	Centrifuge 5415 D Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge (15 - 50 ml)	Rotina 420R Hettich AG (Bäch, Schweiz)

3.2 Lösungen und Puffer

- 1× PBS (Life Technologies Gibco, Carlsbad, USA)

140 mM NaCl
10 mM Na₂HPO₄ 10 H₂O
2,7 mM KCl
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,0

- 10× *Red Cell Lysis Buffer* (RCLB)

155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃

0,1 mM EDTA

- Fluoro-Quench™ (BmT GmbH Labor-Produkte, Osterath, Deutschland)

Rinderhämoglobin

EDTA

Ethidiumbromid

Acridinorange

- RosetteSep™ Cell Separation System (Stemcell Technologies Inc., Köln, Deutschland)

Total Lymphocyte Enrichment Cocktail

T-Cell Enrichment Cocktail

B-Cell Enrichment Cocktail

- Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norwegen)

9,1% (w/v) Amidotrizoesäure

5,7 % (w/v) Polysaccharide

- Kaninchenkomplement, lyophilisiert (BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland)
- anti-HLA Positivkontrollserum für den komplementabhängigen Lymphozytotoxizitätstest/*Complement Dependent Lymphocytotoxicity Assay (CDC)* (BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland)
- anti-HLA Negativkontrollserum für den komplementabhängigen Lymphozytotoxizitätstest/*Complement Dependent Lymphocytotoxicity Assay (CDC)* (BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland)

3.3 AbCross HLA-ELISA zur Darstellung Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper

Vertrieb über: Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich (Deutschland)

Tabelle 3: Komponenten des AbCross-Komplettsystems

Bezeichnung	Inhalt	Abkürzung
HLA Plate	Mikrotestplatte (60 Kavitäten) jeweils zur Hälfte beschichtet mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Klasse-I- (HLA-A, -B, -C) und HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA - DR, -DQ, - DP)	MP
HLA Reagent	anti-IgG-Konjugat (200×Konzentrat) monoklonaler anti-human-IgG-Antikörper mit Peroxidase markiert	CONJ
	Verdünnungspuffer für anti-IgG-Konjugat Konzentrat Konservierungsmittel: 0,025 % Penicillin V; 0,025 % Streptomycinsulfat; 0,2 % Proclin-300	CONJDIL
	Verdünnungspuffer für Proben und Antikörper Konservierungsmittel: 0,01 % Neomycinsulfat; 0,03 % Chloramphenicol	DIL
	Lysepuffer zur Lyse der Lymphozyten	LYS
	Stopplösung Schwefelsäure <1N	STOP
	Substratlösung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB) <0,05 % in H ₂ O	SUB
	Waschpuffer PBS mit <0,05 % Tween20; pH 7,4	WB
HLA Control	Negativkontrolle anti-HLA-Klasse-I-und -II-negative Humansenen	NC
	Positivkontrolle HLA-Klasse I anti- β_2 -Mikroglobulin (mit HRP konjugiert)	PC I
	Positivkontrolle HLA-Klasse II anti-human-MHC-II-Antikörper (mit HRP konjugiert)	PC II

3.4 Sonstige Materialien

Tabelle 4: Sonstige Materialien

Material	Hersteller
Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5 ml - 1,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner Labortechnik (Frickenhausen)
Mikrotest-Platten	Greiner Labortechnik (Frickenhausen)

3.5 Patientenseren

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Patientenseren (n=31) wurden zwischen Februar 2006 und Juli 2014 im HLA-Labor des Universitätsklinikums Halle untersucht. 27 dieser Seren stammten von Patienten, die im Vorfeld einer geplanten AB0-Blutgruppeninkompatiblen Transplantation mit Rituximab behandelt worden waren. Diese Seren wurden jeweils vor der Transplantation untersucht, um präformierte Donor-spezifische Antikörper auszuschließen. Vier Seren stammten von Patienten, bei denen nach der Transplantation Abstoßungsreaktionen auftraten. Diese Patienten hatten als anti-Rejektionstherapie den therapeutischen monoklonalen Antikörper Basiliximab erhalten.

3.6 AbCross HLA-Klasse I/II ELISA

Bis zum Juli 2013 erfolgte die Festphasen-Assay basierende Bestimmung Donor-spezifischer Antikörper unter Verwendung des AMS-ELISA (GTI, Waukesha, USA). Nachdem dieser aus alleinigen kommerziellen Gründen im August 2013 vom Markt genommen worden war, wurde der AbCross-ELISA (BioRad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich, Deutschland) genutzt, der in Anlehnung an den AMS-ELISA modifiziert wurde und hier vorgestellt werden soll.

3.6.1 Testprinzip des HLA-Klasse I/II ELISA

Der AbCross HLA-Klasse I/II ELISA ermöglicht die Bestimmung Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper im Serum eines prospektiven Organempfängers. Hierfür werden die auf

den Spenderlymphozyten exprimierten HLA-Moleküle nach der Lyse von Spenderlymphozyten aus Blut oder Milz an immobilisierte, gegen monomorphe Epitope der HLA-Klasse-I- bzw. HLA-Klasse-II-Moleküle gerichtete Fangantikörper gebunden. Bei der nachfolgenden Inkubation mit dem Empfängerserum binden gegebenenfalls korrespondierende sogenannte Donor-spezifische Antikörper (DSA) an die gebundenen HLA-Moleküle. Die finale Detektion dieser DSA erfolgt durch Zugabe eines Peroxidase-konjugierten monoklonalen anti-human-IgG-Sekundärantikörpers. Im letzten Schritt wird durch Substratzusatz (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung) eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität photometrisch bestimmt wird. Abbildung 4 verdeutlicht das Funktionsprinzip am Beispiel des AbCross HLA-Klasse I ELISA.

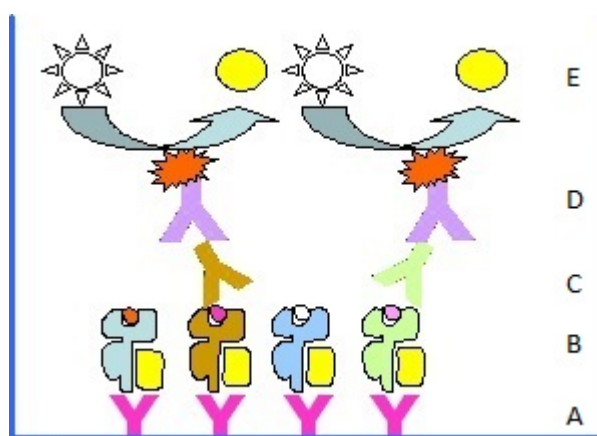


Abbildung 4: **Schematische Darstellung des AbCross HLA Klasse I ELISA.** A) immobilisierte monoklonale anti-HLA-Fangantikörper B) HLA-Antigene aus lysiertem Donormaterial C) Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper des Rezipienten als Detektionsantikörper D) Peroxidase-konjugierter anti-human-IgG-Sekundärantikörper E) Substrat [Quelle: modifiziert nach (Altermann et al., 2006)]

3.6.2 Aufbereitung des Spendermaterials

Die vom Hersteller vorgeschriebene Gewinnung der Spenderlymphozyten aus Blut oder Milz durch Dichtegradientenzentrifugation wurde wie im Folgenden beschrieben modifiziert, so dass erheblich mehr Zellmaterial zur Verfügung steht. Durch selektive Depletion der Erythrozyten können neben den Lymphozyten zusätzlich auch Granulozyten und Monozyten für die Gewinnung der HLA-Moleküle genutzt werden. Die Erythrozytendepletion erfolgt durch Zugabe von 40 ml des hypotonen *Red Cell Lysis Buffer* (RCLB) zu 10 ml Spendervollblut. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 3000 U/min wird der Überstand

verworfen und das erhaltene Pellet in 50 ml RCLB resuspendiert. Unter gleichen Bedingungen wird eine weitere Lyse mit anschließender Zentrifugation durchgeführt, das Pellet in wenig RCLB aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die abschließende Zentrifugation zur Sedimentierung der Leukozyten erfolgt bei 7.000 U/min für 5 Minuten.

Um die HLA-Moleküle aus der Zellmembran zu lösen, wird das Leukozytenpellet mit dem vier- bis fünffachen Volumen an Lysepuffer (LYS) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der proteinhaltige Überstand wird durch anschließende Zentrifugation bei 13.200 U/min für 10 Minuten von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat kann für 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt werden, für eine spätere Verwendung muss es bei Temperaturen < -28°C eingefroren werden. Für die Verwendung im AbCross ELISA wird das gewonnene Lysat im Verhältnis 1:5 mit Verdünnungspuffer (DIL) verdünnt.

3.6.3 Durchführung des AbCross HLA-Klasse I/II ELISA

Alle Inkubationsschritte werden bei 37°C für 30 min durchgeführt. Notwendige Verdünnungen erfolgen, wenn nicht anders angegeben, mit Verdünnungspuffer (DIL). Die im Testsystem enthaltene Mikrottestplatte wird zunächst mit dem lysierten Spendermaterial inkubiert, so dass die HLA-Moleküle an die Fangantikörper binden (Abbildung 4). Mit Ausnahme der Kavitäten für den Leerwert, die mit DIL bestückt werden, werden je 10 µl des 1:5 verdünnten Lysats in jede Kavität pipettiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 1. Inkubationsschritt

1	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	HLA-Klasse-I-Bereich
2	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	
3	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	
4	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	
5	DIL	DIL	
6	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	HLA-Klasse-II-Bereich
7	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	
8	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	
9	Lysat (1:5)	Lysat (1:5)	
10	DIL	DIL	
	A	B	

Nach der Inkubation wird die Platte dreimalig mit Waschpuffer (WB) gewaschen. Hierfür

wird die Platte mit WB geflutet, leicht geschwenkt und nach Abschütten des Puffers auf saugfähigem Material kräftig ausgeklopft. Flüssigkeitsreste in den Kavitäten werden nach der letzten Waschung mit einer Pipette vorsichtig entfernt.

Anschließend werden je 10 µl der Empfängerseren als Doppelansätze in 2 Verdünnungsstufen (1:3 und 1:6) und je 10 µl der Positiv (PC I/PC II)- und Negativkontrollseren (NC) aufgetragen. In die Leerwertkavitäten werden wiederum 10 µl DIL pipettiert (Tabelle 6). Da auf jeder Mikrottestplatte 6 Kavitätenreihen zur Verfügung stehen, ist die parallele Bestimmung von bis zu drei Patientenproben jeweils in Doppelansätzen möglich. Während des nachfolgenden Inkubationsschrittes binden im Empfängerserum enthaltene Donorspezifische Antikörper an die auf der Mikrottestplatte immobilisierten HLA-Moleküle des Spenders (Abbildung 4). Diese repräsentieren damit als Primärantikörper die sogenannten Detektionsantikörper des AbCross-ELISA als Sandwich-Assays.

Tabelle 6: Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 2. Inkubationsschritt

1	PC I (1:6)	PC I (1:6)	HLA-Klasse-I-Bereich
2	NC (1:6)	NC (1:6)	
3	Empfängerserum (1:3)	Empfängerserum (1:3)	
4	Empfängerserum (1:6)	Empfängerserum (1:6)	
5	DIL	DIL	
6	PC II (1:6)	PC II (1:6)	
7	NC (1:6)	NC (1:6)	HLA-Klasse-II-Bereich
8	Empfängerserum (1:3)	Empfängerserum (1:3)	
9	Empfängerserum (1:6)	Empfängerserum (1:6)	
10	DIL	DIL	
	A	B	

Nun wird erneut dreimalig mit WB gewaschen, um nicht gebundene Serumkomponenten wie z.B. nicht gegen HLA-Moleküle gerichtete Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wird der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper (CONJ) mit dem Konjugatverdünner (CONJDIL) im Verhältnis 1:600 verdünnt. In jede Kavität, wiederum mit Ausnahme der Kavitäten für die Leerwerte, werden jeweils 10 µl des verdünnten CONJ pipettiert. In die Kavitäten für die Leerwerte wird in Analogie zu den vorherigen Schritten 10 µl DIL gegeben (Tabelle 7).

Dieser monoklonale Sekundärantikörper ist gegen den konstanten Teil des humanen IgG-Antikörpers gerichtet und erkennt während der folgenden Inkubation die gebundenen Antigen-spezifischen Primärantikörper (Abbildung 4). Nach dem fünfmaligen Waschen der Platte mit WB erfolgt die Zugabe von jeweils 5 µl des Substrates 3,3',5,5'-

Tabelle 7: Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 3. Inkubationsschritt

1	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	HLA-Klasse-I-Bereich
2	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	
3	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	
4	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	
5	DIL	DIL	
6	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	HLA-Klasse-II-Bereich
7	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	
8	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	
9	CONJ (1:600)	CONJ (1:600)	
10	DIL	DIL	
	A	B	

Tetramethylbenzidin (TMB) (Tabelle 8). Dieses wird durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers zum blaugefärbten 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation umgesetzt.

Tabelle 8: Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 4. Inkubationsschritt

1	TMB	TMB	HLA-Klasse-I-Bereich
2	TMB	TMB	
3	TMB	TMB	
4	TMB	TMB	
5	TMB	TMB	
6	TMB	TMB	HLA-Klasse-II-Bereich
7	TMB	TMB	
8	TMB	TMB	
9	TMB	TMB	
10	TMB	TMB	
	A	B	

Die Reaktion wird nach einer fünfminütigen Inkubation unter Lichtabschluss durch Zugabe von 5 µl Schwefelsäure (STOP) je Kavität gestoppt (Tabelle 9).

Endprodukt ist das gelb gefärbte 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diamoniumion (Abbildung 4), dessen Absorption im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen wird. Eine Rezipientenserumprobe wird als positiv angesehen, wenn ihr Extinktionswert mindestens doppelt so hoch ist wie der Extinktionswert, der durch die jeweiligen Negativkontrollseren generiert wird.

Tabelle 9: Pipettierschema des AbCross HLA-ELISA, 5. Inkubationsschritt

1	STOP	STOP	HLA-Klasse-I-Bereich
2	STOP	STOP	
3	STOP	STOP	
4	STOP	STOP	
5	STOP	STOP	
6	STOP	STOP	HLA-Klasse-II-Bereich
7	STOP	STOP	
8	STOP	STOP	
9	STOP	STOP	
10	STOP	STOP	
	A	B	

3.7 Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (*Complement-Dependent-Cytotoxicity Crossmatch, CDC-CM*)

3.7.1 Testprinzip des CDC-CM

Wie in Kapitel 1.3.1 erläutert, gilt der von Terasaki und Patel vor etwa 50 Jahren entwickelte komplementabhängige Lymphozytotoxizitätstest als Standardverfahren zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper (Patel und Terasaki, 1969). Es handelt sich um einen funktionellen Test, mit dessen Hilfe sich komplementaktivierende Donor-spezifische Antikörper im Empfängerserum nachweisen lassen, wenn vitale Spenderlymphozyten zur Verfügung stehen. Bei Zugabe des Empfängerserums zu einer Lymphozyten-Zellsuspension des Spenders binden Donor-spezifische Antikörper des Empfängers an korrespondierende HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche der Spenderlymphozyten (Abbildung 5A). Sind die gebundenen Antikörper komplementfixierend, wird bei Zugabe von Kaninchenkomplement das Komplementsystem über den klassischen Weg aktiviert (Abbildung 5B). Letztlich kommt es nach Bildung des Membranangriffskomplexes (C5b-C9) durch Perforation der Zellmembran (Abbildung 5C) zur Lyse der Lymphozyten. Der Nachweis Donor-spezifischer Antikörper gelingt also nur, wenn diese die Fähigkeit zur Komplementaktivierung besitzen, also den Isotypen IgM, IgG3 oder IgG1 angehören. Nicht komplementaktivierende Donor-spezifische Antikörper werden durch den CDC nicht erfasst.

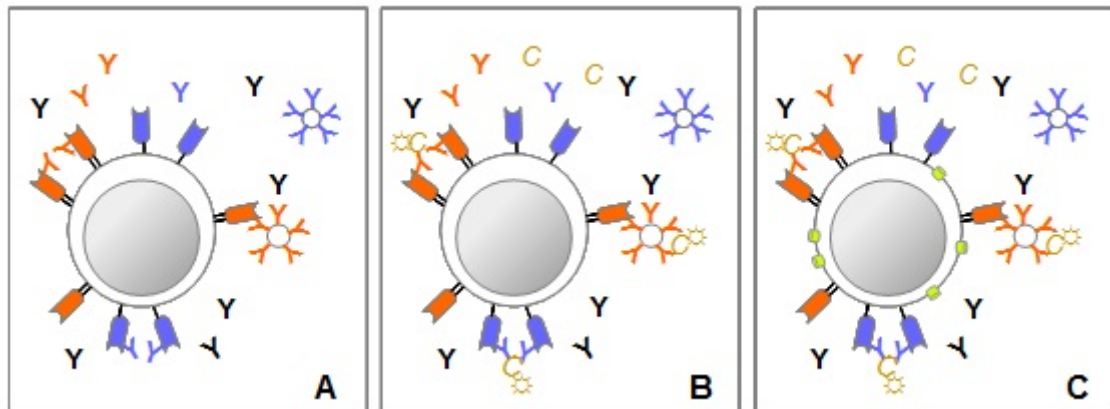


Abbildung 5: **Schematische Darstellung des CDC-CM; Antikörperbindung und Zelllyse.** A) Donor-spezifische monomere IgG- und pentamere IgM-Antikörper binden an korrespondierende HLA-Klasse-I- (blau) und HLA-Klasse-II-Moleküle (orange) auf der Lymphozytenoberfläche. B) Das zugegebene Kaninchenkomplement (C) bindet an die Antigen-Antikörperkomplexe auf der Zellmembran und aktiviert über den klassischen Weg das Komplementsystem. C) Das Endprodukt der Komplementaktivierung ist der Membranangriffskomplex (gelbgrün), der durch Porenbildung in der Zellmembran die Zelllyse herbeiführt. [Quelle: modifiziert nach (Altermann et al., 2006)]

Die Differenzierung letaler und vitaler Zellen erfolgt durch eine Fluoreszenzdoppelfärbung mit Ethidiumbromid als Letalfarbstoff und Acridinorange als Vitalfarbstoff. Beide Substanzen wirken als Nukleinsäure-Interkalatoren. Während Acridinorange über aktiven Transport ausschließlich durch vitale Zellen aufgenommen wird, kann Ethidiumbromid nur in Zellen eindringen, deren Zellmembran geschädigt ist. Vitale, nicht durch Antikörper markierte Zellen werden durch Acridinorange grün angefärbt (Abbildung 6A). Letale, d.h. nach anti-HLA-Antikörper-Bindung lysierte Zellen werden durch Ethidiumbromid rot gefärbt (Abbildung 6B). Die Auswertung erfolgt optisch am Fluoreszenzmikroskop durch Bestimmung des prozentualen Anteils rot angefärbter (letaler) Zellen. Auf die Bewertung des Testergebnisses wird in Kapitel 2.7.3 näher eingegangen. Es sei jedoch bereits an dieser Stelle erwähnt, dass die CDC-CM-Testergebnisse stark von der initialen Zellvitalität abhängen, da bei hohen Anteilen bereits initial letaler Zellen schwach oder moderat positive Reaktionen nicht detektiert werden können.

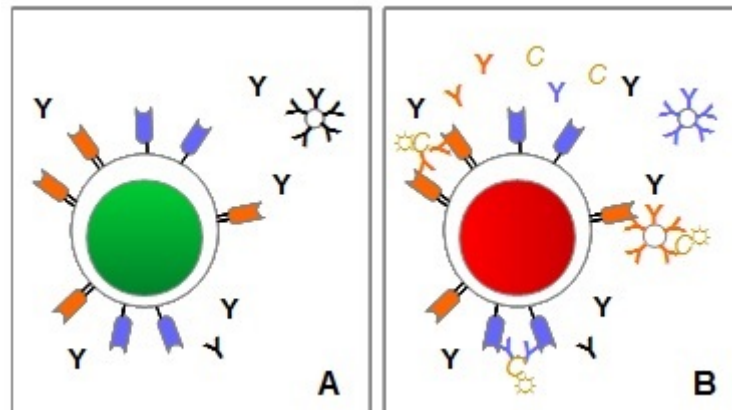


Abbildung 6: **Differenzierung vitaler und letaler Zellen im CDC-CM; Fluoreszenz-doppelfärbung.** A) Zellen, die keine Antigen-Antikörperkomplexe auf ihrer Oberfläche tragen, werden nicht lysiert. Sie nehmen Acridinorange über aktiven Transport auf und werden grün angefärbt. B) In lysierten Zellen wird Ethidiumbromid in die DNA eingelagert, sie werden rot angefärbt. [Quelle: modifiziert nach (Altermann et al., 2006)]

3.7.2 Aufbereitung des Spendermaterials aus Vollblut

Die Separation der Lymphozytenpopulationen erfolgt nach dem Prinzip der negativen Selektion durch Zugabe tetramerer Antikörper, die unerwünschte Zellen mit den Erythrozyten der Spenderblutprobe vernetzen. Während der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation wandern die so entstandenen Aggregate durch den Dichtegradienten, während sich die Lymphozyten aufgrund ihrer geringeren Dichte als Lymphozytenring in der Interphase ansammeln. In Abhängigkeit der verwendeten Antikörper werden so Periphere Blutlymphozyten (PBL), B-Lymphozyten und T-Lymphozyten gewonnen.

Zunächst wird antikoaguliertes Vollblut mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:2 verdünnt und anschließend mit dem sogenannten Enrichment Cocktail (RosetteSep™ Cell Separation System, Vancouver, Kanada), der die quervernetzenden Antikörper enthält, nach dem in Tabelle 10 dargestellten Pipettierschema versetzt.

Tabelle 10: Pipettierschema Dichtegradientenzentrifugation

Ansatz für	Volumen Citratblut:PBS (1:2)	RosetteSep™ Cell Preparation System-Komponente je 40 µl
PBL	1 ml	Total Lymphocyte Enrichment Cocktail
T-Lymphozyten	1 ml	T Cell Enrichment Cocktail
B-Lymphozyten	2 ml	B Cell Enrichment Cocktail

Die Ansätze werden nun mittels Vortexapparatur gründlich durchmischt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Nach Zugabe eines Milliliters PBS wird jeder Ansatz auf einen LymphoprepTM-Gradienten (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) geschichtet. Während der nun folgenden zwanzigminütigen Zentrifugation bei 3.200 U/min wandern die Antikörper-vernetzten Komplexe durch den Dichtegradienten, während sich die Lymphozyten an der Oberfläche des Gradienten ansammeln. Der im Gradientenmedium enthaltene hochpolymere Zucker führt zu einer zusätzlichen Agglutination der Erythrozyten und wirkt somit sedimentationsbeschleunigend. Der Lymphozytenring, die sogenannte Interphase, wird abgenommen, in ein Glasröhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Zur Sedimentation der Lymphozyten folgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 900 U/min. Der Überstand wird verworfen und die Zellzahl mit PBS auf ca. 2.000 Zellen/ μ l eingestellt.

3.7.3 Durchführung des CDC-CM

Für jede der gewonnenen Zellpopulationen wird in die Kavitäten einer Mikrottestplatte je 1 μ l des Empfängerserums, des Positivkontroll- und des Negativkontrollserums pipettiert, wobei jeder Ansatz doppelt bestimmt wird (Tabelle 11).

Tabelle 11: Pipettierschema CDC-CM, 1. Inkubationsschritt

Negativkontrollserum	Positivkontrollserum	Empfängerserum	PBL
Negativkontrollserum	Positivkontrollserum	Empfängerserum	
Negativkontrollserum	Positivkontrollserum	Empfängerserum	T-Lymphozyten
Negativkontrollserum	Positivkontrollserum	Empfängerserum	
Negativkontrollserum	Positivkontrollserum	Empfängerserum	B-Lymphozyten
Negativkontrollserum	Positivkontrollserum	Empfängerserum	

Nach Zugabe von 1 μ l der Spenderlymphozyten in jede vorbereitete Kavität wird die Platte für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Pipettierschema CDC-CM, 2. Inkubationsschritt

Spender-PBL	Spender-PBL	Spender-PBL	PBL
Spender-PBL	Spender-PBL	Spender-PBL	
Spender-T-Lymphozyten	Spender-T-Lymphozyten	Spender-T-Lymphozyten	T-Lymphozyten
Spender-T-Lymphozyten	Spender-T-Lymphozyten	Spender-T-Lymphozyten	
Spender-B-Lymphozyten	Spender-B-Lymphozyten	Spender-B-Lymphozyten	B-Lymphozyten
Spender-B-Lymphozyten	Spender-B-Lymphozyten	Spender-B-Lymphozyten	

Anschließend erfolgt die Zugabe von je 5 µl Kaninchenkomplement (Tabelle 13), dessen Aktivierungskaskade während der nachfolgenden Inkubation (60 Minuten, RT) bei Vorhandensein komplementfixierender anti-HLA-Antikörper initiiert wird, so dass die gebundenen Lymphozyten lysiert werden.

Tabelle 13: Pipettierschema CDC-CM, 3. Inkubationsschritt

Komplement	Komplement	Komplement	PBL
Komplement	Komplement	Komplement	
Komplement	Komplement	Komplement	T-Lymphozyten
Komplement	Komplement	Komplement	
Komplement	Komplement	Komplement	B-Lymphozyten
Komplement	Komplement	Komplement	

Im Anschluss werden jeweils 2 µl Fluoro-Quench™ zugegeben (Tabelle 14).

Tabelle 14: Pipettierschema CDC-CM, 4. Inkubationsschritt

Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	PBL
Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	
Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	T-Lymphozyten
Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	
Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	B-Lymphozyten
Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	Fluoro-Quench™	

Die in der Fluoro-Quench-Lösung enthaltene EDTA bewirkt durch die Komplexbildung mit Ca²⁺-Ionen eine Inaktivierung initialer calciumabhängiger Serinproteasen und folglich den Stopp der komplementabhängigen Zelllyse. Während der anschließenden fünfminütigen Inkubation (RT) kommt es wie unter 3.7.1 beschrieben durch die ebenfalls in der Lösung enthaltenen Farbstoffe in Abhängigkeit von der Zellvitalität zur Färbung der Zellen.

Anschließend wird der prozentuale Anteil der roten d.h. letalen Zellen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die Angabe der Reaktionsstärke erfolgt über die Zuordnung zu einem Reaktionsscore des National Institutes of Health (NIH)(USA) nach folgender Tabelle:

Tabelle 15: Score-System zur Auswertung des CDC-CM (NIH)

Anteil letaler (roter) Lymphozyten pro Kavität in %	Bewertung	NIH-Score
0-10	negativ	1
10-20	fraglich positiv	2
20-40	schwach positiv	4
40-80	positiv	6
80-100	stark positiv	8
nicht ablesbar		0

3.8 Virtueller Kreuztest zur theoretischen Bestimmung Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper

Für den sogenannten virtuellen Kreuztest werden die anti-HLA-Antikörperspezifitäten des Empfängers mit den HLA-Merkmalen des Empfängers verglichen. Die resultierenden Daten dieser Untersuchungen wurden im Rahmen des vierteljährlich stattfindenden sogenannten Routinescreenings im HLA-Labor am Universitätsklinikum Halle ermittelt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.8.1 Suchtest zur Detektion von anti-HLA-Antikörpern (Antikörperscreening)

Alle Patientenserumproben wurden zunächst auf anti-HLA-Antikörper untersucht. Die Detektion der anti-HLA-Antikörper erfolgte mit Hilfe ELISA-basierender Verfahren. Diese waren der QuikScreen ELISA (GTI, Waukesha, USA) zur Detektion von anti-HLA-Klasse-I-Antikörpern und der B-Screen ELISA (GTI, Waukesha, USA) zur Detektion von anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern (Kapitel 1.3.3).

3.8.2 Spezifizierung von anti-HLA-Antikörpern

Alle Seren, die im sogenannten Antikörperscreening positiv auf anti-HLA-Antikörper getestet worden waren, wurden in einem zweiten Schritt auf die entsprechenden Antikörperspezifitäten untersucht. Bis zum Jahr 2011 fand zu diesem Zweck der sogenannte

DynaChip-Assay (Invitrogen/Dynal, Bromborough, Großbritannien) Verwendung, bevor er aus kommerziellen Gründen vom Markt genommen wurde. Derzeit erfolgt die Antikörperspezifisierung mittels Luminex-Technologie (Kapitel 1.3.3).

Mittels beider Verfahren wurde auch der Grad der anti-HLA-Immunsierung der Patienten, der als Prozent Panel-reaktiver Antikörper (% PRA) angegeben wird, bestimmt. Die Bezeichnung PRA geht auf die anfängliche Bestimmung des Wertes mittels komplementabhängigem Lymphozytotoxizitätstest unter Verwendung eines PBL-Panels oder eines Zellpanels, das verschiedenen Patienten mit dem Krankheitsbild „Chronisch Lymphatische Leukämie“ (CLL-Panel) entstammt, als antigentragende Zellen zurück. Diese Panels umfassen sowohl die HLA-Phänotypen als auch deren Frequenzen innerhalb der Patientenpopulation. Der PRA-Wert entspricht somit der individuellen Wahrscheinlichkeit eines Patienten auf ein positives Kreuztestergebnis und ermöglicht so die Identifizierung hochimmunsierter Patienten, die hinsichtlich ihrer Kreuztestergebnisse sorgfältig überwacht werden müssen (Schlaf et al., 2014a). Ein niedriger PRA-Wert schließt Donor-spezifische Antikörper jedoch nicht aus. Diese können auch bei Patienten mit einem niedrigen PRA-Wert gefunden werden, da sie gegebenenfalls nur durch eine Antikörperspezifität hervorgerufen werden. Auch seltene Phänotypen der Spender, die im Zellpanel nicht enthalten sind, können zu einem positiven *de facto* Kreuztest führen, wenn der prospektive Empfänger Antikörper gegen genau diese seltenen Antigene aufweist.

3.8.3 Serologische Typisierung von HLA-Merkmalen (Phänotypisierung)

Die serologische Typisierung (Phänotypisierung) von HLA-Merkmalen erfolgte über das Verfahren des Komplementabhängigen Lymphozytotoxizitätstests (CDC). Das Testprinzip entspricht somit grundsätzlich dem in Kapitel 3.7.1 beschriebenen komplementabhängigen Lymphozytotoxizitätskreuztest. Allerdings werden für die HLA-Typisierung anstelle des Empfängerserums HLA-spezifische Antiseren bekannter Spezifitäten verwendet. Diese sind in den 72 Kavitäten einer Mikrottestplatte der Firma BAG Health Care GmbH (Lich, Deutschland) enthalten. Die Reaktionsstärken (Tabelle 15) werden im mitgelieferten Reaktionsprotokoll (Abbildung 7) notiert und somit die Bestimmung der HLA-Phänotypen ermöglicht. Für die Phänotypisierung mittels CDC wurden als Zielzellen Periphere Blutlymphozyten der zu typisierenden Person verwendet. Da jedoch ruhende T-Lymphozyten, die etwa 80 % der PBL darstellen keine HLA-Klasse-II-Merkmale exprimie-

ren und Typisierungsplatten für HLA-Klasse-II-Merkmale nicht mehr kommerziell erhältlich sind, werden nur die HLA-Merkmale der Klasse I mit dieser Methode bestimmt.

HISTO TRAY ABC 144

Ergebnisprotokoll / Worksheet

Mikrotiterkammern (72) mit vorgetroffenen HLA-ABC-Antisera und Kontrollen (human oder monoklonal) zur Typisierung eines Probanden

Microtiter tray (72) with prequalified HLA-ABC anti sera and controls (human or monoclonal) for typing one specimen

Proben Nr./Sample I.D.: _____

Testdatum/fest. Date: _____

Name: _____

Vorname/First Name: _____

Geb.-Datum/Birthdate: _____

REF 7005

01610020

2017-04

s. 20C

Kernreagenzienkomplement:

Reagenzienkomplement:

01610041

2017-07




	A	B	Cw	Cw	Bw	Bw
1A	111 H 0150	pos. Control	7A	106 H 0080	A32	
1B	112 H 0250*	neg. Control	7B	104 H 0310	A32+25	
1C	113 H 0330	B58	7C	105 H 0330	A32+35	
1D	114 H 0330	B58	7D	103 H 0580*	A32+14+13+11+36	
1E	113 H 0330*	B58+wk. 39	7E	210 H 0580*	A32+94	
1F	112 H 0330	B 39	7F	110 H 0070	A2	
2F	109 H 0770	B 37 e18	8F	106 H 0410	A33+34	
2E	109 H 0510	B 37	8E	105 P 0430	A2+69	
2D	110 H 0330	B7197+58	8D	106 H 0390	A3	
2C	112 H 0160	B7197+58	8C	104 H 0060*	A46	
3C	112 H 0160	B7197+58+163	8B	106 H 0060*	A46	
3B	107 H 0020*	B7197+58+163	8A	106 H 0060*	A46	
3A	106 H 0150	B 8	8A	106 H 0060*	A46	
4A	106 H 0150	B 8	8A	106 H 0060*	A46	
4B	107 H 0150	B 8	8B	106 H 0060*	A46	
4C	108 H 0290	B69+51+53+63	8C	106 H 0060*	A46	
4D	108 H 0290	B 49 (52)	8D	106 H 0060*	A46	
4E	106 H 0090	B2149+50	8E	106 H 0060*	A46	
4F	114 H 0090*	B2149+50	8F	106 H 0060*	A46	
5F	110 H 0350*	B 50 wk.	9F	106 H 0060*	A46	
5E	110 H 0350*	B 50 wk.	9E	106 H 0060*	A46	
5D	110 H 0350*	B 50 wk.	9D	106 H 0060*	A46	
5C	106 H 0090	B 49 (52)	9C	106 H 0060*	A46	
5B	106 H 0090	B 49 (52)	9B	106 H 0060*	A46	
5A	106 H 0090	B 49 (52)	9A	106 H 0060*	A46	
6A	114 H 0170*	A 23	10A	114 H 0170*	A 23	
6B	403 H 1040	A9(23+24)+80(wk)	10B	403 H 1040	A 24+2403	
6C	111 H 0190	A 24+2403	10C	208 H 0160	A 24+2403	
6D	208 H 0160	A 24+2403	10D	110 H 0210	A 25	
6E	110 H 0210	A 25	10E	110 H 0260	A 25	
6F	110 H 0260	A 25	10F	112 P 0200	A10(25+26+34+66)+43	
7F	112 P 0200	A10(25+26+34+66)+43	10G	112 P 0200	A 26+66+wk25	
7E	112 P 0200	A 26+66+wk25	10H	104 P 1340	A 26+wk 66	
7D	104 P 1340	A 26+wk 66	10I	112 P 0220	A11	
7C	112 P 0220	A11	10J	112 P 0220	A11	
7B	112 P 0220	A11	10K	105 H 0960	B12(44+45)	
7A	105 H 0960	B12(44+45)	10L	105 H 0960	B12(44+45)	
8A	109 P 0410	A28(68+69)	11A	109 H 0520*	B 45 (50)	
8B	109 P 0410	A28(68+69)	11B	105 H 0320	B13	
8C	404 H 0870	A28(68+69)	11C	105 H 0020	B13	
8D	404 H 0870	A28(68+69)	11D	108 H 0320	B 65+8+59	
8E	112 H 0230	A29	11E	113 H 0080	B14(64+65)	
8F	109 H 0590	A29	11F	113 H 0080	B14(64+65)	
8G	109 H 0590	A29	11G	113 H 0080	B14(64+65)	
8H	111 H 0060	A30 (unspec)	11H	113 H 0080	B14(64+65)	
8I	111 H 0060	A30+813	11I	113 H 0080	B14(64+65)	
8J	404 H 0060	A30+13(83)	11J	405 P 0070	B15(6+8+78+77)	
8K	107 H 0960*	A30+131	11K	113 H 0070*	B15(6+78+77)+61+6	
8L	107 H 0960*	A30+131	11L	115 H 0050*	B 63	
8M	109 H 0340	A31+wk 30	11M	115 H 0050*	B 63	


Abbildung 7: Reaktionsprotokoll für die serologische Typisierung
 Reaktionsprotokoll der Firma BAG Health Care GmbH (Lich, Deutschland) für die serologische Typisierung (Phänotypisierung) der HLA-Klasse-I-Merkmale

3.8.4 Niedrig auflösende Genotypisierung von HLA-Allelen der Klasse I und II

Zusätzlich zur Phänotypisierung der HLA-Klasse-I-Merkmale wurde eine Genotypisierung der HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Allele durchgeführt. Hierfür wurde zur Genotypisierung der HLA-Klasse-I-Allele das HLA-A*/B*/C* Cycloerplate System der Firma Protrans GmbH (Hockenheim, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung des HLA-Klasse-II-Genotyps wurde das HLA-Ready Gene DRDQ-System der Firma Inno-Train Diagnostik GmbH (Kronberg, Deutschland) genutzt.

Das Prinzip der HLA-Genotypisierung beruht auf der Herstellung von Allel-spezifischen Amplifikaten der entsprechenden DNA-Sequenzen über das Verfahren der *Sequence-specific-Primer*-Polymerasekettenreaktion (SSP-PCR) mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate. Die Bestimmung des HLA-Genotyps erfolgt dabei unter Berücksichtigung der jeweiligen Reaktionsprotokolle der Firmen (Abbildung 8; Abbildung 9).

HLA-Ready Gene DRDQ    G957105 Allele list based on release 3.19.0 (Jan. 2015) of the IMGT/HLA Sequence Database

Auswerteschema / Worksheet  2017-09

Name / Name: _____ Vorname / First name: _____ Geburtsdatum / Date of birth: _____

Proben-Nr. / Sample I.D.: _____ Herkunft / Origin: _____ Diagnose / Diagnosis: _____

Test-Durchführung / Performance: _____ Datum / Date: _____ Unterschrift / Signature: _____

Test-Überprüfung / Review: _____ Datum / Date: _____ Unterschrift / Signature: _____

Bemerkungen / Comments: _____

Technik / Result:

	H	G	F	E	D	C	B	A
DRB1*	1 5 9	01:01:02:04... 430 bp IC 189 bp	01:43:00N+2 430 bp IC 195 bp	15... 430 bp IC 210 bp	15:00L, 15:00H 15... 430 bp IC 215, 205, 202 bp	02... / ... 430 bp IC 202 bp	L: 04:05... / 12:05... / 14:01,07...04... 430 bp IC 202, 194 bp	03:02:06... / ... 430 bp IC 210 bp
DRB3*	2 6 10	... / 04... / ... 430 bp IC 205 bp	08... / ... / 14:04... 430 bp IC 223, 219 bp	L: 09... 430 bp IC 202, 195 bp	19... 430 bp IC 205 bp	... / 11... 430 bp IC 185, 180, 132 bp	L: 14:01... 430 bp IC 202, 194 bp	11... / 12... / 14:03... 430 bp IC 210 bp
DRB4*	3 7 11	08... / 11... / 12... 430 bp IC 215, 205, 196 bp	08... / ... / 13... / 14:02... 430 bp IC 199 bp	14:02:06... / ... 430 bp IC 150, 149 bp	L: ... / 14:03... 430 bp IC 195, 192 bp	DRB3* 430 bp IC 220 bp	L: DRB4* / 02:01H / 05:01H 430 bp IC 202, 194 bp	L: DRB5* 430 bp IC 202, 194 bp
DQB1*	4 8 12	05... 430 bp IC 210 bp	02... 430 bp IC 210 bp	02... 430 bp IC 185 bp	03:02:07... / 06:29... 430 bp IC 149, 132 bp	03:01:04,09... 430 bp IC 205 bp	03:02:03... / 06:139... 430 bp IC 162 bp	04... 430 bp IC 202 bp

* einige seltene Allele ausgeschlossen (vollständige Liste Interpretation-Spezifitätstabelle) // some rare alleles excluded (complete list: Interpretation-Specificity Table)
Feldinhalts: Allel (gruppen) mit Häufigkeiten von mind. a, n=1 // Bold letters: parts of allele groups or alleles with min. frequency of a, n=1 (Ref.: www.allele-frequencies.net)
IC: PCR-Produkte der internen Kontrollprimersätze // PCR products of the internal control primer mixes

Mix # 7 (multiplex): 175 bp: DRB1*03:10, *04:05... *13:03... *14:01,07...; 85 bp: DRB1*02:01,04... *11:59, *13:27...
 Mix # 10 (multiplex): 240 bp: DRB1*07:01... 150 bp: DRB1*11:16... *13:01... *14:24
 Mix # 12 (multiplex): 193 bp: DRB1*09:01-02... *13:27... DRB5*01:13; 70 bp: DRB1*04:15... *02:01... *11:01,01... *12:04... *18:18...
 Mix # 18 (multiplex): 235 bp: DRB1*14:01; 150 bp: DRB1*08:02, *12:01-13...
 Mix # 21 (multiplex): 228 bp: DRB1*08:20, *11:23... *13:13... *14:03,12,27...; 150 bp: DRB1*08:03... *14:15...
 Mix # 23 (multiplex): 218 bp: DRB4*01:01... *02:01N, *03:01N; 130 bp: DRB4*01:03-01:02N
 Mix # 24 (multiplex): 265 bp: DRB5*01... *02... (DRB1*09:07); 180 bp: DRB5*01:08N

Photo

Inno-train Diagnostik GmbH - Niederhüchelsäcker Straße 6a - D-64716 Kronberg/Taunus - Germany
 Tel.: 0649-(0)5673/6473-30 - Fax: 0649-(0)5673/6473-50 - Email: info@inno-train.de - www.inno-train.de

QMS 03_15

Abbildung 9: Reaktionsprotokoll für die Auswertung der HLA-Klasse-II Genotypisierung
 Reaktionsprotokoll des HLA-Ready Gene DRDQ-Systems der Firma Inno-Train Diagnostik GmbH (Kronberg, Deutschland) für die Zuordnung der Amplifikate zu den HLA-Klasse-II-Allelen der Genorte DRB1*, DRB3*, DRB4*, DRB5* und DQB1*

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Seren Rituximab-behandelter Patienten auf Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper in Vorbereitung auf eine AB0-Blutgruppen-inkompatible Nierentransplantation

In der vorliegenden Arbeit wurden die Seren von 27 Patienten untersucht, die im Vorfeld einer geplanten AB0-Blutgruppen-inkompatiblen Lebendnierenspende mit dem monoklonalen anti-CD20-Antikörper Rituximab behandelt, d.h. immunologisch konditioniert worden waren. Die Ergebnisse beider Kreuztestverfahren sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Ergebnisse von komplementabhängigem Lymphozytotoxizitäts- (CDC-CM) und ELISA-Kreuztest (ELISA-CM) für Patienten der Rituximab-Gruppe

Patient	CDC-CM (NIH-Score)			ELISA-CM		%PRA
	PBL	T-Zellen	B-Zellen	HLA I	HLA II	
1	1/2	2	6/8	neg.	neg.	0
2	1/2	2	6/8	neg.	neg.	0
3	2/4	1/2	8	neg.	neg.	0
4	2	1/2	6/8	neg.	neg.	0
5	2/4	2	8	neg.	neg.	0
6	2	1/2	8	neg.	neg.	0
7	2/4	1/2	8	neg.	neg.	0
8	2	1/2	6/8	neg.	neg.	0
9	2	1/2	8	neg.	neg.	0
10	2/4	2	8	neg.	neg.	18*
11	2	1/2	6/8	neg.	neg.	0
12	2	1/2	6	neg.	neg.	0
13	2/4	2	8	neg.	neg.	0
14	2	1/2	6/8	neg.	neg.	0
15	2	1/2	8	neg.	neg.	4*
16	2	1	8	neg.	neg.	0
17	2	1/2	6/8	neg.	neg.	0
18	2	1	8	neg.	neg.	0

Tabelle 16 Fortsetzung

Patient	CDC-CM (NIH-Score)			ELISA-CM		%PRA
	PBL	T-Zellen	B-Zellen	HLA I	HLA II	
19	2/4	1/2	8	neg.	neg.	12*
20	2/4	2	6/8	neg.	neg.	0
21	2	1/2	8	neg.	neg.	0
22	2/4	2	8	neg.	neg.	0
23	2/4	1/2	6/8	neg.	neg.	0
24	2	1	6/8	neg.	neg.	0
25	2/4	2	8	neg.	neg.	0
26	2	1/2	8	neg.	neg.	0
27	2	1/2	6/8	neg.	neg.	0

NIH=National Institute of Health (Washington, USA), PRA=Panel-reaktive Antikörper, PBL=Periphere Blutlymphozyten

*=Prospektive Nierentransplantatempfänger, bei denen im Antikörper-Suchtest anti-HLA-Antikörper nachweisbar und spezifizierbar waren

Wie aus Tabelle 16 ersichtlich ist, zeigten alle Patientenserum dieser Gruppe im komplementabhängigen Lymphozytotoxizitäts (CDC)-Kreuztest der B-Zell-Fraktion positive (NIH-Score 6) bis stark positive (NIH-Score 8) Reaktionen. In der Fraktion der Peripheren Blutlymphozyten (PBL) fanden sich schwach bis moderat positive Reaktionen mit Werten zwischen 2 und 2/4. Auch in der T-Zell-Fraktion zeigten sich schwach bis überwiegend sehr schwach positive Reaktionen mit Werten von 1/2 und 2. Nur drei Patientenserum zeigten im CDC-basierenden T-Zell Kreuztest ein negatives Ergebnis. In absolutem Gegensatz zu diesen Ergebnissen fiel der ELISA-basierende Kreuztest dagegen für alle Patienten und beide HLA-Klassen negativ aus. In Übereinstimmung mit den komplett negativen Resultaten des ELISA-basierenden Kreuztests wurden im anti-HLA-Antikörpersuchtest (Ak-Screening) in 24 der 27 untersuchten Seren grundsätzlich keinerlei anti-HLA-Antikörper nachgewiesen (0% Panel-reaktive Antikörper/PRA). Nur drei Patienten (Tabelle 16, Patient 10, 15, 19) zeigten einen relativ schwachen Immunisierungsgrad gegen HLA-Merkmale, jeweils repräsentiert durch PRA-Werte von 4%, 12% und 18%. Für diese Patienten erfolgte als Referenzmethode zusätzlich der Abgleich der nachgewiesenen anti-HLA-Antikörperspezifitäten der Empfänger mit den HLA-Merkmalen des Spenders, d.h. die Durchführung des sogenannten virtuellen Kreuztests (Tabelle 17).

Tabelle 17: Virtuelle Kreuztestergebnisse der immunisierten Patienten aus der Rituximab-Gruppe

Patient	nachgewiesene anti-HLA-Ak des Patienten	relevante HLA-Merkmale des Spenders	DSA
10	A9 (-23, -24); B17 (-57, -58)	A2, 68; B7, 39	negativ
15	B14 (-64, -65)	B8, 44	negativ
19	A11; B40 (-60, -61)	A3, 24; B8, 47	negativ

Alle drei Patienten haben keine Antikörper gegen die HLA-Merkmale des jeweiligen Spenders gebildet, so dass aus dem virtuellen Kreuztest keine Donor-spezifischen Antikörper (DSA) ableitbar sind. Die sogenannte Hauptgruppenmerkmale (*broad antigens*) sind vor den Klammern aufgeführt, während die zugehörigen Nebengruppenmerkmale (*split antigens*) in Klammern angegeben werden.

Die virtuellen Kreuztestergebnisse ergaben eindeutig, dass die nachgewiesenen anti-HLA-Antikörper-Spezifitäten der Empfänger nicht gegen die HLA-Merkmale der jeweiligen prospektiven Spender gerichtet waren. Es ist zu folgern, dass in Übereinstimmung mit dem negativen Testergebnis des jeweils korrespondierenden ELISA-Kreuztestes kein Empfänger Donor-spezifische Antikörper gebildet hat. Somit liegt nahe, dass die Ergebnisse des CDC-Kreuztestes vielmehr durch den therapeutischen Antikörper Rituximab beeinflusst worden sind. Dieser therapeutische Antikörper aktiviert durch Bindung an das CD20-Molekül auf der B-Zelloberfläche das zugegebene Kaninchenkomplement und leitet damit die Lyse der B-Zellen ein. Dieser Mechanismus erklärt die stark positiven Reaktionswerte des CDC-Kreuztestes der B-Zellfraktion und ist auch verantwortlich für die positiven Reaktionsergebnisse in der PBL-Fraktion. Aufgrund des individuell unterschiedlichen B-Zell-Anteils (7-15% der PBL) fielen diese jedoch, auch wenn durch unterschiedliche Intensitäten gekennzeichnet, insgesamt schwächer aus (Score 1/2 bis 2/4). Bereits an dieser Stelle sei auch auf die schwach positiven Reaktionsergebnisse in der T-Zell-Fraktion hingewiesen, da diese vor dem Hintergrund der Beeinflussung des CDC-Kreuztestes durch Rituximab zunächst nicht plausibel erscheinen, da Rituximab anti-CD20-Antikörper *per definitionem* nur an B-Zellen bindet. Die möglichen Ursachen werden ausführlich Gegenstand der Diskussion sein (Kapitel 5.1).

4.2 Untersuchung der Seren Basiliximab-behandelter Patienten auf Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper zur Analyse akuter Abstoßungsreaktionen

Zusätzlich wurden die Seren von vier Patienten untersucht, die im Rahmen der immunsuppressiven Therapie nach einer Lebendnierenspende mit dem monoklonalen anti-CD25-Antikörper Basiliximab behandelt worden waren, nachdem bei ihnen eine akute Transplantatabstoßungsreaktion aufgetreten war. Die für diese Gruppe vorliegende geringe Patientenanzahl ergibt sich aus der Tatsache, dass für die Durchführung des CDC-Kreuztestes vitale Donor-Zellen benötigt werden, so dass in diese Gruppe nur Lebendnierenspenden und keine *post mortem* Spenden eingeschlossen werden konnte. Ausschließlich im Falle der Lebendnierenspenden waren vitale Spenderlymphozyten auch nach einer Transplantation verfügbar.

Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse von komplementabhängigem Lymphozytotoxizitäts- (CDC-CM) und ELISA-Kreuztest (ELISA-CM) für Patienten der Basiliximab-Gruppe

Patient	CDC-CM (NIH-Score)			ELISA-CM		%PRA
	PBL	T-Zellen	B-Zellen	HLA I	HLA II	
1	2/4	2/4	4	neg.	neg.	0
2	2/4	2/4	4/6	neg.	neg.	86
3	4	4	6	neg.	pos.	12
4	6	4	6/8	neg.	pos.	20

NIH=National Institute of Health (Washington, USA), PRA=Panel-reaktive Antikörper, PBL=Periphere Blutlymphozyten

In der Basiliximab-Gruppe waren im Serum von drei der vier untersuchten Patienten im Antikörperscreening anti-HLA-Antikörper nachweisbar (Tabelle 18, Patienten 2, 3 und 4). Grundsätzlich war unter Berücksichtigung der Panelreaktivität das Vorhandensein Donorspezifischer Antikörper bei diesen drei Patienten also durchaus möglich.

Die Patienten 3 und 4 zeigten einen relativ niedrigen Immunisierungsgrad, dargelegt durch niedrige PRA-Werte von 12 und 20%. Für diese Patienten zeigte der CDC-Kreuztest moderat bis stark positive Reaktionen in allen Zellpopulationen mit Werten von 4 bis 6, was den Nachweis von Donor-spezifischen Antikörpern gegen beide HLA-Klassen impliziert. Im Gegensatz dazu wurden im ELISA-Kreuztest jeweils nur Antikörper gegen HLA-Klasse-II-Moleküle gefunden. Zur Aufklärung dieser widersprüchlich erscheinenden Testergebnisse wurde der zusätzliche Abgleich mittels virtuellem Kreuztest durchgeführt (Ta-

belle 19). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ELISA-Kreuztestes fanden sich virtuell bei beiden Patienten ausschließlich Donor-spezifische Antikörper gegen die HLA-Klasse-II-Merkmale des jeweiligen Spenders, nicht jedoch gegen Merkmale der HLA-Klasse I. Die Ergebnisse des CDC-Kreuztestes lassen sich folglich als falsch positiv klassifizieren, da dieser für alle untersuchten Zellpopulationen (PBL, T-Zellen, B-Zellen), d.h. für beide HLA-Klassen positive Reaktionen gezeigt hatte.

Tabelle 19: Ergebnisse des virtuellen Kreuztestes der Spender-Empfängerkombinationen aus der Basiliximab-Gruppe

Patient	nachgewiesene anti-HLA-Ak des Patienten	relevante HLA-Merkmale des Spenders	DSA
3	DR13; DQ7	DR11, 13; DR 52; DQ3(7)	positiv
4	DR17; DQ2	DR3(17); DR52; DQ2	positiv

Dargestellt sind die anti-HLA-Antikörper der Empfänger und die korrespondierenden HLA-Merkmale der jeweiligen Spender. Beide Patienten haben ausschließlich Antikörper gegen HLA-Klasse-II-Merkmale gebildet. Fettgedruckt dargestellt sind die Antikörper, die virtuell eindeutig als Donor-spezifisch klassifizierbar sind sowie die entsprechenden HLA-Merkmale des Spenders.

Die sogenannte Hauptgruppenmerkmale (*broad antigens*) sind vor den Klammern aufgeführt, während die zugehörigen Nebengruppenmerkmale (*split antigens*) in Klammern angegeben werden.

Im Gegensatz zu den Patienten 3 und 4 musste Patient 2 mit einem PRA-Wert von 86% als hochimmunisiert angesehen werden. Auch hier zeigte der CDC-Kreuztest mit Werten von bis zu 6 eindeutig positive Reaktionen für alle Zellpopulationen. Im ELISA-Kreuztest wurden jedoch keinerlei Donor-spezifische Antikörper nachgewiesen. Aufgrund des hohen Immunisierungsgrades musste zunächst angenommen werden, dass dieser Patient mit Ausnahme seiner eigenen HLA-Merkmale Antikörper gegen nahezu alle HLA-Phänotypen gebildet hatte. Die Durchführung eines virtuellen Kreuztests erschien daher aufgrund der vorauszusehenden Bandbreite von spezifizierbaren Antikörpern als nicht sinnvoll. Donor-spezifische Antikörper konnten allerdings dennoch virtuell ausgeschlossen werden, da der Vergleich der HLA-Merkmale des Empfängers mit denen des Spenders eine komplette Übereinstimmung ergab (Tabelle 20). Diesem Phänomen lag eine Lebendnierenspende zwischen HLA-identischen Geschwistern zugrunde. Folglich lieferte der ELISA-Kreuztest auch in diesem Fall eines hochimmunisierten Patienten ein korrektes Ergebnis, während der CDC-basierende Kreuztest erneut zu falsch positiven Resultaten führte.

Tabelle 20: Darstellung der HLA-Merkmale des hochimmunisierten Patienten 2 aus der Basiliximab-Gruppe und seines Lebendnierenspenders

Patient	% PRA	HLA-Typisierung Spender	HLA-Typisierung Empfänger
2	86	A29, 32; B14, 44; Cw5, 8 DR 4, 7, 53; DQ 2, 3(7)	A29, 32; B14, 44; Cw5, 8 DR 4, 7, 53; DQ 2, 3(7)

Spender und Empfänger zur Durchführung einer Lebendnierenspende sind als Geschwister HLA-identisch (komplette HLA-Übereinstimmung mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% in der F1-Generation). Donor-spezifische Antikörper (DSA) können folglich mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit virtuell ausgeschlossen werden.

Patient 1 wurde mit einem PRA-Wert von 0% als nicht immunisiert klassifiziert. Obwohl er also mit hoher Wahrscheinlichkeit keinerlei anti-HLA-Antikörper entwickelt hatte, zeigten sich im CDC-Kreuztest wiederum positive Reaktionsergebnisse in allen Zellpopulationen (Tabelle 18, Score 2/4 und 4). In Übereinstimmung mit der Nicht-Nachweisbarkeit von anti-HLA-Antikörpern (0% PRA) wurden im ELISA-Kreuztest keine Donor-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Zusammenfassend ist zu folgern, dass auch unter Therapie mit Basiliximab der ELISA-Kreuztest in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des virtuellen Kreuztestes valide Ergebnisse erbrachte, während die Ergebnisse des CDC-Kreuztestes durch den therapeutischen Antikörper beeinflusst wurden. Als anti-CD25-Antikörper führt Basiliximab ganz offensichtlich zur komplementvermittelten Zelllyse aller CD25-exprimierenden Zellen, so auch von B- und T-Lymphozyten, die die Zielzellen des CDC-Kreuztestes darstellen. Somit ergeben sich für den CDC-Kreuztest in allen Zellfraktionen positive Testergebnisse, die jedoch nicht den Nachweis Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper repräsentieren.

5 Diskussion

Die Verwendung monoklonaler Antikörper (mAk) zur Präkonditionierung des Empfängers bei AB0-Blutgruppen-inkompatiblen Nierentransplantationen sowie zur Prophylaxe und Therapie akuter Abstoßungsreaktionen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Der in diesem Kontext bisher am häufigsten verwendete mAk ist Rituximab, der durch Bindung an das CD20-Molekül auf der B-Zell-Oberfläche zur Depletion dieser Zellen führt und somit die Bildung einer humoralen Immunantwort gegen AB0-Blutgruppenantigene verhindern soll. Auch drei der vier Transplantationszentren, die mit dem HLA-Labor am Universitätsklinikum Halle zusammenarbeiten, haben das Verfahren der AB0-inkompatiblen Lebendnierenspende nach Präkonditionierung mit Rituximab implementiert. In diesem Zusammenhang fiel bereits frühzeitig die Beeinflussung der Testergebnisse des komplementabhängigen Lymphozytotoxizitäts (CDC)-Kreuztestes auf, nachdem die Patienten mit Rituximab vorbehandelt worden waren (Schlaf et al., 2012). Auch für die Verwendung des ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten Basiliximab, der als anti-CD25-Antikörper gegen die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors gerichtet ist und vorrangig zur Prophylaxe akuter Abstoßungsreaktionen, d.h. zur Initialtherapie bei Nierentransplantationen eingesetzt wird, wurden invalide Ergebnisse des CDC-Kreuztestes beobachtet. Im Zuge dieser Arbeit sollte deshalb die Eignung ELISA-basierender Methoden (AMS, AbCross) als alternative Kreuztestverfahren für Nierentransplantatempfänger nach Konditionierung mit therapeutischen Antikörpern untersucht werden.

5.1 Konditionierung mit Rituximab und Basiliximab führt zu falsch positiven Testergebnissen im Standard-Kreuztestverfahren

Alle Proben der mit Rituximab behandelten Patienten zeigten im CDC-Kreuztest positive bis stark positive Testergebnisse in der B-Lymphozyten- und gering positive Ergebnisse in der T-Lymphozytenfraktion sowie gering bis mäßig positive Ergebnisse unter Verwendung Peripherer Blutlymphozyten (PBL). Im ELISA-basierenden Kreuztest wurden hingegen für keinen Patienten Donor-spezifische Antikörper (DSA) nachgewiesen. 24 der 27 Patienten ließen sich über die Bestimmung Panel-reaktiver Antikörper als nicht immunisiert (0% PRA) klassifizieren, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit keiner dieser Patienten überhaupt Antikörper gegen HLA-Merkmale entwickelt hatte. Für die Patienten 10, 15 und 19 aus der Rituximab-Gruppe (Tabelle 16) wurden niedrige PRA-Werte zwischen 4%

und 18% ermittelt. Unter Berücksichtigung der Antikörperspezifisierungen konnte im virtuellen Kreuztest jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei nicht um Antikörper gegen HLA-Merkmale der jeweiligen Spender handelte. Die nachgewiesenen Antikörper waren in keinem Fall als Donor-spezifisch zu klassifizieren und folglich auch nicht als Ursache der positiven CDC-Kreuztest-Ergebnisse zu interpretieren. Es erschien plausibel, dass die falsch positiven CDC-Kreuztest-Ergebnisse als Folgeerscheinung des in den Patientenserum enthaltenen therapeutischen Antikörpers zu werten waren. Rituximab gehört als Antikörper vom IgG1-Isotyp zu den komplementfixierenden Antikörpern, die in der Lage sind, durch Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes das Komplementsystem über den klassischen Weg zu aktivieren. Werden nun die Spenderlymphozyten mit dem Rituximab-haltigen Serum des Empfängers inkubiert, kommt es zur Bindung des Antikörpers an seine Zielstruktur, das CD20-Molekül auf der B-Zell-Oberfläche. Bei Zugabe von Kaninchenkomplement erfolgt die Aktivierung durch die Antigen-Antikörperkomplexe, woraus die Lyse der Zellen resultiert. Der hohe Anteil letaler Zellen in der B-Zell-Fraktion (entsprechend den Scores von 6 und 8) beruhte also auf einer Rituximab-vermittelten Komplementaktivierung. Mehrere diesbezügliche Untersuchungen führten zu vergleichbaren Resultaten (Book et al., 2005; Gatault et al., 2013; Milongo et al., 2015). Die für die Fraktion der PBL bestimmten niedrig positiven Werte von 2 bis 4 spiegeln den individuell unterschiedlichen Anteil der B-Zellen an den Gesamtlmphozyten wider (7-15% der PBL). Erstaunlicherweise finden sich auch nach Auswertung der T-Zell-Fraktion niedrig positive Werte zwischen 1/2 und 2. Da T-Zellen kein CD20-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen und eine Rituximab-Bindung theoretisch nicht stattfindet, wären hier komplett negative Reaktionsergebnisse zu erwarten gewesen. Das in diesem Zusammenhang zu berücksichtigende Phänomen kontaminierender B-Zellen in der T-Zellfraktion bei Nutzung des verwendeten T-Zell-Isolationssystems (RosetteSepTM Cell Separation System, Stemcell Technologies Inc.) wurde bereits 2010 beschrieben (Mueller, 2010) und kommt offensichtlich durch bei der Dichtegradientenzentrifugation nicht depletierbare B-Zellen zustande. Ursächlich ist wahrscheinlich eine zu geringe Menge an bispezifischen anti-CD19-Antikörpern, die für die Bindung der B-Lymphozyten an die Erythrozyten und ihre nachfolgende Depletion verantwortlich sind (Kapitel 3.7.2). Die Ergebnisse der ELISA-basierenden Kreuztestsysteme (AMS, AbCross) konnten hingegen durch die virtuellen Kreuztestvarianten vollumfänglich bestätigt werden. Beide Systeme in Kombination sind im Gegensatz zum CDC-basierenden Kreuztest also gut geeignet, um Donor-spezifische Antikörper bei mit Rituximab präkonditionierten Nierentransplantatempfängern auszu-

schließen.

In einer zweiten Gruppe wurden Seren von Patienten unter Basiliximab-Therapie untersucht, bei denen nach der Transplantation Abstoßungsreaktionen aufgetreten waren. Auch in dieser Gruppe zeigte der CDC-Kreuztest für alle getesteten Patientenseren und in allen drei untersuchten Zellfraktionen (PBL, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten) mit Werten von 2/4 bis 6/8 positive Reaktionsergebnisse. Für Patient 1 konnten DSA bereits virtuell ausgeschlossen werden, da entsprechend seinem Anteil Panel-reaktiver Antikörper (0% PRA) keine anti-HLA-Immunsierung vorlag. In bester Übereinstimmung mit diesem Ergebnis fiel der ELISA-basierende Kreuztest in beiden HLA-Klassen negativ aus. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, konnten auch für den Patienten 2 trotz seines hohen Immunsierungsgrades (86% PRA) Donor-spezifische Antikörper ausgeschlossen werden, da Spender und Empfänger als Geschwister HLA-identisch waren. Auch hier wurden im Gegensatz zum CDC-Kreuztest über den ELISA-Kreuztest Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper als Ursache der Abstoßungsreaktion ausgeschlossen. Für die geringwertig immunisierten Patienten 3 und 4 (12% und 20% PRA) konnte unter Berücksichtigung des virtuellen Kreuztestes gezeigt werden, dass diese zwar keine DSA gegen HLA-Merkmale der Klasse I, wohl aber gegen Merkmale der HLA-Klasse II des entsprechenden Spenders entwickelt hatten. Diese Differenzierung wurde auch durch den ELISA-Kreuztest klar getroffen, während der CDC-Kreuztest jeweils für beide HLA-Klassen positiv ausfiel, d.h. in beiden Fällen fälschlicherweise den Nachweis von DSA indizierte, die gegen HLA-Klasse-I-Moleküle gerichtet waren. Die Ergebnisse des CDC-Kreuztestes müssen folglich mit größten Zweifeln betrachtet werden. Die falsch positiven Resultate beruhen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auf dem in den Patientenseren enthaltenen therapeutischen Antikörper Basiliximab, der ebenso wie der Antikörper Rituximab dem komplementaktivierenden IgG1-Isotyp zuzuordnen ist. Dieser führt nach Bindung an die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) zur komplementvermittelten Zellyse all jener Zellen, die dieses Molekül exprimieren, unter anderem T- und B-Lymphozyten. Abweichende Resultate erbrachten die Untersuchungen von *Milongo et al.* (2015). Diese testeten *in vitro* den Einfluss unterschiedlich hoher Basiliximab-Konzentrationen auf das Ergebnis des CDC-Kreuztestes und fanden zunächst keine Beeinflussung der Testergebnisse. Eine Einschränkung dieses Resultates ergibt sich jedoch aus dem unterschiedlich hohen Anteil CD25-positiver Zellen in Abhängigkeit von Alter und Gesundheitszustand der Spender. Falsch positive Testergebnisse bei höheren Frequenzen CD25-positiver

Zellen als den getesteten konnten somit auch entsprechend den Argumenten dieser Arbeitsgruppe nicht überzeugend ausgeschlossen werden (Milongo et al., 2015). Weitere Untersuchungen, um diese Diskrepanz zu klären, sind insbesondere deshalb notwendig, da in der vorliegenden Arbeit nur vier Fälle in diese Testgruppe aufgenommen werden konnten. Da für den CDC-Kreuztest vitale Donor-Zellen benötigt werden, waren die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf Lebendnierenspenden beschränkt, bei denen auch nach der Transplantation noch vitale Spenderzellen zur Verfügung gestellt werden konnten. Zusammenfassend soll an dieser Stelle jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in klarem Gegensatz zum CDC-Kreuztest der ELISA-basierende Kreuztest valide Ergebnisse für Basiliximab-behandelte Patienten erbrachte, die virtuell in vollem Umfang bestätigt werden konnten und somit als plausibel betrachtet werden müssen.

5.2 Der ELISA-basierende Kreuztest schließt eine diagnostische Lücke in der Transplantationsmedizin

Die Auswirkungen von in den Patientenseren enthaltenen Arzneistoffen auf die verschiedenen Kreuztestverfahren wurden bisher nur wenig untersucht. *Book et al.* (2005) testeten den Einfluss verschiedener chimärer und humanisierter therapeutischer Antikörper auf CDC-, FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)- und ELISA-basierende (Transplant Monitoring System^R, TMS) Kreuztestverfahren. Während sowohl der CDC- als auch der FACS-basierende Kreuztest falsch positive Ergebnisse erbrachten, wurden die Ergebnisse des TMS-Kreuztestes, der der direkte Vorläufer des in der vorliegenden Arbeit verwendeten ELISA-basierenden Systems AMS-ELISA war, nicht durch die therapeutischen Antikörper beeinflusst (Book et al., 2005). *Schlaf et al.* (2012) beschrieben falsch positive CDC-Kreuztest-Ergebnisse im Zusammenhang mit Stammzelltransplantationen bei Leukämiepatienten, die mit dem Zytostatikum 6-Mercaptopurin behandelt worden waren. Normalerweise wird für diese Patienten kein negativer Kreuztest gefordert, da in Vorbereitung einer Stammzelltransplantation Spender und Empfänger in höchstem Maße, d.h. in der hochauflösenden vierstelligen HLA-Typisierung HLA-identisch sein müssen. In Einzelfällen werden aber auch Stammzellen zwischen nicht komplett HLA-identischen Personen, etwa zwischen Eltern und Kindern transplantiert. In diesen Fällen sogenannter haploidentischer Stammzellspender ist der Ausschluss Donor-spezifischer Antikörper erforderlich. Im virtuellen Kreuztest konnte für die beschriebenen Fälle mehrfach gezeigt werden, dass die Empfänger keine Antikörper gegen HLA-Merkmale des Spenders ge-

bildet hatten. Folglich lag der Verdacht nahe, dass das therapeutisch verabreichte Zytostatikum 6-Mercaptopurin zum Zelltod der Spenderlymphozyten und somit zum positiven CDC-Kreuztest-Ergebnis geführt hatte. Der parallel durchgeführte ELISA-Kreuztest erbrachte auch für diese Fälle die dem virtuellen Ansatz entsprechenden negativen Ergebnisse (Schlaf et al., 2012). In den bereits erwähnten Untersuchungen von *Milongo* und Mitarbeitern (Kapitel 5.1) wurden neben den monoklonalen Antikörpern Rituximab und Basiliximab auch Intravenöses Immunglobulin (IVIG) und Anti-Thymozytenglobulin (ATG) untersucht. Hierbei handelt es sich um polyklonale Antikörpergemische, die häufig Bestandteil des Therapieregimes zur Prävention akuter zellulär und Antikörper-vermittelter Abstoßungsreaktionen sind. *Milongo et al.* (2015) zeigten in diesem Zusammenhang, dass auch IVIG und ATG das Potenzial haben, das CDC-Kreuztest-Ergebnis zu beeinflussen. Sie fanden für den ATG-Einsatz falsch positive und für den IVIG-Einsatz falsch negative Ergebnisse im Standardverfahren des komplementabhängigen Lymphozytotoxizitätskreuztestes (Milongo et al., 2015). In Anbetracht sich stetig weiterentwickelnder Therapieverfahren, sowie der zu erwartenden Einführung neuer *per se* zytotoxischer Arzneistoffe, darunter insbesondere immuntherapeutische Antikörper, in der Transplantationsmedizin, werden weitere Studien nötig sein, um verlässliche Kreuztestverfahren zum Ausschluss Donor-spezifischer Antikörper zu generieren und validieren. In jedem Fall wird die Verwendbarkeit des CDC-Standard-Kreuztestes weitere erhebliche Einschränkungen erfahren.

Doch nicht nur durch medikamentöse Therapien wird das Ergebnis des CDC-Kreuztestes verfälscht. Nach *Schlaf et al.* (2012) zeigen auch Patienten, die an Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises leiden, falsch positive CDC-Kreuztest-Ergebnisse. Sie untersuchten Patienten die an Systemischem Lupus Erythematosus (SLE) und Rheumatoider Arthritis (RA), d.h. an Erkrankungen des autoimmunen Immunkomplex Typus (Typ III) erkrankt waren. Alle diese Patienten hatten, nachgewiesen in verschiedenen Antikörperspezifisierungsassays, keine Donor-spezifischen anti-HLA-Antikörper entwickelt, zeigten im CDC-Kreuztest aber dennoch überwiegend positive Ergebnisse. Der ELISA-Kreuztest konnte wiederum für alle SLE-Patienten Donor-spezifische Antikörper in Übereinstimmung mit der virtuellen Kreuztest-Variante valide und plausibel ausschließen. In der Gruppe der RA-Patienten wurde in einigen wenigen Fällen allerdings auch der ELISA-Kreuztest beeinflusst. Diese Patienten litten jeweils unter einem schweren akuten Schub der RA. Im Vergleich mit dem CDC-Kreuztest waren jedoch deutlich weniger Fälle von

falsch positiven ELISA-Kreuztestergebnissen betroffen (2 von 14), sodass der ELISA-Kreuztest trotzdem als der zuverlässigere anzusehen ist (Schlaf et al., 2012). In weiterführenden Untersuchungen wurden diese Ergebnisse bestätigt (Schlaf et al., 2014a, 2016). Kritisch wurde in diesen Publikationen darauf hingewiesen, dass der CDC-Kreuztest trotz seiner erheblichen Artefaktanfälligkeit im Jahr 2010 in den Richtlinien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) als Standardkreuztestverfahren für postmortale Nierenspenden festgelegt worden war. Dies bedeute, dass für die Allokation von postmortalen Spenderorganen über die Stiftung Eurotransplant (Leiden, Niederlande) ausschließlich der CDC-basierende Kreuztest eingesetzt werden dürfe. Patienten, die unter Autoimmunerkrankungen, insbesondere SLE leiden, hätten aufgrund Artefakt-bedingter CDC-Kreuztestergebnisse deshalb eine erheblich verringerte Chance, auf diesem Weg ein Organ zu erhalten. Die Autoren betonten, dass der ELISA-Kreuztest für diese Patienten zu plausiblen und verlässlichen Ergebnissen führt und somit den CDC-Kreuztest in diesen Fällen ersetzen bzw. ergänzen sollte.

Ein weiterer Nachteil des CDC-Kreuztestes liegt darin, dass er im Gegensatz zum ELISA-basierenden Kreuztest als funktioneller Test seinem Namen entsprechend ausschließlich komplementfixierende Antikörperisotypen detektiert. Verschiedene Studien zeigten jedoch, dass auch nicht-komplementfixierende Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper Einfluss auf das Transplantatüberleben ausüben (Karuppan et al., 1992; Sumitran-Holgersson, 2001; Slavcev et al., 2003a; Slavcev, 2003b; Lefaucheur et al., 2016; Guidicelli et al., 2016). Für diese nicht-komplementvermittelten Effekte werden verschiedenen Mechanismen diskutiert. Zum einen entfalten nicht-komplementfixierende DSA ihre Wirkung im Sinne der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) über die Aktivierung Natürlicher Killerzellen (Hidalgo et al., 2010; Hirohashi et al., 2012). Zum anderen werden über die Modulation intrazellulärer Signalwege proinflammatorische sowie proliferative Effekte auf das Kapillarendothel ausgeübt, die zur Vaskulopathie und letztlich zur Transplantatschädigung führen (Reyes-Vargas et al., 2009; Zhang und Reed, 2009)

Abschließend sei noch einmal darauf hingewiesen, dass der CDC-Kreuztest als Vitalitätsassay generell anfällig gegenüber Störgrößen ist. Für ein valides Ergebnis ist einerseits ein initial hoher Anteil vitaler Zellen Voraussetzung (>90%), andererseits muss eine artefizielle Aktivierung des Komplementsystems ausgeschlossen sein. Hier zeigt sich der ELISA-Kreuztest überlegen, da er im Gegensatz zum CDC-Kreuztest keine vitalen Donorzellen benötigt und unabhängig von der Aktivierung des Komplementsystems arbei-

tet. Somit ist es möglich, durch Verwendung eines aus den Donorzellen gewonnenen und zur Materiallagerung tiefgefrorenen Lysats aus Donorzellen (s. Kapitel 3.6.2) retrospektiv auch dann einen *de facto*-Kreuztest durchzuführen, wenn keine vitalen Donorzellen zur Verfügung stehen (Altermann et al., 2006; Sel et al., 2012; Schlaf et al., 2014b, 2015) wie es zum Beispiel bei Abstoßungsreaktionen nach einer postmortalen Organspende der Fall ist. Bis *dato* konnte in einer solchen Situation nur ein virtueller Kreuztest durchgeführt werden. Bereits im Jahr 1996 versuchten Zavazava und Mitarbeiter, dieses Problem im Zusammenhang mit Untersuchungen zu Hornhauttransplantationen zu lösen. Sie verwendeten aufgetaute retinale Pigmentepithelzellen der Hornhautspender, kultivierten diese, stimulierten die Expression von HLA-Molekülen mittels rekombinatem Interferon- γ und führten bei ausreichender Vitalität der aufgetauten und kultivierten Zellen im Anschluss einen FACS-basierenden Kreuztest durch (Zavazava, N. and Nolle, B. and Duncker, G. and Jenisch, S. and Westphal, E. and Eckstein, V. and Muller-Ruchholtz, W., 1996). Dieser Ansatz ist im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit getesteten ELISA-basierenden Verfahren jedoch zeitaufwendig, sehr kostenintensiv und technisch extrem anspruchsvoll. Damit entzieht sich das Verfahren dieser Arbeitsgruppe von vornherein jeder Anwendung in der Routinediagnostik.

5.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der CDC-basierende Kreuztest zur Darstellung Donor-spezifischer Antikörper bei Patienten, die mit therapeutischen Antikörpern behandelt wurden, ungeeignet ist. In diesen Fällen wird ein alternatives Verfahren benötigt. Der in der vorliegenden Arbeit in diesem Zusammenhang getestete ELISA-Kreuztest ist eine geeignete Methode, da er

- durch die Zugabe therapeutischer Antikörper zum Empfängerserum nicht beeinflusst wird,
- unabhängig von der Vitalität der Donorzellen arbeitet,
- sowohl zytotoxische als auch nicht-zytotoxische anti-HLA-Antikörper detektiert und
- ein gut standardisierbares und methodisch mit vertretbarem Aufwand implementierbares Verfahren darstellt.

In diesem Sinne sollte er zumindest in Situationen, in denen der CDC-Kreuztest keine plausiblen Ergebnisse liefert, als alternatives bzw. ergänzendes Verfahren Eingang in die immunologische Diagnostik eines jeden HLA-Labors finden. Die durch die Bundesärztekammer und Eurotransplant in den RiLiBÄK im Jahr 2010 getroffenen Festlegungen sollten erneut angepasst werden, um den in den letzten Jahren mit zunehmender Frequenz in der Fachliteratur und in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Insuffizienzen des konventionellen CDC-Kreuztestes Rechnung zu tragen.

5.4 Limitationen der Arbeit

Die größte Limitation ergab sich aus der geringen Patientenzahl ($n=4$) in der Basiliximab-Gruppe. Diese beruhte wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 5.1) auf der Abhängigkeit des CDC-Kreuztestes von vitalen Donorzellen, so dass die Untersuchungen auch im Falle der Basiliximab-Gruppe (Testdurchführung nach der Transplantation) auf Lebendnierenspenden beschränkt werden mussten. Das Verfahren der AB0-Blutgruppeninkompatiblen Lebendnierenspende unter Rituximab-Konditionierung der Empfänger wird zwar in zunehmendem Maße, jedoch insgesamt noch relativ selten angewandt. Zusätzlich lehnen einige Nierentransplantationszentren die AB0-Blutgruppeninkompatible Lebendnierenspende aufgrund einer erhöhten Rejektionsgefahr und wegen teilweise nicht unerheblicher Nebenwirkungen der Rituximab-Konditionierung grundsätzlich ab. Dadurch war die Patientenzahl in der Rituximab-Gruppe mit 27 Spenden ebenfalls begrenzt, auch wenn diese Anzahl an parallel untersuchten Kreuztestverfahren aufgrund der eindeutigen Ergebnisse ebenso eindeutige Konklusionen erlaubt.

Da im Zeitraum der Arbeitserstellung kein weiterer *de facto* Kreuztest vergleichbarer Spezifität und Sensitivität zur Verfügung stand, wurde der virtuelle Kreuztest als Referenzmethode verwendet bzw. anti-HLA-Antikörper über die Bestimmung der Panelreaktivität (% PRA) ausgeschlossen. Wie in Kapitel 3.8.2 bereits erläutert, kann es in Einzelfällen jedoch trotz eines PRA-Wertes von 0% zu einem positiven *de facto* Kreuztestergebnis kommen, wenn z.B. eine Antikörperspezifität nur gegen seltene, im Antigenpanel des entsprechenden Antikörperspezifizierungssassays nicht enthaltene HLA-Phänotypen gerichtet ist. Derartige seltene Spezifitäten lassen sich folglich grundsätzlich nicht virtuell klassifizieren.

6 Zusammenfassung

Gegen HLA-Merkmale eines Organspenders gerichtete sogenannte Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper, stellen die häufigste Ursache für hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen dar. Ein negativer Kreuztest, das heißt der Ausschluss dieser Donor-spezifischen Antikörper, ist deshalb eine maßgebliche Voraussetzung für ein erfolgreiches Transplantatüberleben. Zur Zeit gilt der bereits in den sechziger Jahren entwickelte und im Jahr 2010 durch die Bundesärztekammer und Eurotransplant für *post mortem* Spenden solider Organe als obligatorisch festgelegte, komplementabhängige Lymphozytotoxizitäts (CDC)-Kreuztest als methodischer Goldstandard. Als funktionelles Testsystem ist dessen Validität jedoch zum einen in hohem Maße von der Vitalität der Spenderlymphozyten abhängig. Zum anderen kann es durch artefizielle Aktivierungen des Komplementsystems zu falsch positiven Ergebnissen dieses Tests kommen. Artefizielle Komplementaktivierungen können zum Beispiel durch im Empfängerserum enthaltene Therapeutika wie die monoklonalen Antikörper Rituximab und Basiliximab ausgelöst werden, die in zunehmendem Maße als Bestandteil der immunsuppressiven Therapie im Kontext von Organtransplantationen auftauchen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der ELISA-basierende Kreuztest (AMS-ELISA/AbCross-ELISA) bei Patienten unter Rituximab- oder Basiliximab-Therapie artefaktfreie Resultate erzielt und somit eine geeignete Alternative zum Standardverfahren des Lymphozytotoxizitätskreuztestes darstellt.

27 Seren von Patienten unter Rituximab- und vier Seren von Patienten unter Basiliximab-Therapie wurden jeweils mittels CDC-basierendem und ELISA-basierendem Kreuztest untersucht. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil Panel-reaktiver Antikörper der Empfänger bestimmt. Für immunisierte Empfänger mit einem Anteil Panel-reaktiver Antikörper >0% wurden zusätzliche Antikörperspezifizierungen durchgeführt und mit den HLA-Merkmalen der korrespondierenden HLA-typisierten Spender verglichen. Diese sogenannten virtuellen Kreuztests dienten als Referenzmethode, um die Validität der Ergebnisse der *de facto* Kreuztestverfahren, CDC-Kreuztest und ELISA-Kreuztest, zu überprüfen.

In allen getesteten Fällen gelang unter Verwendung des CDC-Kreuztestes kein valider Ausschluss bzw. Nachweis Donor-spezifischer Antikörper. Hier kam es durch die therapeutischen Antikörper Rituximab und Basiliximab zur artefiziellen Komplementaktivierung und folglich zu falsch positiven Ergebnissen. Im Gegensatz dazu stimmten die Ergeb-

nisse der ELISA-basierenden Verträglichkeitsproben mit denen der virtuellen Kreuztestansätze in allen Fällen überein. Donor-spezifische anti-HLA-Antikörper konnten sicher ausgeschlossen bzw. nachgewiesen werden. Diese Resultate zeigen deutlich die methodische Überlegenheit des ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens gegenüber dem CDC-basierenden Standardkreuztestverfahren. Folglich sollte in Situationen, in denen der CDC-basierende Kreuztest keine plausiblen Ergebnisse liefert, der ELISA-basierende Kreuztest als alternatives, zumindest aber komplementäres Verfahren eingesetzt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Alegre E, Rizzo R, Bortolotti D, Fernandez-Landazuri S, Fainardi E, Gonzalez A, (2014), Some basic aspects of HLA-G-biology. *J Immunol Res*, 2014:657625.
- Altermann W, Seliger B, Sel S, Wendt D, Schlaf G, (2006), Comparison of the established standard complement-dependent cytotoxicity and flow cytometric crossmatch assays with a novel ELISA-based HLA crossmatch procedure. *Histol Histopathol*, 21 (10):1115–1124.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty D. E, Spies T, (1994), A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(14): 6259–6263.
- Barnett A. N. R, Hadjianastassiou V. G, Mamode N, (2013), Rituximab in renal transplantation. *Transpl Int*, 26(6):563–575.
- Batchelor J. R, Joysey V. C, (1969), Influence of HL-A incompatibility on cadaveric renal transplantation. *Lancet*, 1(7599):790–792.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips J. H, Lanier L. L, Spies T, (1999), Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285 (5428):727–729.
- Becker L. E, Morath C, Süsal C, (2016), Immune mechanisms of acute and chronic rejection. *Clin Biochem*, 49(4-5):320–323.
- Benichou G, (1999), Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci*, 4:D476–80.
- Benichou G, Takizawa P. A, Olson C. A, McMillan M, Sercarz E. E, (1992), Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med*, 175(1):305–308.
- Binder M, Vogtle F.-N, Michelfelder S, Müller F, Illerhaus G, Sundararajan S, Mertelsmann R, Trepel M, (2007), Identification of their epitope reveals the structural basis for the mechanism of action of the immunosuppressive antibodies basiliximab and daclizumab. *Cancer Res*, 67(8):3518–3523.
- Björkman P. J, Saper M. A, Samraoui B, Bennett W. S, Strominger J. L, Wiley D. C, (1987), Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329 (6139):506–512.
- Book B. K, Agarwal A, Milgrom A. B, Bearden C. M, Sidner R. A, Higgins N. G, Pescovitz M. D, (2005), New crossmatch technique eliminates interference by humanized and chimeric monoclonal antibodies. *Transplant Proc*, 37(2):640–642.
- Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins L. V, Tarkowski A, (2006), Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. *Immunology*, 117(4): 548–557.

- Bubien J. K, (1993), Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol*, 121 (5):1121–1132.
- Carapito R , Bahram S, (2015), Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev*, 267(1):88–116.
- Chapman T. M , Keating G. M, (2003), Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *Drugs*, 63(24):2803–2835.
- Cooper J. E, Gralla J, Cagle L, Goldberg R, Chan L , Wiseman A. C, (2011), Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation*, 91(10):1103–1109.
- Cornell L. D , Colvin R. B, (2005), Chronic allograft nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14(3):229–234.
- Cornell L. D, Smith R. N , Colvin R. B, (2008), Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*, 3:189–220.
- Cragg M. S, Walshe C. A, Ivanov A. O , Glennie M. J, (2005), The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, 8:140–174.
- Dausset J, (1958), Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*, 20(1-4):156–166.
- Dausset J, Colombani J, Legrand L, Feingold N , Rapaport F. T, (1970), Genetic and biological aspects of the HL-A system of human histocompatibility. *Blood*, 35(5):591–612.
- Deans J. P, Li H , Polyak M. J, (2002), CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology*, 107(2):176–182.
- EMBL-EBI , Services E. W. Statistics < IMGT/HLA < IPD < EMBL-EBI, 2017. URL <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>. [letzter Aufruf: 22.04.2017].
- Engelhard V. H, (1994), Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, 12:181–207.
- European Medicines Agency . Simulect : EPAR - Product Information, 2015. URL http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000207/WC500053543.pdf. [letzter Aufruf: 22.04.2017].
- European Medicines Agency . MabThera : EPAR - Product Information, 2016. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/000165/WC500208542.pdf. [letzter Aufruf: 22.04.2017].
- Ferrer F, Machado S, Alves R, Macario F, Bastos C, Roseiro A , Mota A, (2010), Induction with basiliximab in renal transplantation. *Transplant Proc*, 42(2):467–470.
- Feucht H. E , Opelz G, (1996), The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. *Kidney Int*, 50(5):1464–1475.

- Feucht H. E, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E, (1993), Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*, 43(6):1333–1338.
- Frohn C, Fricke L, Puchta J. C, Kirchner H, (2001), The effect of HLA-C matching on acute renal transplant rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 16(2):355–360.
- Gatault P, Jollet I, Paintaud G, Magdelaine C, Bridoux F, Lebranchu Y, Büchler M, Touchard G, Thierry A, (2013), Very low residual concentrations of rituximab long after infusion still induce positive B-cell complement-dependent cytotoxicity-crossmatch. *Hum Immunol*, 74(12):1616–1618.
- Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, Langer R. M, Süsal C, (2013), Superiority of AbCross enzyme-linked immunosorbent assay cross-match over the B-cell complement-dependent lymphocytotoxicity cross-match. *Transplant Proc*, 45(4):1383–1385.
- Gonzalez-Molina M, Ruiz-Esteban P, Caballero A, Burgos D, Cabello M, Leon M, Fuentes L, Hernandez D, (2016), Immune response and histology of humoral rejection in kidney transplantation. *Nefrologia*, 36(4):354–367.
- Greene W. C, Depper J. M, Kronke M, Leonard W. J, (1986), The human interleukin-2 receptor: analysis of structure and function. *Immunol Rev*, 92:29–48.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T, (1996), Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22):12445–12450.
- Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thauat O, Dubois V, Visentin J, Bachelet T, Morelon E, Nickerson P, Merville P, Taupin J.-L, Couzi L, (2016), Non-complement-binding de novo donor-specific anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. *J Am Soc Nephrol*, 27(2):615–625.
- Gupta A, Iveson V, Varaganam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham R. C, (2008), Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? *Transplantation*, 85(8):1200–1204.
- Haas M, Sis B, Racusen L. C, Solez K, Glotz D, Colvin R. B, Castro M. C. R, David D. S. R, David-Neto E, Bagnasco S. M, Cendales L. C, Cornell L. D, Demetris A. J, Drachenberg C. B, Farver C. F, Farris A. B. r, Gibson I. W, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nicleleit V, Randhawa P, Rodriguez E. R, Rush D, Smith R. N, Tan C. D, Wallace W. D, Mengel M, (2014), Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*, 14(2): 272–283.
- Hajeer A. H, Saleh S, Sutton P, Shubaili A, Anazi H, (2009), Pronase-free B-cell flow-cytometry crossmatch. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20(4):662–665.
- Hall B, Duggin G, Philips J, Bishop G, Horvath J, Tiller D, (1984), Increased expression of HLA-DR antigens on renal tubular cells in renal transplants: relevance to the rejection response. *The Lancet*, 324(8397):247–251.

- Hetrick S. J, Schillinger K. P, Zachary A. A , Jackson A. M, (2011), Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Hum Immunol*, 72(4):330–336.
- Hidalgo L. G, Sis B, Sellares J, Campbell P. M, Mengel M, Einecke G, Chang J , Halloran P. F, (2010), NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 10(8):1812–1822.
- Hirohashi T, Chase C. M, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen J. C, Russell P. S , Colvin R. B, (2012), A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant*, 12(2):313–321.
- Jolly E. C, Key T, Rasheed H, Morgan H, Butler A, Pritchard N, Taylor C. J , Clatworthy M. R, (2012), Preformed donor HLA-DP-specific antibodies mediate acute and chronic antibody-mediated rejection following renal transplantation. *Am J Transplant*, 12(10): 2845–2848.
- Karuppan S. S, Ohlman S , Moller E, (1992), The occurrence of cytotoxic and non-complement-fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation*, 54(5):839–844.
- Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen V. P , Fjeldborg O, (1966), Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, 2(7465):662–665.
- Klein J , Sato A, (2000), The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343(10): 702–709.
- Lechler R. I , Batchelor J. R, (1982), Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med*, 155(1):31–41.
- Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M , Geraghty D. E, (1998), HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9):5199–5204.
- Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, van Duong Huyen J.-P, Vernerey D, Aubert O, Verine J, Jouven X, Legendre C, Glotz D, Loupy A , Zeevi A, (2016), IgG donor-specific anti-Human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol*, 27(1):293–304.
- Macklin P. S, Morris P. J , Knight S. R, (2017), A systematic review of the use of rituximab for the treatment of antibody-mediated renal transplant rejection. *Transplant Rev*.
- Mehra N. K, Siddiqui J, Baranwal A, Goswami S , Kaur G, (2013), Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. *Ann N Y Acad Sci*, 1283:30–42.
- Milongo D, Vieu G, Blavy S, Del Bello A, Sallusto F, Rostaing L, Kamar N , Congy-Jolivet N, (2015), Interference of therapeutic antibodies used in desensitization protocols on lymphocytotoxicity crossmatch results. *Transpl Immunol*, 32(3):151–155.

- Mueller K, (2010), T-cell and B-cell isolation by negative enrichment - results after two years' application in laboratory routine diagnostics. *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the German Society of Immunogenetics (DGI), Vienna, Austria*, page 55.
- Mungall A. J, Palmer S. A, Sims S. K, Edwards C. A, Ashurst J. L, Wilming L, Jones M. C, Horton R, Hunt S. E, Scott C. E, Gilbert J. G. R, Clamp M. E, Bethel G, Milne S, Ainscough R, Almeida J. P, Ambrose K. D, Andrews T. D, Ashwell R. I. S, Babbage A. K, Bagguley C. L, Bailey J, Banerjee R, Barker D. J, Barlow K. F, Bates K, Beare D. M, Beasley H, Beasley O, Bird C. P, Blakey S, Bray-Allen S, Brook J, Brown A. J, Brown J. Y, Burford D. C, Burrill W, Burton J, Carder C, Carter N. P, Chapman J. C, Clark S. Y, Clark G, Clee C. M, Clegg S, Cobley V, Collier R. E, Collins J. E, Colman L. K, Corby N. R, Coville G. J, Culley K. M, Dhama P, Davies J, Dunn M, Earthrowl M. E, Ellington A. E, Evans K. A, Faulkner L, Francis M. D, Frankish A, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Ghori M. J. R, Gilby L. M, Gillson C. J, Glithero R. J, Grafham D. V, Grant M, Gribble S, Griffiths C, Griffiths M, Hall R, Halls K. S, Hammond S, Harley J. L, Hart E. A, Heath P. D, Heathcott R, Holmes S. J, Howden P. J, Howe K. L, Howell G. R, Huckle E, Humphray S. J, Humphries M. D, Hunt A. R, Johnson C. M, Joy A. A, Kay M, Keenan S. J, Kimberley A. M, King A, Laird G. K, Langford C, Lawlor S, Leongamornlert D. A, Leversha M, Lloyd C. R, Lloyd D. M, Loveland J. E, Lovell J, Martin S, Mashreghi-Mohammadi M, Maslen G. L, Matthews L, McCann O. T, McLaren S. J, McLay K, McMurray A, Moore M. J. F, Mullikin J. C, Niblett D, Nickerson T, Novik K. L, Oliver K, Overton-Larty E. K, Parker A, Patel R, Pearce A. V, Peck A. I, Phillimore B, Phillips S, Plumb R. W, Porter K. M, Ramsey Y, Ranby S. A, Rice C. M, Ross M. T, Searle S. M, Sehra H. K, Sheridan E, Skuce C. D, Smith S, Smith M, Spraggon L, Squares S. L, Steward C. A, Sycamore N, Tamlyn-Hall G, Tester J, Theaker A. J, Thomas D. W, Thorpe A, Tracey A, Tromans A, Tubby B, Wall M, Wallis J. M, West A. P, White S. S, Whitehead S. L, Whittaker H, Wild A, Willey D. J, Wilmer T. E, Wood J. M, Wray P. W, Wyatt J. C, Young L, Younger R. M, Bentley D. R, Coulson A, Durbin R, Hubbard T, Sulston J. E, Dunham I, Rogers J, Beck S, (2003), The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, 425(6960):805–811.
- Murphy K. M, Travers P, Walport M, Janeway C. A, Seidler L, Ehrenstein M, Haußer-Stiller I. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 7. Auflage edition, 2009. ISBN 978-3-8274-2047-3.
- Opelz G, Döhler B, (2007), Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation*, 84(2):137–143.
- Opelz G, Wujciak T, Back D, Mytilineos J, Schwarz V, Albrecht G, (1994), Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Nierentransplantation. *Infusionsther Transfusionsmed*, 21 (3):198–202.
- Patel R, Terasaki P. I, (1969), Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 280(14):735–739.
- Pietra G, Romagnani C, Manzini C, Moretta L, Mingari M. C, (2010), The emerging role of HLA-E-restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors. *J Biomed Biotechnol*, 2010:907092.

- Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C, (2014), Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Front Immunol*, 5:505.
- Rebmann V, da Silva Nardi F, Wagner B, Horn P. A, (2014), HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy. *J Immunol Res*, 2014:297073.
- Reyes-Vargas E, Pavlov I. Y, Martins T. B, Schwartz J. J, Hill H. R, Delgado J. C, (2009), Binding of anti-HLA class I antibody to endothelial cells produce an inflammatory cytokine secretory pattern. *J Clin Lab Anal*, 23(3):157–160.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaout J, Carosella E. D, (2014), The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*, 2014:359748.
- Schlaf G, Mauz-Korholz C, Ott U, Leike S, Altermann W, (2012), General insufficiency of the classical CDC-based crossmatch to detect donor-specific anti-HLA antibodies leading to invalid results under recipients' medical treatment or underlying diseases. *Histol Histopathol*, 27(1):31–38.
- Schlaf G, Pollok-Kopp B, Altermann W, (2014a), Sensitive solid-phase detection of donor-specific antibodies as an aid highly relevant to improving allograft outcomes. *Mol Diagn Ther*, 18(2):185–201.
- Schlaf G, Rothhoff A, Altermann W, (2014b), Systemic lupus erythematosus leading to terminal renal failure and excluding patients from kidney allocation due to inadequate CDC-based cross-matching: Is there a diagnostic way out? *J Clin Cell Immunol*, 05 (02).
- Schlaf G, Stöhr K, Rothhoff A, Altermann W, (2015), ELISA-based crossmatching allowing the detection of emerging donor-specific anti-HLA antibodies through the use of stored donors' cell lysates. *Case Rep Transplant*, 2015:763157.
- Schlaf G, Rothhoff A, Altermann W, (2016), Der Festphasen-Kreuztest als valides diagnostisches Werkzeug zum Nachweis falsch positiver Kreuztestresultate bei Patienten mit begleitenden Autoimmunerkrankungen. *Transfusionsmedizin*, 6(04):169–173.
- Sel S, Schlaf G, Schurat O, Altermann W, (2012), A novel ELISA-based crossmatch procedure to detect donor-specific anti-HLA antibodies responsible for corneal allograft rejections. *J Immunol Methods*, 381(1-2):23–31.
- Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski J. K, (2009), The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*, 54(1):15–39.
- Slavcev A, (2003b), Donor-specific antibodies and kidney transplant rejection. *Ann Transplant*, 8(3):12–15.
- Slavcev A, Lacha J, Honsova E, Sajdlova H, Lodererova A, Vitko S, Valhova S, Striz I, Ivaskova E, (2003a), Clinical relevance of antibodies to HLA antigens undetectable by the standard complement-dependent cytotoxicity test. *Transpl Int*, 16(12):872–878.
- Sumitran-Holgersson S, (2001), HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 16(5):897–904.

- Süsal C , Opelz G, (2013), Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 18(4):438–444.
- Süsal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhenstroth A, Tran T. H, Heinold A , Opelz G, (2011), No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report. *Transplantation*, 91(8):883–887.
- Tait B. D, (2016), Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front Immunol*, 7:570.
- Tedder T. F , Engel P, (1994), CD20: A regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*, 15(9):450–454.
- The MHC sequencing consortium* , (1999), Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*, 401(6756):921–923.
- Tran T. H, Döhler B, Heinold A, Scherer S, Ruhenstroth A , Opelz G, (2011), Deleterious impact of mismatching for human leukocyte antigen-C in presensitized recipients of kidney transplants. *Transplantation*, 92(4):419–425.
- Trowsdale J, Ragoussis J , Duncan Campbell R, (1991), Map of the human MHC. *Immunol Today*, 12(12):443–446.
- Umer A, Killackey M, Paramesh A, Liu Y, Qin H, Atiq M, Lee B, Alper A. B, Simon E, Buell J , Zhang R, (2017), A comparison of three induction therapies on patients with delayed graft function after kidney transplantation. *J Nephrol*, 30(2):289–295.
- Vivier E, Tomasello E , Paul P, (2002), Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol*, 14(3):306–311.
- Waldmann T. A, Goldman C. K, Robb R. J, Depper J. M, Leonard W. J, Sharrow S. O, Bongiovanni K. F, Korsmeyer S. J , Greene W. C, (1984), Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med*, 160(5):1450–1466.
- Wassmuth R. *Einführung in das HLA-System*. ecomed Medizin, Landsberg/Lech, 2., aktualisierte und erw. Aufl. edition, 2005. ISBN 3-609-16332-1.
- Webster A. C, Ruster L. P, McGee R, Matheson S. L, Higgins G. Y, Willis N. S, Chapman J. R , Craig J. C, (2010), Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD003897.
- Wen J, Zhang M, Chen J, Zeng C, Cheng D , Liu Z.-H, (2013), HLA-DR overexpression in tubules of renal allografts during early and late renal allograft injuries. *Exp Clin Transplant*, 11(6):499–506.
- Williams R. C, Opelz G, McGarvey C. J, Weil E. J , Chakkera H. A, (2016), The risk of transplant failure with HLA mismatch in first adult kidney allografts from deceased donors. *Transplantation*, 100(5):1094–1102.

- Worthington J. E, Robson A. J, Sheldon S, Langton A , Martin S, (2001), A comparison of enzyme-linked immunoabsorbent assays and flow cytometry techniques for the detection of HLA specific antibodies. *Hum Immunol*, 62(10):1178–1184.
- Zavazava, N. and Nolle, B. and Duncker, G. and Jenisch, S. and Westphal, E. and Eckstein, V. and Muller-Ruchholtz, W. , (1996), Cross-matches on donor cadaver retinal pigment epithelial cells in corneal risk patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234(3):164–170.
- Zhang X , Reed E. F, (2009), Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant*, 9(11): 2459–2465.
- Zidi I, Kharrat N, Abdelhedi R, Hassine A. B, Laaribi A. B, Yahia H. B, Abdelmoula N. B, Abid L, Rebai A , Rizzo R, (2016), Nonclassical human leukocyte antigen (HLA-G, HLA-E, and HLA-F) in coronary artery disease. *Hum Immunol*, 77(4):325–329.

8 Thesen

1. Seit Dezember 2010 ist der komplementabhängige Lymphozytotoxizitätstest (CDC) durch Eurotransplant und die Richtlinien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) zum Ausschluss Donor-spezifischer anti-HLA Antikörpern (DSA) für *post mortem* Nierenspenden vorgeschrieben.
2. Als komplementvermittelter Vitalitätstest zeigt der CDC-basierende Kreuztest eine strikte Abhängigkeit von der Vitalität der verfügbaren Spenderlymphozyten.
3. Um das Vorhandensein von DSA nachzuweisen bzw. auszuschließen, muss die dem Assay zugrunde liegende Aktivierung des Komplementsystems auf anti-HLA Antikörper, die gegen die Spendermerkmale gerichtet sind, zurückzuführen sein.
4. Auch andere dem Serum der Empfänger zugrunde liegende Faktoren können zu einer Aktivierung des Komplementsystems und damit zu einem positiven Testergebnis führen. Da das Ergebnis in diesen Fällen nicht auf das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von DSA zurückzuführen ist, ist es als artefiziell bzw. falsch positiv zu klassifizieren.
5. Neben Immunkomplexen, die insbesondere im Zusammenhang mit Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises bei prospektiven Organempfängern auftreten, hat sich im Zuge der vorliegenden Arbeit herausgestellt, dass auch die Behandlung der Organempfänger mit therapeutischen Antikörpern zu einer Aktivierung des Komplementsystems und folglich zu falsch positiven CDC-Kreuztestergebnissen führt.
6. Im aufgeführten Kontext führen die beiden therapeutisch zur Empfängerkonditionierung eingesetzten monoklonalen Antikörper Rituximab und Basiliximab zu einer Aktivierung des Komplementsystems und folglich zu falsch positiven Ergebnissen des CDC-Kreuztestes.
7. Bei der Applikation beider therapeutischer Antikörper bietet sich als valide methodische Alternative ein Festphasen-Kreuztest (AMS-/AbCross-ELISA) an, da dieses Testsystem unabhängig von der Aktivierung des Komplementsystems arbeitet.
8. Der Arbeitshypothese entsprechend lieferte das alternativ verwendete ELISA-basierende Kreuztestverfahren (AMS-/AbCross-ELISA) in kompletter Übereinstimmung mit den virtuellen Kreuztestresultaten (Referenzmethode) valide Ergebnisse zum Ausschluss bzw. Nachweis von DSA.
9. Die im Jahr 2010 entsprechend den Richtlinien der Bundesärztekammer implementierte "Monopolisierung" des CDC-Kreuztestes ist folglich zu revidieren, da dieses Verfahren unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Empfängerkonditionierungen keine validen Ergebnisse zum Nachweis von DSA liefert. Der diagnostische Einsatz und die Verbreitung alternativer Festphasen-basierender Kreuztestverfahren sollte ausdrücklich gefördert werden.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle/Saale:

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe an keiner Universität, weder im In- noch im Ausland frühere Promotionsversuche unternommen.

Halle/Saale:

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Susanne Apel
Geburtsdatum	14.05.1976
Geburtsort	Weißenfels
Familienstand	verheiratet, 3 Kinder

Promotion und Studium

Promotion	Stabsstelle HLA-Labor des Klinikumsvorstandes am Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2013 – 2017
Studium der Medizin	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2010 - 2016 (Gesamtnote 2)
Studium der Pharmazie	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1995 - 2000 (Gesamtnote 2)

Beruflicher Werdegang

Assistenzärztin	Asklepios Klinikum, Weißenfels seit 2017
Apothekerin	Apotheke an der Saline, Naumburg 2000 - 2015

Schulische Ausbildungen

Schüleraustausch	Weaver Highschool, Weaver, Alabama, USA 1994–1995
Gymnasium	Goethe-Gymnasium, Weißenfels 1990 - 1994
Grundschule	Albert-Einstein POS, Weißenfels 1982 - 1990

Halle/Saale, 23.04.2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meines Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle ist dies mein Betreuer PD Dr. Gerald Schlaf, der durch seine anhaltende Motivation und seine konstruktive Kritik maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenso danke ich dem gesamten Team des HLA-Labors Halle für die Unterstützung bei der Durchführung der Kreuztests, die Überlassung der Daten aus den Routinescreenings sowie die wertvollen Ratschläge bei methodischen Fragen.

Ich danke meinen Eltern und Schwiegereltern, ohne die ich nicht die Zeit für diese Arbeit gefunden hätte.

Danke, Anton, Klara und Henriette, für Euer Verständnis während arbeitsintensiver Phasen.

Sven - danke für alles.

Susanne Apel