

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

Dekan: Prof. Dr. med. Michael Gekle

**Evaluation eines ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens  
zum Nachweis bzw. Ausschluss Spender-spezifischer anti-HLA Antikörper  
unter Verwendung von langfristig asserviertem Spendermaterial**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Karolin Lisa Stöhr

geboren am 03.03.1993 in Ebersdorf/Thür.

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

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Peter Horn, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen
2. PD Dr. med. Dagmar Riemann, Institut für Medizinische Immunologie, Universitätsklinikum Halle/S.
3. PD Dr. rer. nat. rer. medic. habil. Gerald Schlaf; HLA-Labor, Universitätsklinikum Halle/S.

22.08.2018

16.01.2019

## Referat

Antikörper, die gegen HLA-Merkmale eines Spenders gerichtet sind, repräsentieren die Hauptursache für Transplantatabstoßungen. Zum Ausschluss dieser Donorspezifischen Antikörper (DSA) wurde bereits vor 50 Jahren der funktionelle Lymphozytotoxizitätstest (LZT) entwickelt, dessen Validität in höchstem Maße von der Vitalität verfügbarer Spenderlymphozyten abhängt. Als Zellpellet gekühlt gelagertes oder längerfristig eingefrorenes asserviertes Spendermaterial konnte bisher folglich nicht verwendet werden, um einen realen (*de facto*-) Kreuztest zum Nachweis von DSA als Rejektionsursache zu erstellen. Rejektionen können grundsätzlich aber auch chronisch, d.h. erst Jahre nach einer Transplantation, auftreten. Zum Nachweis bzw. Ausschluss von DSA gegen Spendermaterial (d.h. zur Durchführung eines *de facto*-Kreuztestes) wurde deshalb ein alternatives ELISA-basierendes Kreuztestverfahren unter Verwendung von asservierten Milz- oder Blutleukozytenpellets bzw. deren Lysaten verwendet. Auf diese Weise präpariertes Spendermaterial konnte in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt werden, um im Falle einer Rejektion auch Jahre nach einer Transplantation als Spendermaterial für einen realen Kreuztest Verwendung zu finden.

33 Seren von herz- und lungentransplantierten Patienten wurden retrospektiv unter Verwendung des Kreuztest-ELISA auf das Vorkommen von DSA untersucht. Aus dem Vergleich mit den korrespondierenden virtuellen Kreuztestergebnissen, d.h. dem Abgleich aus Antikörperspezifitäten der Empfänger mit den typisierten Merkmalen der Spender, wurde die Validität der erhaltenen *de facto*-Kreuztestergebnisse bestätigt.

Basierend auf ausgewählten Kasuistiken wurde zusätzlich die diagnostische Verwendbarkeit tiefgefrorenen Spendermaterials aufgezeigt. In diesem Kontext wurden drei Kombinationen aus asservierten Spenderlysaten und den jeweiligen Empfängerseren von Transplantierten mit klinisch manifesten Abstoßungsreaktionen unter Verwendung des ELISA-Kreuztestes auf eine Beteiligung von DSA untersucht. In allen Fällen führte der Kreuztest-ELISA in exakter Übereinstimmung mit den virtuellen Kreuztestergebnissen zu einem Nachweis bzw. Ausschluss von DSA als Ursache der klinisch manifesten Rejektionsepisoden. Dieser diagnostische Ansatz gelang selbst unter Verwendung von mehr als vier Jahre gelagertem Donormaterial. Die im Zuge der Dissertation untersuchten Fälle zeigen in der gesamten Historie der Transplantationsdiagnostik erstmalig einen methodischen Weg auf, auch langjährig asserviertes Spendermaterial für einen Kreuztest in der Posttransplantations-Rejektionsdiagnostik zu verwenden und sich nicht allein auf den virtuellen Kreuztest beschränken zu müssen.

Stöhr, Karolin Lisa: Evaluation eines ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens zum Nachweis bzw. Ausschluss Spender-spezifischer anti-HLA Antikörper unter Verwendung von langfristig asserviertem Spendermaterial, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 73 Seiten, 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Major Histocompatibility Complex - Das Humane Leukozyten-Antigen-System und seine Bedeutung .....	1
1.1.1 Genetische Organisation des Haupthistokompatibilitätskomplexes .....	3
1.1.2 Struktur und Funktion der HLA-Klasse I- und II-Moleküle .....	6
1.2 Bedeutung des HLA-Systems in der Transplantationsimmunologie .....	7
1.3 Ursachen, Entstehung und klinische Manifestation von anti-HLA Antikörpern.... .....	10
1.3.1 Sensibilisierung und PRA.....	10
1.3.2 <i>De novo</i> -Bildung von Donor-spezifischen Antikörpern (DSA) .....	12
1.4 Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs.....	13
1.5 Darstellung verschiedener Nachweisverfahren zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper .....	14
1.5.1 Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (LZT) bzw. Complement-Dependent Lymphocytotoxicity CrossMatch (CDC-CM).....	14
1.5.2 Durchflusszytometrischer Kreuztest (FACS-CM).....	15
1.5.3 ELISA-basierende Kreuztestverfahren .....	15
1.5.4 Virtueller Kreuztest.....	16
1.5.5 Anti-HLA Antikörper-Detektions- bzw. Screeningmethoden .....	17
<b>2 Zielstellung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>3 Material und Methodik</b> .....	<b>20</b>
3.1 Geräte.....	20
3.2 Lösungen und Puffer.....	20
3.3 Bestandteile des AbCross HLA-ELISA Komplettsystems .....	21
3.4 Patientenseren.....	22

3.5	HLA AbCross-ELISA als Festphasen-basierender Kreuztest zum Ausschluss Spender (Donor)-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA) .....	22
3.5.1	Zellisolierung aus dem Spendergewebe .....	22
3.5.2	Gewinnung der HLA-Antigene.....	23
3.5.3	Funktionsprinzip des ELISA-basierenden Kreuztestes (AbCross-ELISA) nach dem Schema eines Sandwich-Immunoassays .....	24
3.5.4	Durchführung des AbCross-ELISA.....	24
3.6	Komplement-abhängiger Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (CDC-CM / LZT) .....	28
3.6.1	Aufbereitung des Spendermaterials .....	28
3.6.2	Methodik des Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitätstests..... (CDC-CM/LZT) .....	29
3.6.3	Durchführung des Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitätstests..... (CDC-CM/LZT) .....	30
3.7	Virtueller Kreuztest.....	32
3.8	QUIKSCREEN® (anti-HLA Klasse I) und B-SCREEN® (anti-HLA Klasse II) ELISA als anti-HLA Antikörper-Screeningmethode .....	32
3.9	Luminex™ -Technologie zur anti-HLA Antikörper-Spezifizierung .....	33
3.10	Serologische Typisierung (Phänotypisierung) der HLA-Klasse I Merkmale .....	34
3.11	Niedrigauflösende Genotypisierung der HLA-Klasse I und Klasse II Allele.....	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1	Gegenüberstellung der HLA-Typisierungsdaten und resultierende Bestimmung der HLA-Kompatibilitäten von 33 Empfängern der Organe Herz oder Lunge mit ihren korrespondierenden post-mortem Spendern aus Transplantationen, vorgenommen am Herzzentrum Leipzig zwischen 12/2014 und 10/2016.....	36
4.2	Daten des ELISA-basierenden Kreuztestes zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA) im Vergleich mit ihrem virtuellen Nachweis.....	40
4.3	Kasuistiken zur Durchführung des Kreuztest-ELISA unter Verwendung asservierten Donormaterials mit dem Ziel, eine Beteiligung Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper nachzuweisen bzw. auszuschließen.....	43
4.3.1	Kasuistik 1: Nachweis Donor-spezifischer anti-HLA-Klasse I Antikörper unter Verwendung von Spenderleukozyten aus der Spendermilz, die über fünf Monate tiefgefroren aufbewahrt worden war, zur Diagnose einer Abstoßungsepisode einer 42-jährigen Lungen-transplantierten Patientin.....	43

4.3.2	Kasuistik 2: Die Untersuchung der Rejektionsepisode eines 48-jährigen Patienten durch Nutzung des über vier Jahre asservierten Donormaterials zur Abklärung einer möglichen Beteiligung von DSA .....	46
4.3.3	Kasuistik 3: Identifizierung Allel-spezifischer Antikörper, die über den virtuellen Kreuztest im niedrig-auflösenden (zweistelligen) Typisierungsbereich nicht erkennbar sind, als Donor-spezifisch .....	48
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>53</b>
5.1	Allokationskriterien für Transplantationen der Organe <i>Herz</i> und <i>Lunge</i> erfordern eine besondere spenderorientierte Rejektionsdiagnostik .....	53
5.2	Vergleich des Kreuztest-ELISA mit dem als Standardverfahren festgelegten Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (CDC-CM) für verschiedene Patientengruppen.....	55
5.3	Verwendung des ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens für die Durchführung eines <i>de facto</i> -Kreuztestes zur Detektion von Donor-spezifischen Antikörpern nach <i>post-mortem</i> Organspenden.....	58
5.4	Konklusion und Ausblick .....	61
5.5	Limitationen der Arbeit .....	62
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>65</b>
	<b>Thesen</b> .....	<b>73</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>X</b>
	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche</b> .....	<b>XI</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>XII</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>XIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APC	antigenpräsentierende Zelle
CAV	Cardiac Allograft Vasculopathy, Herztransplantat-Vaskulopathie
CD	Cluster of Differentiation
CDC (LZT)	Complement Dependent Lymphocytotoxicity Assay, Komplement-abhängiger Lymphozytotoxizitätstest
DSA	Donor-spezifische Antikörper
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
kDa	Atomare Masseneinheit Kilodalton
LZT (CDC)	Lymphozytotoxizitätstest
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	MHC-Class-I-Related-Chain
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NIH	National Institute of Health
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PRA	Panel-reaktive Antikörper
RA	Rheumatoide Arthritis
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
RiLiBÄK	Richtlinien der Bundesärztekammer
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SSP-PCR	Sequence-specific-Primer-Polymerasekettenreaktion
TMB	Tetramethylbenzidin
U/min	Umdrehungen/Minute

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Lokalisation der Genregion des Haupthistokompatibilitätskomplexes auf dem humanen Chromosom 6.....	5
Abbildung 2: Schematische Struktur eines MHC-Klasse I Moleküls.....	6
Abbildung 3: Schematische Struktur eines MHC-Klasse II Moleküls.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Kreuztest-ELISA. ....	25
Abbildung 5: Lysatkontrolle des Kreuztest-ELISA (Positivkontrolle).....	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung des CDC-CM. ....	30

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte .....	20
Tabelle 2: Lösungen und Puffer.....	20
Tabelle 3: AbCross HLA-ELISA.....	21
Tabelle 4: Pipettierschema; Schritt 1: Auftragung der Spender-Antigene im Donorlysat .....	26
Tabelle 5: Pipettierschema; Schritt 2: Zugabe des Empfängerserums.....	26
Tabelle 6: Pipettierschema; Schritt 3: Zugabe des anti-human IgG Sekundärantikörpers .....	27
Tabelle 7: Pipettierschema; Schritt 4: Substratzugabe .....	27
Tabelle 8: Pipettierschema, Schritt 5: Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure .....	28
Tabelle 9: Pipettierschema Lymphozyten-Selektion für Dichtegradientenzentrifugation .....	29
Tabelle 10: Pipettierschema, Schritt 1: Auftragen des Empfängerserums und der Kontrollansätze auf die MP .....	30
Tabelle 11: Pipettierschema, Schritt 2: Zugabe der Spenderlymphozyten (PBL, T- und B-Lymphozyten).....	31
Tabelle 12: Pipettierschema, Schritt 3: Komplementzugabe.....	31
Tabelle 13: Pipettierschema, Schritt 4: Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe .....	31
Tabelle 14: Auswertung der Fluoreszenzdoppelfärbung unter Verwendung des NIH- Scores (Reaktionsscore des National Institutes of Health, USA) .....	32
Tabelle 15: Vergleich der HLA-Typisierungsdaten von 33 Herz- und Lungen- post- mortem Organspendern und ihren Empfängern, vorgenommen am Herzzentrum Leipzig von 12/2014 bis 10/2016, und Ableitung der korrespondierenden HLA-A-B-DR Mismatch-Formeln .....	36
Tabelle 16: Verteilung der den HLA-Mismatch-Formeln entnommenen summierten individuellen HLA-Inkompatibilitäten unter den Spender / Empfängerkombinationen der Herz- und Lungentransplantationen (n=33) und in Abhängigkeit von der Inkompatibilität der HLA-Merkmale abgeleitete dreistufige Klassifizierung der Transplantationen .....	39
Tabelle 17: Nachweis bzw. Spezifizierung allogener und Donor-spezifischer anti-HLA- Antikörper .....	42
Tabelle 18: HLA-Typisierung der Patientin .....	43
Tabelle 19: HLA-Typisierung des Spenders .....	44
Tabelle 20: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Luminex-basierenden anti-HLA Antikörper Spezifizierung und der Ergebnisse des Kreuztest-ELISA unter Hervorhebung nachgewiesener DSA und positiver Kreuztestergebnisse ..	45



Tabelle 21: HLA-Typisierung des Patienten .....	46
Tabelle 22: HLA-Typisierung des Spenders .....	46
Tabelle 23: Ergebnisse der verwendeten Methoden zur Antikörper-Detektion.....	47
Tabelle 24: HLA-Typisierung des Patienten aus dem Jahr 1998 (gering auflösend) ....	48
Tabelle 25: HLA-Typisierung des Spenders aus dem Jahr 1998 (gering auflösend)....	49
Tabelle 26: Vergleich der Typisierungsdaten des Patienten mit dem Ergebnis seiner Antikörperspezifitäten im Jahr 2006 .....	49
Tabelle 27: HLA-Typisierung (gering auflösend) des abgelehnten Nierenspenders (2009) .....	50
Tabelle 28: HLA-Typisierungsergebnisse des Patienten, seines ersten Nierenspenders aus dem Jahr 1998 und des abgelehnten Nierentransplantats aus dem Jahr 2006. Angabe detektierter HLA-spezifischer Antikörper und historischer CDC-CM -basierender Kreuztestergebnisse .....	51
Tabelle 29: Ergebnisse des ELISA-CM unter Verwendung von drei Serumabnahmen	52

# 1 Einleitung

## 1.1 Major Histocompatibility Complex - Das Humane Leukozyten-Antigen-System und seine Bedeutung

„Transplantationen sind ein wesentlicher Fortschritt der Wissenschaft im Dienst am Menschen, und viele von uns verdanken ihr Leben heute einer Organverpflanzung.“

Papst Johannes Paul II. (Ansprache an den internationalen Kongress für Organverpflanzung am 29. August 2000, Kongresspalast Rom).

Ein neues Organ - das ist die Hoffnung vieler Patienten auf den Organwartelisten weltweit. Ist ein passendes Spenderorgan gefunden, so ist die Freude unbeschreiblich groß. Doch die Angst eines jeden Transplantierten, das sehnsüchtig erwartete Organ könnte durch das Immunsystem des Körpers abgestoßen werden, schließlich zum Verlust des Transplantates und zur erneuten Aufnahme auf die Warteliste führen, ist groß. Die Wissenschaft nahm diese Thematik zum Anlass, Abstoßungsursachen und Mechanismen aufzudecken, um Immunreaktionen abzuschwächen, das Überleben transplantierte Organe generell zu verlängern und somit die Transplantationsergebnisse zu verbessern. Dank zahlreicher wissenschaftlicher Erkenntnisse konnte die Organtransplantation bis heute als allgemein anerkannte Therapie etabliert werden. Wie aus dem oben genannten Zitat ersichtlich ist, misst für beide christlichen Weltkonfessionen Papst Johannes Paul II. als Repräsentant der Katholischen Kirche der Organspende eine besondere Wertschätzung bei, indem für Erkrankte, die jeglicher Hoffnung beraubt wurden, in der Transplantation eine Möglichkeit der Lebenserhaltung besteht.

Die initialen Untersuchungen von Organ- bzw. Gewebetransplantationen und die beobachteten resultierenden Abstoßungen gingen mit der Entdeckung der Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. **Major Histocompatibility Complex, MHC**), beim Menschen als **Humane Leukozyten Antigene (HLA-Merkmale)** bezeichnet, einher. Jean Dausset wies 1958 im Serum polytransfundierter Patienten erstmals einen Antikörper gegen ein unbekanntes Antigen nach, der in der Lage war, Leukozyten zu agglutinieren. Er benannte dieses erste Leukozytenantigen als „MAC“, ein Begriff, den er aus den Initialen M, A und C zur Ehre drei seiner wichtigsten Studienteilnehmer prägte. Der heute gültigen Nomenklatur entsprechend handelte es sich um das Merkmal bzw. Antigen HLA-A2. Dausset schuf somit die Basis zur systematischen Erforschung des humanen HLA-Systems, wofür er im Jahr 1980 den Nobelpreis erhielt (Dausset, 1958; Dausset et al., 1970). Die Arbeitsgruppe von van Rood ergänzte bereits 1963 in einer Studie die seinerzeit als 4a und 4b bezeichneten Antigene (van Rood et al., 1963). Diese entsprachen den heute als HLA-Bw4 bzw. HLA-Bw6 bekannten Epitopen, die als zusätzlicher Polymorphismus in der einen oder anderen dieser beiden Varianten mit allen Merkmalen des Genortes HLA-B assoziiert sind und folglich

keine eigenen HLA-Merkmale repräsentieren. Zahlreiche weitere Wissenschaftler wie Ekkehard Albert (D), Richard Batchelor (UK), Ruggero Ceppellini (I), Paul Engelfriet (NL), Wolfgang Mayr (A), Flemming Kissmeyer-Nielsen (DK), Bernard Amos (USA), Paul Terasaki (USA) u.a. identifizierten in dieser „Jugendzeit des HLA-Systems“ weitere HLA-Antigene. Schließlich wurde der IHWS *International Histocompatibility Workshop* von Bernard Amos gegründet, der im Juni 1964 zum ersten Mal in den USA tagte. Dieses Forschungsgremium machte es sich zur Aufgabe, die Komplexität des HLA-Systems zu lösen und Erkenntnisse aus der Forschung für seine Anwendung in der klinischen Medizin zu gewinnen. Bereits in den frühen 1980er Jahren konnten die Wissenschaftler die chromosomale Region des HLA-Systems auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisieren. Zusätzlich war bereits bekannt, dass die HLA Klasse I Merkmale A, B und C (u.a.) durch sechs verschiedene hochpolymorphe DNA-Bereiche kodiert werden, dass diese Merkmale auf allen kernhaltigen Zellen, die Klasse II Merkmale DR, DQ und DP hingegen vorwiegend auf antikörperpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Aufgrund des rasanten Fortschritts molekulargenetischer HLA-Typisierungsverfahren seit der Entdeckung der ersten HLA-Antigene war es möglich, dass bis heute bereits 17.695 verschiedene HLA-Allele molekulargenetisch aufgelöst werden konnten (Thorsby, 2009; IMGT/HLA Database 11.04.2018).

Tatsächlich muss der historisch gewachsene Begriff MHC- (Haupthistokompatibilitätskomplex) für den HLA-Komplex eigentlich als Fehlbenennung betrachtet werden, da die Rolle der HLA Klasse I und HLA Klasse II Moleküle als Gewebeverträglichkeitsmerkmale nur einen Nebeneffekt ihrer nachfolgend aufgeführten immunbiologischen Funktionen darstellt. Begründet durch die Wichtigkeit dieser Moleküle in ihrer Funktion für das angeborene und erworbene Immunsystem wäre der Eigenname **Major Immune Response Complex** (MIRC) eine treffendere Bezeichnung (Thorsby, 2009).

Die **immunbiologische Hauptfunktion** der peptidbindenden und -präsentierenden Glykoproteine besteht in der Aktivierung T-Zell-spezifischer Abwehrmechanismen. Prozessierung und Präsentation von Antigenen sind wesentliche Voraussetzungen der antigenspezifischen T-zellulären Immunantwort. Dabei stellt die vorausgehende sogenannte Prozessierung die Antigenverarbeitung dar, bei der native Proteine intrazellulär in Peptide abgebaut, fest an MHC-Moleküle gebunden und gemeinsam an die Zelloberfläche befördert werden, um dort, als Antigene präsentiert, eine Aktivierung der T-Lymphozyten zu bewirken. MHC-Klasse I Moleküle präsentieren Antigene endogenen Ursprungs auf allen kernhaltigen Zellen an CD8-positive T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen). MHC-Klasse II Moleküle hingegen binden und präsentieren exogene Antigene und werden, konstitutiv nur auf B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (sogenannten professionellen Antigenpräsentierenden Zellen) exprimiert, durch CD4-positive

T-Lymphozyten (T-Helferzellen) erkannt. Im Gegensatz zu Immunglobulinen ist der T-Zell-Rezeptor nicht in der Lage, freie Proteinantigene zu binden. Erst durch die Interaktion des spezifischen T-Zell-Rezeptors mit einem MHC-Peptid-Komplex an der Zelloberfläche wird die T-Zell-vermittelte Immunantwort auf das präsentierte Pathogen initiiert. Das MHC-Molekül, das prozessierte und daran gebundene Peptidantigen sowie der T-Zell-Rezeptor bilden hierbei den sogenannten ternären Komplex, der schließlich die T-zelluläre Antigenerkennung vermittelt (Murphy et al., 2009 a).

### 1.1.1 Genetische Organisation des Haupthistokompatibilitätskomplexes

Im menschlichen Genom liegen die Gene der HLA-Moleküle auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.3) und erstrecken sich über einen DNA-Bereich von 3,6 Mbp. Das nicht kovalent mit der Alpha-Kette assoziierte  $\beta$ 2-Mikroglobulin ist hingegen auf dem Chromosom 15 kodiert. Die komplette HLA-Genregion umfasst über 260 Gene. Bis in die jüngste Zeit wurden noch immer neue Gene innerhalb dieser Genregion und in ihrer unmittelbaren Umgebung identifiziert.

Die sogenannten klassischen (d.h. der Antigenpräsentation dienenden) HLA-Klasse I Moleküle werden durch die dem Telomer zugewandten drei Genorte HLA-A, -B und -C kodiert (Murphy et al., 2009a). Neben diesen drei Genorten, die die serologisch definierten und transplantationsrelevanten HLA-Klasse I Moleküle (HLA-A, HLA-B und HLA-C) kodieren, existieren Genorte sogenannter nicht-klassischer HLA-Klasse I Moleküle (HLA-E, HLA-F, HLA-G; Abbildung 1). Den Genprodukten der wenig polymorphen HLA-E und HLA-G Loci wird ein großes Spektrum an immunsuppressiven Funktionen zugeschrieben. Diese resultieren aus der direkten Hemmung der Effektorzellen oder einer indirekten Vermeidung von Immunantworten durch Interaktionen zwischen den Antigenpräsentierenden Zellen, regulatorischen Zellen und HLA-G. Die  $\alpha$ 1-Domäne des HLA-G Moleküls ist hauptverantwortlich für die direkten inhibitorischen Funktionen, indem sie mit entsprechenden Rezeptoren auf NK-Zellen (KIR2DL4), lymphoiden und monozytischen Zellen (ILT2) sowie auf Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen (ILT4) interagiert. Ein indirekt immunsuppressiver Effekt wird durch HLA-E durch die Interaktion mit dem NKG2A-Rezeptor (CD94), der auf NK-Zellen und T-Lymphozyten exprimiert ist, bewirkt. Im Zusammenhang mit seiner Entdeckung auf extravillösen Trophoblastzellen spielt HLA-G eine entscheidende Rolle für die **maternal-fetale Toleranz** während der Schwangerschaft. Die exprimierten HLA-G Moleküle verhindern in diesem Fall eine Zellyse, die durch deziduale und periphere NK-Zellen sowie antigen-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten induziert würde. Niedrige HLA-G Plasmaspiegel gehen demnach mit Komplikationen während der Schwangerschaft, wie Präeklampsie, spontanen Aborten sowie einem schlechten Outcome bei in vitro-

Fertilisationen einher. Zudem trägt HLA-G aufgrund seiner immuntoleranten Eigenschaften zu einer erhöhten **Akzeptanz von allogenen Transplantaten** bei (Dunker et al., 2008; Lila et al., 2002; Rouass-Freiss et al., 1997). Eine Expression von HLA-G konnte weiterhin auf Zellen diverser maligner Tumore nachgewiesen werden. Das Vorkommen geht in diesem Zusammenhang mit verminderten oder fehlenden NK-Zell- oder T-Zell-vermittelten Immunantworten einher und trägt somit zu einer **verstärkten Tumorneigung und Tumorprogression** bei (Rouass-Freiss et al., 2005). Eine HLA-G Expression ist also assoziiert mit einer malignen Tumortransformation und fehlt in gesundem nicht immunprivilegiertem Gewebe. HLA-G wird in höhergradigen soliden Tumoren fortgeschrittener klinischer Stadien exprimiert. Als prognostischer Marker korreliert eine vermehrte HLA-G Expression bzw. ein erhöhter löslicher HLA-G-Spiegel signifikant mit einer schlechten Prognose. Eine HLA-G Expression auf Tumoren trägt demnach zum sogenannten **Tumor-Escape-Mechanismus**, d.h. zur Ausbildung von tumoreigenen Mechanismen zum Schutz vor dem Immunsystem des „Wirtes“ bei. Das Verständnis eines solchen Mechanismus ist von großer Wichtigkeit, um optimale immuntherapeutische Gegenstrategien zu entwickeln (Rouass-Freiss et al., 2014).

Die HLA-Klasse II Moleküle werden dagegen durch die drei Genorte HLA-DR, -DQ, -DP kodiert, die auf der dem Zentromer zugewandten Seite des HLA-Genabschnitts lokalisiert sind (Abbildung 1). Zwischen den Genorten, die die HLA Klasse I und Klasse II-Moleküle kodieren, liegt ein Abschnitt, der Gene umfasst, die weder der HLA-Klasse I noch der HLA-Klasse II Genregion zugeordnet werden können. Dieser Bereich wird aus historischen Gründen als HLA-Klasse III Genregion bezeichnet. In ihm wurden unter anderem Gene für Zytokine (TNF- $\alpha$ , - $\beta$ ), Komponenten des Komplementsystems (Faktor C2, B, C4), Hitzeschockproteine (HSP-70), Proteasen und Peptidtransportproteine aus der ATP-Superfamilie gefunden. Allerdings liegen in dieser Genregion keine Gene für weitere HLA-Moleküle (Kelley et al., 2005; Trowsdale et al., 1991; Waßmuth, 2005; Murphy et al., 2009 a).

Das Phänomen, dass mehrere Genorte zur Expression von Proteinen analoger Funktionalität existieren, wird auch als **Polygenie** bezeichnet. Diese Polygenie gewährleistet einen gewissen Diversifikationsgrad der HLA-Moleküle innerhalb eines Individuums, um ein breiteres Spektrum pathogener Peptide präsentieren zu können. Die für die Population zu fordernde, funktionelle Vielfalt der Antigenpräsentation ist aber primär dadurch gewährleistet, dass den HLA-Genen einer Population eine große Anzahl individuell verschiedener Allele zugrunde liegt. Diese sogenannten monomorphen Regionen der HLA-Klasse I und II Moleküle weisen demnach prinzipiell eine weitgehende Homologie ihrer DNA- und Proteinsequenzen auf, wohingegen die für die Peptidpräsentation verantwortlichen Regionen/Domänen als hochpolymorphe Bereiche

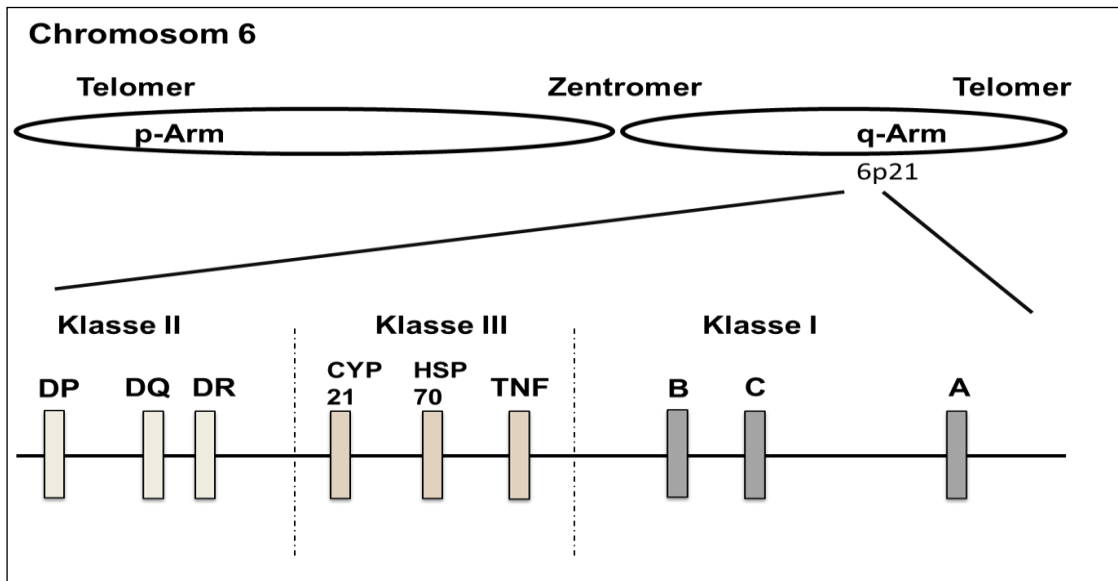


Abbildung 1: Die Lokalisation der Genregion des Haupthistokompatibilitätskomplexes auf dem humanen Chromosom 6

Dargestellt sind die für HLA-Klasse I- und II kodierenden humanen MHC-Gene. Der HLA-Klasse I Genlocus kodiert die  $\alpha$ -Ketten der drei Hauptgene (HLA-A, HLA-B, HLA-C) des MHC-I Proteins (dunkelgrau). Der Klasse II-Genlocus umfasst Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der MHC-II Proteine DR, DQ und DP (hellgrau). Zwischen diesen beiden Loci liegt die HLA-Klasse III Genregion, in der weitere Proteine, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind, kodiert werden, jedoch keine weiteren HLA-Moleküle. [Quelle: (modifiziert nach Murphy et al., 2009)]

ausgeprägte allelische Variabilitäten aufweisen. Dieses Phänomen der individuellen Varianz eines in einer Population bzw. Spezies vorhandenen „Grundgenes“ und seiner resultierenden Merkmale wird als **Polymorphismus (Polyallelie)** bezeichnet. Wie bereits erwähnt ist dieser Polymorphismus bei den HLA-Molekülen fast ausschließlich auf die antigenpräsentierenden Domänen beschränkt.

Die HLA-Merkmale unterliegen dem sogenannten **kodominanten Erbgang**. Im Genom eines Individuums werden somit beide ererbten Allele eines jeden HLA-Genlocus exprimiert. Ein Individuum gilt als heterozygot für ein HLA-Merkmal, wenn es über zwei Allele je Genort verfügt und als homozygot, wenn beide Allele dieses Genortes identisch sind. Die Summe der gekoppelt vererbten Allele sämtlicher Genloci wird als HLA-Haplotyp bezeichnet. Durch die genetische Kodierung auf dem Chromosom 6 als Kopplungsgruppe werden je ein kompletter mütterlicher und ein väterlicher HLA-Haplotyp an die Kinder weitergegeben. Folglich bedeutet dies, dass Eltern und ihre Kinder hinsichtlich ihrer HLA-Merkmale in haploidentischer Beziehung stehen, wenn kein Rekombinationsereignis bei der Vererbung auftritt. Mit mehr als 17.000 verschiedenen Allelen (siehe Kapitel 1.1) weisen die Gene der HLA-Moleküle den höchsten bekannten Polymorphismusgrad auf (Robinson et al., 2013; IMGT/HLA database 11.04.2018).

### 1.1.2 Struktur und Funktion der HLA-Klasse I- und II-Moleküle

Auf der Zellmembran exprimiert stellen sich HLA-Moleküle als hochgradig polymorphe Heterodimere dar. Trotz gewisser struktureller Gemeinsamkeiten unterscheiden sich HLA- Klasse I- und II Moleküle in Aufbau, Gewebeverteilung und Funktion voneinander. Bei den HLA-Klasse I Molekülen handelt es sich um Heterodimere, die aus einer schweren polymorphen  $\alpha$ -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 44 kDa und einer nicht-polymorphen kleinen extrazellulär gelegenen Kette mit einem Molekulargewicht von 11,5 kDa ( $\beta_2$ -Mikroglobulin) bestehen (Abbildung 2). Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist in Abweichung von der  $\alpha$ -Kette (Chromosom 6) beim Menschen auf dem Chromosom 15 kodiert und mit ihr über nicht-kovalente Wechselwirkung assoziiert. Der extrazelluläre Abschnitt der glykosylierten  $\alpha$ -Kette ist aus drei verschiedenen Domänen ( $\alpha 1$ - $\alpha 3$ ) aufgebaut, die zusammen ca. 90 Aminosäuren umfassen. Die hochpolymorphen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen bilden dabei die Antigenbindungsstellen bzw. Präsentationsdomänen für Peptidfragmente mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren. Die  $\alpha 3$ -Domäne ist hingegen konserviert und weist Sequenzhomologien zur konstanten Region der Immunglobulin-Superfamilie auf. Das  $\beta_2$ -Mikroglobulin interagiert hauptsächlich mit der  $\alpha 3$ -Domäne und stabilisiert die für die Peptidpräsentation funktionell wichtige Gesamtkonformation der HLA-Klasse I Moleküle, wodurch eine Peptidpräsentation erst ermöglicht wird. Zur Verankerung des Moleküls in der Zellmembran ist an die  $\alpha 3$ -Domäne eine Transmembranregion gekoppelt, an die sich eine kurze zytoplasmatische Region anschließt (Bjorkman et al., 1987; Murphy et al., 2009 a).

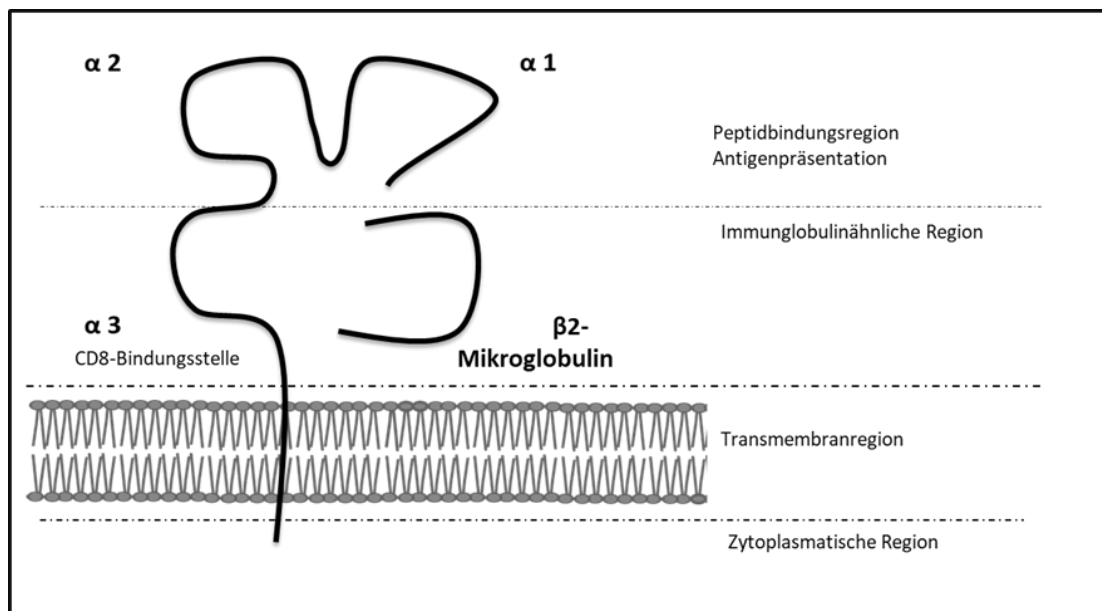


Abbildung 2: **Schematische Struktur eines MHC-Klasse I Moleküls**

Dargestellt ist die  $\alpha$ -Kette mit den hochpolymorphen Domänen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  als Antigenbindungsstelle sowie der monomorphen Domäne  $\alpha 3$ . Die nicht kovalente Verbindung mit dem stets identischen  $\beta_2$ -Mikroglobulin führt zu einer funktionellen Gesamtkonformation des Moleküls. [Quelle: (modifiziert nach Waßmuth, 2005)]

Der Aufbau der HLA-Klasse II Moleküle ähnelt grundsätzlich dem der HLA-Klasse I Moleküle. Sie bestehen ebenfalls aus zwei nicht-kovalent gebundenen Polypeptidketten, namentlich einer  $\alpha$ -Kette mit 33-35 kDa und einer  $\beta$ -Kette mit 26-29 kDa (Abbildung 3). Beide Ketten bestehen jeweils aus zwei Domänen, einer polymorphen Peptidbindungsdomäne ( $\alpha 1$  bzw.  $\beta 1$ ) und einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne ( $\alpha 2$  bzw.  $\beta 2$ ). An diese Domäne schließt sich eine Transmembranregion sowie eine kleine intrazelluläre Zytoplasmaregion an. Anders als beim HLA-Klasse I Molekül ist der sogenannte Peptid-bindende Spalt an den Flanken nicht geschlossen, um größere Peptide von 13-25 Aminosäuren zu binden und den T-Helfer Lymphozyten zu präsentieren (Murphy et al., 2009 a).

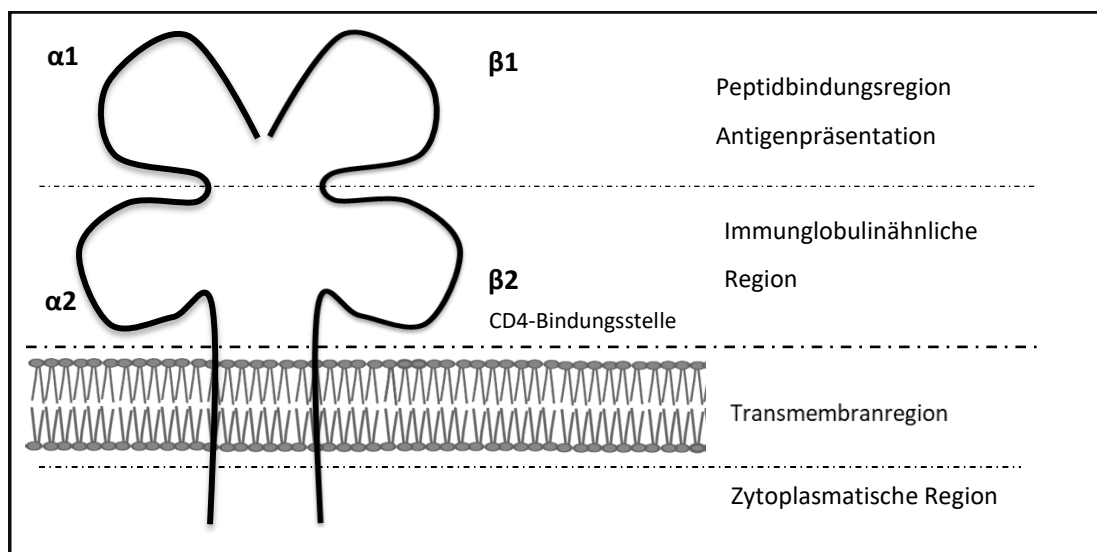


Abbildung 3: **Schematische Struktur eines MHC-Klasse II Moleküls**

Dargestellt sind die  $\alpha$  und  $\beta$  Kette des MHC-Klasse II Moleküls, deren polymorphe Domänen ( $\alpha 1$  und  $\beta 1$ ) die Antigenbindungsstelle bilden und deren monomorphe Domänen ( $\alpha 2$  und  $\beta 2$ ) die für die Peptidpräsentation notwendige Gesamtkonformation herstellen. [Quelle: (modifiziert nach Waßmuth, 2005)]

## 1.2 Bedeutung des HLA-Systems in der Transplantationsimmunologie

Zum Ersatz erkrankter Organe stellt die Transplantation heute eine wichtige Behandlungsmethode dar. In den meisten Fällen zeigen sich adaptive Immunreaktionen gegen das Transplantat als größte Herausforderung für das Überleben des Transplantates. Derartige Abstoßungen/Rejektionen werden durch Immunantworten auf Alloantigene bzw. „Transplantationsantigene“, hervorgerufen. Als Alloantigene werden Antigene bezeichnet, die sich unter den Individuen einer Spezies unterscheiden. Die zentrale Bedeutung der HLA-Moleküle in der Transplantationsimmunologie als Gewebeverträglichkeitsmerkmal zwischen nicht HLA-kompatiblen Individuen beruht darauf, dass insbesondere die auf dem Spendergewebe exprimierten HLA-Moleküle aufgrund



ihrer individuellen Varianz (Polymorphismus) zelluläre und humorale alloreaktive Immunantworten im Transplantatempfänger auslösen können. Die durch die als fremd erkannten HLA-Moleküle induzierten Mechanismen, die zur Abstoßung von Transplantaten führen, stehen allerdings in keinem Zusammenhang mit den physiologisch-immunologischen Funktionen der HLA-Moleküle während der Antigenpräsentation (Murphy et al., 2009 b). Die Erkennung der Alloantigene durch die T-Lymphozyten ist das zentrale Ereignis der Induzierung einer alloreaktiven Immunantwort und kann über verschiedene Mechanismen erreicht werden. Zwei Mechanismen der Antigenerkennung sind in dieser Hinsicht zu unterscheiden. Die **direkte Allogenerkennung** erfolgt durch die im Organtransplantat enthaltenen APC des Spenders, die sogenannten „Passagierleukozyten“. Diese können das Transplantat über die Lymphgefäße verlassen und in die regionalen Lymphknoten des Empfängers einwandern, um dort an die T-Zell-Rezeptoren der zytotoxischen T-Lymphozyten zu binden und diese zu aktivieren. Über die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von allogenen Proteinen durch die APC des Empfängers können die Fremdantigene, an HLA-Moleküle des Empfängers gebunden und den T-Helfer Lymphozyten im Rahmen der **indirekten Allogenerkennung** präsentiert werden. Die direkte Allogenerkennung ist vorwiegend am akuten Abstoßungsprozess beteiligt, während der indirekte Mechanismus zur initialen humoralen Sensibilisierung führt und eher an chronischen Abstoßungsprozessen beteiligt ist (van Bessouw et al., 2005; Murphy et al., 2009, Geneugelijk et al., 2014).

Die drei möglichen Mechanismen dieser gegen HLA-Antigene gerichteten allogenen-humoralen (d.h. Antikörper vermittelten) **AMR (Antibody-Mediated-Rejection)** seien nachfolgend genannt und kurz beschrieben: i) Komplement-Aktivierung, ii) Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (**Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity/ADCC**) sowie iii) die direkte Aktivierung des Endothels durch Antikörper.

**Komplement-Aktivierung:** Sich im Serum befindende Antikörper binden an allogene HLA- und/oder nicht-HLA Angriffsziele, die u.a. auf den Oberflächen der Gefäßendothelzellen des Transplantats exprimiert vorliegen. Folglich induziert der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex die Komplementkaskade über den sogenannten klassischen Aktivierungsweg, wobei final der Membranangriffskomplex (MAC), bestehend aus den Komponenten C5b-C9, entsteht. Dieser bildet Transmembranporen, die eine Zellyse der initial durch die Alloantikörper gebundenen Zelle bewirken. Die sich im Zuge der Aktivierung abspaltenden Komplementkomponenten C3a und C5a wirken ihrer Namensgebung entsprechend als Anaphylatoxine. Sie rekrutieren Entzündungszellen und vermitteln eine Entzündungsreaktion durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Chemotaktisch locken diese kleinen Moleküle neutrophile Granulozyten und Makrophagen an, die zur weiteren Gewebedestruktion beitragen. Der Komple-

ment-vermittelte Mechanismus ist bei Vorliegen von präformierten Alloantikörpern besonders für die als gefährlich geltenden hyperakuten Abstoßungsreaktionen bedeutend, die zu einem sofortigen Transplantatverlust führen können. Zu den effektiven Komplement-aktivierenden Antikörper-Isotypen zählen vor allem IgM-, IgG1- und IgG3-Antikörper.

**Antikörper-abhängige NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC):** Durch ihren Fc-Rezeptor (CD16) sind die Natürlichen Killerzellen in der Lage, Fc-Regionen der Antikörpermoleküle, welche allogene HLA-Antigene der Endotheloberfläche erkannt haben, zu binden. Die Vernetzung der Fc-Rezeptoren der NK-Zellen triggert die Perforin- und Granzym-vermittelte Zytotoxizität und führt zur Lyse der betroffenen Zellen.

**Direkte Endothel-Aktivierung:** Anders als die Aktivierung der Komplementkaskade, die zur Zelllyse und damit zu einem direkten Abbau der Endothelzellen führt, bewirkt die Aktivierung des Endothels eine pathogene Modifikation der Mikrozirkulation. Diesem Mechanismus wird eine größere Bedeutung im Rahmen der Pathogenese chronischer Abstoßungsprozesse beigemessen. Gezeigt werden konnte auch die durch anti-HLA-Antikörper allogene vermittelte Expressierung des fibroblast-growth factor receptors (Harris et al., 1997). Morphologisch manifestiert sich diese in einer endothelialen Aktivierung, die zu einer vermehrten Zellproliferation mit Endothelverdickungen bis hin zu arteriosklerotischen Veränderungen führt (Mehra und Baranwal, 2016).

Die **Immunogenität** der inkompatiblen HLA-Merkmale ist hochvariabel, so dass bestimmte HLA-Inkompatibilitäten zu schweren klinischen B- und T-Zell-vermittelten alloreaktiven Immunantworten führen, während andere besser toleriert werden. Die Forschungsgruppe von Lucas und Mitarbeitern untersuchte 2015 insgesamt 703 Patienten, die vor ihrer Nierentransplantation keine detektierbaren DSA aufwiesen. In ihrer Studie konnte die häufigste Antikörperbildung gegen HLA-DQ Antigene (59%) nachgewiesen werden, dagegen wurde in den wenigsten Fällen (42%) Antikörper gegen Merkmale des Genortes HLA-B gebildet (Lucas et al., 2015). In aktuellen Studien wird die Immunogenität bzw. Antigenität der HLA-Antigene ihren einzelnen Epitopen bzw. Eplets zugeschrieben. Epitope sind definiert als Anteile eines HLA-Moleküls, deren Aminosäure-Sequenzen nicht Bestandteil der Empfänger-HLA-Antigene darstellen und daher vom Immunsystem grundsätzlich als fremd erkannt werden können. HLA-Epitope zeichnen sich durch zwei ausgeprägte Eigenschaften: Antigenität, ihre Fähigkeit mit Antikörpern zu interagieren, und Immunogenität, ihre Fähigkeit Antikörperantworten zu induzieren. Ein Eplet stellt eine durch Antikörper zugängliche Aminosäuresequenzposition dar, die eine Antikörperbindung ermöglicht und schließlich geeignet ist, um die Induktion einer humoralen Immunantwort zu bewirken. Jedes Eplet muss im Kontext mit seinem zugehörigen Epitop betrachtet werden. Die Immunogenität eines

Epitopes wird durch die physiochemischen Eigenschaften seiner Aminosäuren, deren elektrischer Ladung sowie ihrer hydrophoben Eigenschaften bestimmt. Die Identifizierung von Epitopen führt nicht gleichermaßen zur Aufdeckung ihrer Immunogenität. Vielmehr haben multiple Epitope Anteil an der Immunogenität eines Antigens. In der Theorie triggern Aminosäure-Sequenzen eines Spender HLA-Moleküls, die nicht Bestandteil des Empfänger-HLA-Moleküls sind, eine Antikörper-Antwort. Ob ein Epitop tatsächlich eine Antikörper-Antwort auslöst, ist abhängig vom Aufbau des HLA-Moleküls. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Epitop-Mismatchanzahl zwischen Spender und Empfänger mit der Entwicklung von DSA korreliert, wobei bereits einzelne oder wenige Mismatches eine Antikörperantwort induzieren können. Zusammenfassend ist für den individuellen Patienten die Art des Epitop-Mismatches für die Triggerung seiner Immunantwort entscheidend (Duquesnoy, 2014; Kramer et al., 2017).

### 1.3 Ursachen, Entstehung und klinische Manifestation von anti-HLA Antikörpern

#### 1.3.1 Sensibilisierung und PRA

Die Sensibilisierung entspricht der Bildung von anti-HLA Antikörpern nach Kontakt mit dem Immunsystem unbekanntem HLA-Antigenen und erfolgt vorrangig über drei Hauptwege: **Bluttransfusionen**, **Schwangerschaften** und zurückliegende **Organ- bzw. Gewebetransplantationen**. Da bei den genannten Ereignissen Antikörper gegen fremde HLA-Moleküle von Individuen derselben Spezies gebildet werden, bezeichnet man diese auch als Alloimmunisierung. In Demografien der Transplantationslisten werden die Zusammenhänge von Übertragungseignissen nicht-eigener HLA-Moleküle und dem Aufkommen von anti-HLA Antikörpern deutlich. Daten zufolge, die in Großbritannien von Fuggle und Martin (2008) erhoben worden sind, zeigten, dass 23% der Patienten, die auf eine Spenderniere warteten, bereits gegen fremde HLA-Antigene sensibilisiert waren. Hierbei war auffällig, dass sehr viel häufiger Frauen als Männer (33% vs. 17%) anti-HLA Antikörper bildeten, was auf Sensibilisierungen durch vorangegangene Schwangerschaften zurückgeführt wurde. Rezipienten, die bereits transplantiert worden waren, zeigten sich erwartungsgemäß als erheblich häufiger immunisiert als Patienten auf der Warteliste für ihr erstes Transplantat (52% vs. 15%). **Transfusionen** gelten als ein Hauptimmunisierungsweg, da durch kontaminierende Leukozyten in Erythrozytenkonzentraten eine Bildung von Antikörpern gegen HLA-Klasse I Moleküle stattfinden kann. Ein Sensibilisierungsrisiko durch Erythrozyten wird grundsätzlich unterschätzt, da auch diese entgegen der allgemeinen Erwartung geringe Mengen an HLA-Klasse I-Molekülen (100-2000/Zelle) auf ihrer Oberfläche tra-

gen (Scornik et al., 2011). Schon Anfang der 1990er Jahre konnte in Studien bewiesen werden, dass nicht allein die Präsenz, sondern insbesondere die Menge der Leukozyten im Blutpräparat die Immunisierung beeinflusst (van Marwijk-Kooy et al., 1991). Für zelluläre Blutprodukte wurde in Deutschland deshalb im Jahr 2001 die obligatorische Leukozytendepletion eingeführt. Seitdem dürfen nur Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate mit einem Leukozytenanteil von weniger als  $1 \times 10^6$  pro Einheit (Blutkonserve) transfundiert werden. Die Nutzung leukozytendepletierter Blutprodukte führte in der Tat zu einer enormen Reduktion der HLA-Alloimmunisierung (Paul Ehrlich Institut, 2000).

Ungeachtet dessen können HLA-spezifische Antikörper auch bei Patienten detektiert werden, die keiner dieser Sensibilisierungswege ausgesetzt waren. Es handelt sich hierbei vielfach um Antikörper des Immunglobulinisotyps IgM, die nicht persistieren. Spekuliert wird, dass diesen idiopathischen Antikörpern eine Kreuzreaktivität mit infektiösen Agenzien, Mikroorganismen und Allergenen zu Grunde liegt. Größere inflammatorische Ereignisse wie Operationen und Traumata sind aus selbigem Grund ebenso mit dem Aufkommen von anti-HLA-Antikörpern assoziiert (Fuggle und Martin, 2008; Morales-Buenrostro et al., 2008; Locke et al., 2009).

Im Rahmen des dritten Hauptimmunisierungsweges, der **Schwangerschaft und Entbindung**, können fetale Zellen in den maternalen Kreislauf gelangen. Aufgrund des kodominanten Vererbungsmechanismus sind die HLA-Antigene zur Hälfte paternalen Herkunft, was schließlich zur Bildung von Alloantikörpern führen kann. In einer Studie ermittelten Densmore et al. im Jahr 1999 bei Blutspenderinnen, bei denen andere Immunisierungswege als die Schwangerschaft ausgeschlossen werden konnten, eine HLA-Immunisierungsrate von 17%. Die Immunisierungsrate korrelierte erwartungsgemäß mit der Anzahl der Schwangerschaften, so dass Spenderinnen mit drei und mehr Schwangerschaften mit 26,3% die höchste HLA-Immunisierungsrate aufwiesen. Eine 2008 durch Powers und Mitarbeiter durchgeführte Studie ergab für Spenderinnen, die anamnestisch Schwangerschaften sowie Transfusionen angaben, eine ähnliche HLA-Immunisierungsrate von 25% (Densmore et al., 1999; Powers et al., 2008).

Bildet eine Organempfängerin **nach einer Transplantation** im Zuge einer nachfolgenden Schwangerschaft *de novo* anti-HLA-Antikörper, die auch gegen die Antigene des Transplantates gerichtet sind, so birgt dies die Gefahr einer Abstoßungsreaktion und einer Verkürzung des Organüberlebens.

Der Grad der anti-HLA-Immunisierung eines Patienten kann mithilfe der **PRA** als Prozentwert **Panel-reaktiver Antikörper (%PRA)** angegeben werden. Der PRA-Wert gibt die individuelle Wahrscheinlichkeit für ein positives Kreuztestergebnis an und ermöglicht die sofortige Identifizierung hochimmunisierter Patienten. Je höher der PRA-

Wert ist, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten von DSA und desto höher die Gefahr, dass ein angebotenes Spenderorgan abgestoßen wird. Eine gründliche Antikörperdiagnostik zur Identifizierung der Antikörperspezifitäten ist gerade für Patienten mit einem hohen PRA-Wert wichtig, um genau die Antigene, gegen die bereits eine Sensibilisierung vorliegt, als HLA-Merkmale eines Organangebotes von vornherein auszuschließen. Der PRA-Wert wird in der Regel unter Verwendung der Luminex™-Festphasen Technologie (siehe 3.9) ermittelt.

### 1.3.2 *De novo*-Bildung von Donor-spezifischen Antikörpern (DSA)

Weil auch das Auftreten von *de novo* gebildeten DSA mit einem schlechten Transplantatüberleben nach Herztransplantationen korreliert, ist es wichtig, die Unterschiede der Entwicklung und Detektion von prä-existenten (präformierten) und *de novo* gebildeten Antikörpern zu verstehen. Die Neubildung von Antikörpern nach einer Transplantation wird durch zwei Mechanismen ausgelöst. Hat einerseits bereits ein Erstkontakt mit einem Antigen stattgefunden, können bei erneutem Kontakt Gedächtniszellen aktiviert werden, wobei die Re-Exposition zum Wiedererkennen des Antigens durch das Immunsystem und schließlich zu einer starken Immunantwort mit rascher Antikörperproduktion in der frühen Posttransplantationsepisode führt. Anders kann ein Transplantatempfänger neue DSA auch zeitverzögert, d.h. gegebenenfalls erst Jahre nach dem Transplantaterhalt ohne Einbeziehung des immunologischen Gedächtnisses generieren. Um *de novo* gebildete DSA zu diagnostizieren, sollte auch nach einer Transplantation ein regelmäßiges Antikörperscreening stattfinden. Aktuell sind in diesem Zusammenhang insbesondere gegen HLA-Klasse II-Antigene gerichtete anti-HLA-DQ Antikörper von Interesse. Diesen wird in Studien eine lange Persistenz, eine starke Korrelation mit schlechtem Langzeitüberleben nach Herz-Transplantationen, eine Ursächlichkeit für häufigere Herztransplantat-Vaskulopathien (CAV) und hohe Beteiligung an chronische Rejektionsepisoden zugeschrieben (Gilbert und Chang, 2017; Omrani et al., 2018).

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass auch **Nicht-HLA Antikörper** als Ursache Antikörper-vermittelter Abstoßungsreaktionen in Betracht kommen, wenn ein Nachweis von anti-HLA-Antikörpern nicht möglich ist. Andere polymorphe und deshalb alloimmunogene Antigene stellen ebenso Angriffspunkte humoraler Immunantworten dar. Dies sind insbesondere die **MHC-Klasse I Chain-Related Proteine A and B (MICA und MICB)**, gegen die in Analogie zu den HLA-Merkmalen häufig abstoßungsrelevante Antikörper gebildet werden. Ihr Aufkommen in Seren nieren- und herztransplantierte Patienten ist mit chronischen Rejektionsepisoden und einer Verkürzung des Transplantatüberlebens assoziiert (Zou et al., 2007; Zhang et al., 2011).

Auch weitere Oberflächenmoleküle der Endothelzellen dienen den sogenannten **Nicht-HLA Antikörpern** als Zielstrukturen, wie beispielsweise der Neuropilin-Corezeptor des **Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (VEGFR)**, das ribosomale Protein L7 sowie der Angiotensin- und Endothelin-Rezeptor. Auch das Aufkommen von Nicht-HLA Antikörpern korreliert bei der Mehrheit der herztransplantierten Patienten mit chronischen Abstoßungsreaktionen und der Entstehung einer CAV (Valenzuela und Reed, 2013; Sigdel und Sarwal, 2013).

#### 1.4 Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs

Das klinische Transplantationsergebnis ist abhängig von immunologischen sowie nicht-immunologischen Faktoren. Immunologische Reaktionen können im zeitlichen Verlauf zu hyperakuten, akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen führen. Ereignet sich eine Transplantatabstoßung unmittelbar, d.h. innerhalb von Minuten bis maximal 48 Stunden nach Organimplantation, so wird diese als **hyperakut** definiert. Dieser rasante Vorgang wird durch ABO-Blutgruppen-spezifische Antikörper sowie präformierte anti-HLA-Antikörper (siehe Kapitel 1.2 und 1.3) initiiert. Ihre Bindung an die Endothelzellen bewirkt die Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung, die Freisetzung von extrazellulären Matrixbestandteilen und eine nachfolgende Aktivierung der Gerinnungskaskade. Die darauffolgende Thrombosierung des Gefäßsystems stört die Transplantatdurchblutung nachhaltig, so dass es zur Entstehung infarzierter Organanteile mit anschließendem Verlust der Organfunktion kommt (Crudele et al., 2011; Becker et al., 2016).

**Akute** Abstoßungsreaktionen sind durch ihr zeitliches Auftreten von 10-14 Tagen nach erfolgter Transplantation gekennzeichnet. Zell-vermittelte sowie humorale d.h. Antikörper-vermittelte Prozesse werden bei der akuten Abstoßung als gleichermaßen beteiligt angesehen (siehe Kapitel 1.2). Sánchez und Strom zeigten in einer Studie, dass 20-40% der transplantierten Patienten im ersten postoperativen Jahr klinische Zeichen einer T-Zell-vermittelten Rejektionsepisode zeigen (Sánchez und Strom, 2011). Durch den diagnostischen Ausschluss präformierter Donor-spezifischer Antikörper und den prophylaktischen Einsatz moderner immunsuppressiver Pharmazeutika gelingt es weitgehend, möglichen Komplikationen, die durch (hyper-)akute Rejektionsepisoden hervorgerufen werden, bereits präventiv vorzubeugen. Dagegen stellt das Langzeit-Transplantatüberleben weiterhin das Hauptproblem der Herztransplantationen dar.

Die **chronische** Abstoßungsreaktion, dominierend für einen Transplantatverlust nach einer Herztransplantation, kann sich Monate bis Jahrzehnte nach einer Transplantation entwickeln und ist durch multiple pathogene Mechanismen begründet. Die chronische Rejektion entwickelt sich fortschreitend als Herztransplantat-Vaskulopathie (**Cardiac Allograft Vasculopathy, CAV**). Diese manifestiert sich ab dem 6.

postoperativen Monat, so dass 90% der herztransplantierten Patienten in den folgenden zehn Jahren betroffen sind. Charakteristisch für die CAV ist eine konzentrische Vaskulopathie mit Verdickung der Gefäßintima, der Degeneration der glatten Muskelzellen sowie Proliferation der extrazellulären Matrix mit nachfolgender Fibrose und Lymphozyten-infiltration der Adventitia. Diese histologischen Veränderungen stellen das Resultat immunologischer sowie nicht-immunologischer Faktoren dar. Die immunologischen Mechanismen sind sowohl als zellulär als auch als humoral, d.h. Antikörper-vermittelt (siehe Kapitel 1.2) zu klassifizieren, wobei sie die Schlüsselrolle in der Pathogenese der CAV spielen. Ischämiezeit, Reperfusionstörungen, hypertensive Erkrankungen, Malignome, Infektionen, Spenderalter sowie Transplantatgröße sind als nicht-immunologische Faktoren zu nennen (Crudele et al., 2011).

## **1.5 Darstellung verschiedener Nachweisverfahren zur Detektion Donorspezifischer anti-HLA Antikörper**

### **1.5.1 Komplementabhängiger Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (LZT) bzw. Complement-Dependent Lymphocytotoxicity CrossMatch (CDC-CM)**

Das Deutsche Transplantationsgesetz (§16) legt als wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation ein negatives Ergebnis der sogenannten Verträglichkeitsprobe bzw. des Kreuztests (**CrossMatch/CM**), d.h. die Nicht-Nachweisbarkeit Spender-spezifischer Antikörper fest. Durch Eurotransplant und in den Richtlinien der Bundesärztekammer seit Dezember 2010 niedergelegt, gilt der sogenannte komplementabhängige Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (CDC-CM/LZT) als obligatorisch festgelegtes Standardverfahren, das bereits in den späten 1960er Jahren von Paul Terasaki entwickelt wurde (Patel und Terasaki, 1969). Bei diesem Test handelt es sich um den funktionellen Nachweis von HLA-Antikörpern im Serum eines prospektiven Rezipienten gegen HLA-Merkmale auf isolierten Lymphozyten seines vorgesehenen Spenders. Der CDC-CM wird durchgeführt, indem zuerst Spenderlymphozyten isoliert und diese anschließend mit dem Rezipientenserum inkubiert werden, damit gegebenenfalls vorhandene Spender-/Donor-spezifische anti-HLA Antikörper (DSA) an die HLA-Antigene, die auf den Spenderzellen exprimiert sind, binden können. Durch die Zugabe von Kaninchenkomplement erfolgt die Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen Weg. Dieser Vorgang führt dazu, dass die durch Spender-spezifische Antikörper gebundenen Zellen lysiert werden. Eine nachfolgende Differentialfärbung mit Ethidiumbromid führt zur Rotfärbung letaler Zellen (positive Reaktion), wobei nicht durch DSA erkannte Lymphozyten durch die aktive Aufnahme des Vitalfarbstoffs Acridinorange grün angefärbt werden (negative Reaktion). Prinzip und Durchführung

sowie die Limitierungen des CDC-CM werden in den Kapiteln 3.6 und 5.2 detailliert dargestellt.

### **1.5.2 Durchflusszytometrischer Kreuztest (FACS-CM)**

Ein durchflusszytometrischer Kreuztest (*Fluorescence-Activated Cell Sorter-Crossmatch*, FACS-CM) wurde als optisches Messverfahren initial von Garovoy und seinen Mitarbeitern 1983 als Alternative zur Standardmethode LZT entwickelt, um einige der Probleme, die der LZT/CDC-CM mit sich brachte, zu umgehen (Garovoy et al., 1983). Auch hier binden im ersten Schritt DSA aus dem Rezipientenserum an HLA-Antigene der Spenderlymphozyten. Die Detektion der DSA erfolgt anschließend über eine indirekte Fluoreszenzmarkierung mithilfe monoklonaler oder polyklonaler anti-human-Immunglobulin Sekundärantikörper. Sowohl komplementaktivierende als auch nicht-komplementfixierende Antikörper sind durch den FACS-CM nachweisbar. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass auch nicht gegen HLA-Antigene gerichtete Antikörper über ihren Fc-Teil an die Fc-Rezeptoren bevorzugt der Donor-B-Lymphozyten binden und zu falsch-positiven Kreuztestergebnissen führen (Altermann et al., 2006; Schlaf et al., 2014b). Zur Verbesserung der Ergebnisse behandelte man schließlich die B-Lymphozyten mit dem aus dem Überstand von *Streptomyces griseus* gewonnenen Enzymgemisch *Pronase*, welches zum Verdau der Fc-Rezeptoren auf den Zelloberflächen führen sollte, um die „unspezifischen“ Bindungen zu reduzieren bzw. zu vermeiden (Lobo et al., 2002). Ein durchgängiger und eindeutiger Erfolg stellte sich allerdings nicht ein, war doch *Pronase* bereits theoretisch dafür bekannt, als komplexes Gemisch aus Endo- und Exopeptidasen zu einem vollständigen Abbau in einzelne Aminosäuren zu führen. Erst die Nutzung Hitze-denaturierten Kaninchensersums durch Hajeer und Mitarbeiter führte dazu, dass die Testspezifität durch die Blockade der Fc-Rezeptoren verbessert werden konnte und der FACS-CM auch ohne zweifelhaft enzymatische Behandlungen plausible Ergebnisse lieferte (Hajeer et al., 2009). In kompletter Übereinstimmung mit dem CDC-CM gilt für den FACS-Kreuztest allerdings ausnahmslos, dass sämtliche Ergebnisse stark von der Vitalität der Spenderlymphozyten abhängig sind.

### **1.5.3 ELISA-basierende Kreuztestverfahren**

Um einen direkten Nachweis von DSA unter Vermeidung der oben für den CDC- und den FACS-Kreuztest aufgeführten Nachteile zu erbringen, wurde der ELISA-basierende Kreuztest entwickelt. Das in der vorliegenden Arbeit teilweise verwendete, bis August 2014 kommerziell erhältliche Festphasen-basierende Verfahren AMS-Klasse I/II ELISA (GTI/Immucor, Waukesha, USA) und insbesondere sein Nachfolgesystem AbCross HLA Klasse I/II ELISA (Biorad, Dreieich, Deutschland) soll



im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen. Das Prinzip und die Durchführung des Verfahrens werden in Kapitel 3.5 detailliert dargestellt. Charakteristisch für diesen Assay ist die Nutzung der an monoklonalen Fangantikörpern immobilisierten HLA-Spendermoleküle zur Detektion von DSA im nachfolgend inkubierten Rezipientenserum. Folglich ist auch der Nachweis seltener Donor-spezifischer Antikörperspezifitäten möglich, die über einen virtuellen Kreuztest aufgrund des grundsätzlich eingeschränkten Antigenspektrums vielfach nicht bestimmt werden können. Jeder Spezifizierungs-Assay ist grundsätzlich nicht in der Lage, den vollständigen Umfang auch der seltenen HLA-Antigene abzudecken (Schlaf et al., 2014b).

Eine zusätzliche Überlegenheit kommt dem ELISA-Kreuztestverfahren aufgrund seiner Unabhängigkeit von der Vitalität der Donorlymphozyten zu. Folglich kann zur Durchführung ein Spender-Zellpellet oder dessen Lysat verwendet werden, welches unter komplettem Vitalitätsverlust der Zellen über einen langen Zeitraum gelagert worden ist. Die Tatsache, dass das ELISA-basierende Kreuztestverfahren sensitiver als der CDC-CM und weniger anfällig für Störfaktoren als dieser ist, war bereits Gegenstand verschiedener Untersuchungen und gilt heutzutage als anerkannt (Slavcev, 2003; Altermann et al., 2006; Schlaf et al., 2010; 2012a; 2013; 2014a; 2014b; 2015; 2016; Tait, 2016). Insbesondere diese Aspekte sollen in der Diskussion der vorliegenden Arbeit ausführlich behandelt werden (siehe Kapitel 5).

#### **1.5.4 Virtueller Kreuztest**

Zur Durchführung eines virtuellen Kreuztests werden Empfängerserumproben auf anti-HLA Klasse I und II Antikörper untersucht (Antikörperspezifizierung). Die identifizierten Antikörperspezifitäten werden daraufhin mit den typisierten HLA-Merkmalen bzw. Allelen der Spender verglichen (virtuelle Verträglichkeitsprobe).

Für die anti-HLA Antikörperspezifizierung stellt die **Luminex-Technik** die derzeit weltweit bevorzugte Methode dar (siehe Kapitel 3.9). Das Verfahren beruht auf der Verwendung von Mikropartikeln (Beads), die mit den verschiedenen HLA-Klasse I oder II Molekülen jeweils eines Spenders (Single Donor Auflösung) oder mit Einzelantigenen (Single Antigen Auflösung) beladen sind. Derzeit gilt diese Technik als sensitivste Methode der anti-HLA-Antikörperbestimmung (Schlaf et al., 2014b; Tait, 2016), und in Abweichung vom CDC-CM können mittels Luminex-Analyse auch nicht-komplementfixierende DSA sowie sehr niedrige Antikörpertiter detektiert werden. In den vergangenen Jahren wurden Studien mit dem Ergebnis publiziert, dass der Nachweis von anti-HLA-Antikörpern im Luminex Assay keine Korrelation auf das Transplantatüberleben ergab. Vermutet wurde, dass zum einen die Konzentration der durch diese hochsensitive Methode nachgewiesenen *virtuellen* DSA generell zu gering war, um schädigende Wirkungen auf das Transplantat auszuüben (Billen et al., 2009;

Süsal et al., 2011). Zum anderen wurden insbesondere unter Verwendung der Systeme mit der Single Antigen Auflösung Antikörper detektiert, die lediglich gegen rekombinante Antigene gerichtet waren aber keine nativen HLA-Antigene erkannten. Diese als solche bezeichneten *Natural Antibodies* finden seither als ernstzunehmendes Artefakt der Detektion in der Luminex-Single Antigen Analyse Berücksichtigung. Es stellte sich heraus, dass diese falsch positiv detektierten Antikörper initial gegen bakterielle Epitope gerichtet sind (Morales-Buenrostro et al., 2008). Damit stellen nicht rekombinant hergestellte, d.h. isolierte native HLA-Antigene, die dem gleichen Phänotypen zuzuordnen sind, kein Angriffsziel dar (Schlaf et al., 2014b).

### **1.5.5 Anti-HLA Antikörper-Detektions- bzw. Screeningmethoden**

Antikörper-Screenverfahren dienen als Detektionsverfahren einzig dem qualitativen Nachweis von anti-HLA Antikörpern. Sie sind allerdings nicht in der Lage, die einzelnen Antikörper-Spezifitäten zu bestimmen. Die Testsysteme umfassen jeweils fast das gesamte Spektrum der Klasse I bzw. Klasse II- Antigene in immobilisierter Form und erbringen, für beide HLA-Klassen unabhängig, eine „ja/nein-Antwort“ auf die Frage nach dem Vorhandensein von Antikörpern im Rezipientenserum. Auf ein initiales positives Testergebnis in einem Antikörper-Screenassay muss sinngemäß eine Spezifizierung der detektierten Antikörper mit einem i.d.R. Luminex-basierenden Spezifizierungs- bzw. Differenzierungsassay erfolgen.

## 2 Zielstellung der Arbeit

Donor-spezifische anti-HLA Antikörper (DSA) stellen die Hauptursache für Abstoßungsreaktionen dar. Ihr Nachweis im Empfängerserum gilt als Kontraindikation für eine geplante Transplantation. In den Richtlinien der Bundesärztekammer (RiliBÄK) ist daher die Durchführung eines lymphozytären Kreuztestes zum Ausschluss zytotoxischer Antikörper vorgeschrieben. Das durch Eurotransplant und die RiliBÄK seit 2010 obligatorisch festgelegte Standardverfahren ist trotz zunehmend publizierter Nachteile der komplementabhängige Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (LZT), der bereits in den 1960er Jahren entwickelt wurde. Die Validität dieses Tests ist in höchstem Maße abhängig von der Vitalität der Spenderzellen, diese wiederum von der Lagerzeit der Blut- bzw. Milzgewebeprobe eines Organspenders. Spendermaterial, das älter als zwei bis drei Tage ist, führt bei Durchführung des LZT in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen somit zwangsläufig nicht zu auswertbaren Ergebnissen.

Obwohl im Vorfeld der Transplantation eines jeden soliden Organs entsprechend den Richtlinien von Eurotransplant und den RiliBÄK die immunologischen Parameter i) AB0-Blutgruppen-Kompatibilität, ii) HLA-Typisierung und iii) Antikörperstatus des Empfängerserums erhoben werden, erfolgt die Organzuteilung von Herz- und Lungentransplantaten unabhängig von der HLA-Kompatibilität, d.h. in erheblicher Abweichung von den Allokationskriterien des Organs Niere, bei dem eine Berücksichtigung der HLA-Kompatibilität obligatorisch ist. Zusätzlich stellen nachgewiesene DSA im Unterschied zu Nierentransplantationen keine absolute Kontraindikation gegen den Erhalt eines Herz- bzw. Lungentransplantates dar, wenn diese virtuell, d.h. durch den Vergleich der Antikörperspezifitäten der Empfänger mit den HLA-Merkmalen der Spender diagnostiziert werden. Dies hat zur Folge, dass Organe in der Regel mit einer geringen HLA-Kompatibilität transplantiert werden, so dass sich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von DSA erhöht. Da Abstoßungsepisoden nach Transplantationen in der Regel nicht nur akut, sondern auch chronisch, das heißt u. U. erst nach vielen Jahren auftreten können, ist ein regelmäßiges Posttransplantations-Antikörpermonitoring sowie die sichere Diagnostik zum Nachweis/Ausschluss von DSA für die Rezipienten dieser Organe von höchster Priorität.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit liegt zum einen darin, den ELISA-basierenden Kreuztest mit den Proben von insgesamt 33 herz- und lungentransplantierten Patienten des Herzzentrums Leipzig auf seine Routinetauglichkeit und Ergebnisvalidität durch den Vergleich mit dem virtuellen Kreuztestergebnis zu untersuchen. Verwendet wurde als Donormaterial in diesem Zusammenhang in den meisten Fällen ein Segment der entnommenen Spendermilz, in wenigen Fällen Citratblut. Dieses Material, zur Verfügung gestellt vom Herzzentrum Leipzig und vielfach nicht gekühlt gelagert, traf im

HLA-Labor nicht vor dem dritten Posttransplantationstag ein, so dass ein valider Kreuztest unter Verwendung des LZT-Verfahrens grundsätzlich nicht möglich war, um zum Zeitpunkt der Transplantation gegebenenfalls vorhandene DSA zuverlässig nachzuweisen.

Zum anderen sollte unter Verwendung von teilweise mehrjährig eingelagertem Spendermaterial aus drei Spender-Empfänger Konstellationen, d.h. anhand ausgewählter Kasuistiken, untersucht werden, dass auch langfristig eingelagertes nicht vitales Spendermaterial grundsätzlich verwendet werden kann, um aufkommende DSA gegen ein beliebiges Transplantat eines *post mortem* Spenders auch Jahre nach einer Transplantation unabhängig vom Parameter „Zellvitalität“ zuverlässig zu detektieren. Damit böte das **ELISA-basierende Kreuztestverfahren** erstmalig die methodische Grundlage, um im Falle von Rejektionsepisoden in der Post-Transplantationsdiagnostik einen aussagekräftigeren *de facto* Kreuztest durchzuführen und auf diese Weise zu einer validen individualisierten Rejektionsdiagnostik beizutragen.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

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

#### 3.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Lösungen und Puffer

1xPBS LifeTechnologies Gibco, Carlsbad, USA	140 mmol/l NaCl 10 mmol/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10H <sub>2</sub> O 2,7 mmol/l KCl 1,8 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10xRCLP Red Cell Lysis Puffer	155 mmol/l NH <sub>4</sub> Cl 10 mmol/l KHCO <sub>3</sub> 0,1 mmol/l EDTA
Fluoro-Quench™ (BmT GmbH Labor-Produkte, Meerbusch-Osterath, Deutschland)	Rinderhämoglobin EDTA Ethidiumbromid Acridinorange
RosetteSep™ Cell Separation System (Stem Cell Technologies Inc., St. Katharinen, 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, für den Lymphozytotoxizitätstest (CDC-CM) (BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland)	
anti-HLA Positivkontrollserum für den Lymphozytotoxizitätstest (CDC-CM) (BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland)	
anti-HLA Negativkontrollserum für den Lymphozytotoxizitätstest (CDC-CM) (BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland)	

### 3.3 Bestandteile des AbCross HLA-ELISA Komplettsystems

Tabelle 3: AbCross HLA-ELISA  
(Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich, D)

Komponente	Abkürzung	Inhalt
Abcross HLA Reagents	MP	Mikrotestplatte (60 Kavitäten), zur Hälfte jeweils beschichtet mit: 30 x monoklonalem Fang-AK gegen HLA-Klasse-I-Ag 30 x monoklonalem Fang-AK gegen HLA-Klasse-II-Ag
	CONJ	anti-IgG-Konjugat Konzentrat (200x) mit Peroxidase markierter monoklonaler anti-human-IgG-Sekundärantikörper
	CONJDL	Verdünnungspuffer für den Sekundärantikörper Konservierungsmittel: 0,025% Penicillin V; 0,025% Streptomycinsulfat; 0,2% Proclin-300
	DIL	allgemeiner Verdünnungspuffer für Proben und Antikörper Konservierungsmittel: 0,01% Neomycinsulfat; 0,03% Chloramphenicol
	SUB	Substratlösung 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung <0,05% in H <sub>2</sub> O
	LYS	Lysepuffer zur Lösung der HLA-Moleküle in ihrer nativen Konformation aus der Lymphozytenmembran, enthält das nicht ionische Detergenz Octoxinol 9 (Triton- X100)
	STOP	Stopplösung Schwefelsäure <1N
	WB	PBS <0,05% Polysorbat 20; pH 7,4
Abcross HLA Control	PC-I	monoklonaler Positivkontroll-AK zur Detektion von HLA-Klasse-I Moleküle (anti-β2-Mikroglobulin)
	PC-II	monoklonaler Positivkontroll-AK zur Detektion von HLA-Klasse-II Molekülen
	NC	Negativkontrollserum aus Probanden, bei denen keine Immunisierung gegen HLA-Antigene vorliegt

### **3.4 Patientenseren**

Die Durchführung des ELISA basierenden Kreuztests zum Ausschluss Spender-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA) findet im HLA-Labor Halle vielfach bei Patienten des Herzzentrums Leipzig Anwendung. In diesem Zusammenhang werden für sämtliche der durchgeführten Herz- und Lungentransplantationen unmittelbar nach diesen ELISA-basierende Kreuztest Assays durchgeführt, die den zum Zeitpunkt der Transplantation existierenden Status Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper retrospektiv (d.h. 2-4 Tage nach der Transplantation) aufzeigen. Zusätzlich findet der Kreuztest-ELISA im Rahmen der Diagnostik von Abstoßungsreaktionen nach Herz- und Lungentransplantationen Anwendung, da eine *de novo* Bildung von anti-HLA Antikörpern unter Verwendung dieses Testsystems unmittelbar gegen asserviertes Spendermaterial nachgewiesen werden kann. Im Zeitraum von Dezember 2014 bis Oktober 2016 wurden in diesem Kontext für die vorliegende Arbeit 33 Empfängerseren unmittelbar nach der Transplantation untersucht.

### **3.5 HLA AbCross-ELISA als Festphasen-basierender Kreuztest zum Ausschluss Spender (Donor)-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA)**

#### **3.5.1 Zellisolierung aus dem Spendergewebe**

Zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper im Rezipientenserum werden als Spendermaterial Leukozyten (für die Extraktion von HLA-Klasse II Molekülen Lymphozyten) eines Organspenders, auf welchen die HLA-Moleküle exprimiert sind, benötigt. Die Spenderleukozyten werden vorzugsweise aus der zur Verfügung gestellten Milz, alternativ aus dem Vollblut des Spenders gewonnen.

Die Aufbereitung des Spendermaterials aus der Milz beginnt mit der Zerkleinerung eines etwa 2 x 3 cm großen Gewebestücks mit einem Skalpell in einer Petrischale. Milzgewebe verfügt im Vergleich zu Vollblut über einen größeren Anteil an B-Lymphozyten (B-Zell Areale), so dass aus der Milz grundsätzlich ein größerer Anteil an HLA-Klasse II tragenden Zellen gewonnen werden kann. Dagegen beträgt der Anteil an B-Lymphozyten im peripheren Blut nur 3-7 % der Gesamtleukozyten. Die Verwendung von aus Vollblut gewonnenen Leukozyten zur Extraktion von HLA-Klasse II Antigenen gestaltet sich demnach bei einem Spender mit einem geringen Anteil an B-Zellen schwierig. Gegebenenfalls muss hier der Umweg über eine Anreicherung der Lymphozyten über einen Saccharosedichtegradienten gewählt werden. Um ausreichend HLA Klasse I- und II- Moleküle vom Spender zu erhalten werden etwa 10 ml peripheres antikoaguliertes Vollblut benötigt.

Entsprechend des Firmenprotokolls sollte diese Lymphozytenpräparation mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation gelingen, so können die Lymphozyten von anderen

Zellen und Bestandteilen des Blutes wie Erythrozyten und polymorphkernigen Granulozyten isoliert werden, da sie die Eigenschaft einer geringeren Dichte auszeichnet. Antikoaguliertes Vollblut wird zunächst mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt und mittels Lymphoprep™-Gradienten (Dichte 1,077 g/cm<sup>3</sup>) in seine Bestandteile getrennt. Nach einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 2300 U/min trennen sich Lymphozyten von Erythrozyten und Granulozyten. Die Lymphozyten werden aus der Interphase abpipettiert. Nach Zugabe von 10ml PBS wird die Zellsuspension für 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Das gereinigte Lymphozytenpellet wird zur Zellzahl-Bestimmung in 1 ml PBS aufgenommen. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Milliliter sind notwendig um mittels Abcross ELISA anti-HLA-Klasse I bzw. 2 x 10<sup>7</sup> Zellen pro Milliliter um anti-HLA-Klasse II Antikörper nachzuweisen.

Im HLA-Labor wurde die Lymphozytenpräparation modifiziert, indem aus den Vollblutpräparationen nur die Erythrozyten mit hypotonem *Red-Cell-Lysis-Puffer* (RCLB) depletiert werden. Alle anderen Zellen werden als Gesamtleukozyten pelletiert und anschließend zur Freisetzung der nativen HLA-Antigene mit dem im Komplettsystem bereitgestellten Lysepuffer (LYS) aufgeschlossen. Diese Modifikation weist den grundsätzlichen Vorteil auf, dass unter Auslassung des Saccharosedichtegradienten zur Gewinnung der Lymphozyten mindestens 5-fach mehr Zellmaterial zur Verfügung steht.

Durch Zugabe von 40 ml des hypotonen RCLB zu 10ml Spendervollblut werden die sich darin befindenden Erythrozyten hypoosmotisch zerstört. Der Ansatz wird zur Pelletierung der Leukozyten für 5 Minuten bei 3.000 U/min zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das erhaltene Pellet wird erneut in 50 ml RCLB resuspendiert. Unter gleichen Bedingungen erfolgt eine zweite Lyse mit anschließender Zentrifugation. Das Pellet wird in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zuletzt erfolgt mit einer Zentrifugation von 7.000 U/min über 5 Minuten die finale Sedimentation der Lymphozyten.

### **3.5.2 Gewinnung der HLA-Antigene**

Nach Isolierung der Lymphozyten erfolgt die Solubilisierung der HLA-Moleküle aus der Zellmembran. Hierfür wird das Leukozyten-Pellet mit etwa dem 4-fachen Volumen an Lysepuffer (LYS) versetzt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Durch Zentrifugation (10 Minuten bei der maximalen Umdrehungszahl von 13.200 U/min) sedimentiert der Zelldebris, der vor allem aus Membranfragmenten und unlysierten Organellen besteht. Die aus der Zellmembran gelösten HLA-Moleküle befinden sich im proteinhaltigen Überstand. In dieser aufbereiteten Form kann das Spendermaterial bei Temperaturen <-28°C eingefroren und für eine spätere diagnostische Verwendung als



Spendermaterial aufbewahrt werden. Zur Verwendung im AbCross-ELISA wird das Lysat 1:5 mit Verdünnungspuffer (DIL) versetzt.

### **3.5.3 Funktionsprinzip des ELISA-basierenden Kreuztestes (AbCross-ELISA) nach dem Schema eines Sandwich-Immunoassays**

Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Durchführung retrospektiv nach Herz- und Lungentransplantationen. Das Ziel des AbCross HLA-Klasse I/II ELISA ist die Detektion Spender-spezifischer anti-HLA-Antikörper im Empfängerserum. Die Gewinnung der benötigten Donor-Lymphozyten erfolgt wie oben dargestellt aus Milz oder Vollblut. Die HLA-Antigene werden mittels Lysepuffer aus den isolierten Donor-Leukozyten, auf denen sie exprimiert sind, gelöst. Sowohl als tiefgefrorenes Zellpellet als auch im Lysepuffer extrahiert können sie als Spenderantigene für spätere diagnostische Zwecke tiefgefroren gelagert werden. Die durch Zellisolierung und Lyse extrahierten nativen HLA-Antigene aus dem Zell- oder Gewebelysat des Donors werden von immobilisierten und gegen monomorphe Epitope der HLA-Klasse-I bzw. HLA-Klasse-II-Moleküle gerichteten Fangantikörpern gebunden. Nicht gebundene Proteine werden in einem Waschschrift entfernt. Bei Vorhandensein von gegen HLA-Moleküle gerichteten Antikörpern im Rezipientenserum, sogenannten Donor-spezifischen Antikörpern (DSA), den Detektionsantikörpern dieses Sandwich-Assays, binden diese im nachfolgenden Schritt an die über Fangantikörper immobilisierten HLA-Antigene des Spenders. Schließlich folgt eine Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten monoklonalen anti-human-IgG Sekundärantikörper. Der Substratzusatz [3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung] bewirkt eine Farbreaktion, deren Intensität photometrisch gemessen wird.

### **3.5.4 Durchführung des AbCross-ELISA**

Auf jeder HLA-Mikrotestplatte befinden sich sechs Kavitätenreihen. Somit ist die parallele Bearbeitung von drei Patientenseren in jeweils doppelten Ansätzen möglich. Das Empfängerserum wird in zwei Verdünnungsstufen (1:3 und 1:6 mit DIL) untersucht. Zusätzlich werden parallel die Positiv- und Negativkontrollen zur Festlegung des Mindestwertes für eine positive Empfängerreaktion und zur Feststellung der grundsätzlichen Validität des Assays pipettiert (Abbildung 5).

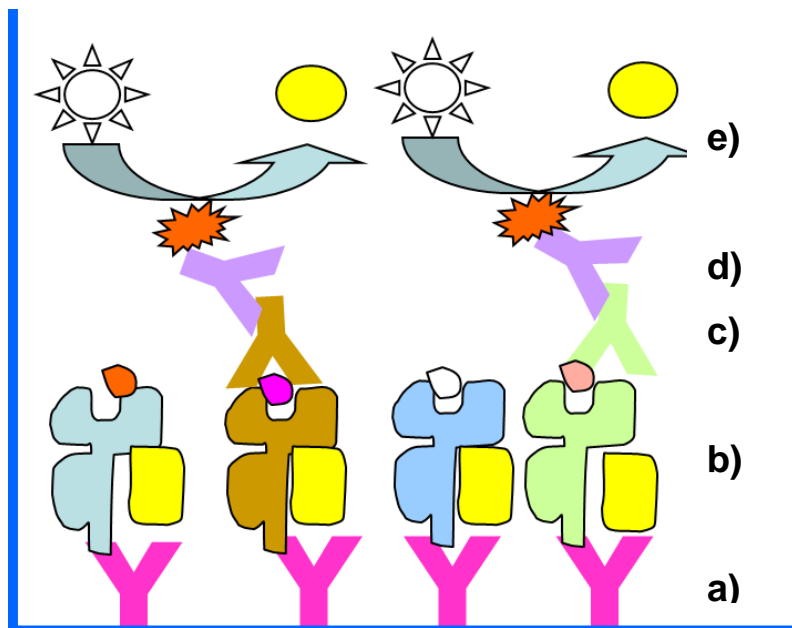


Abbildung 4: **Schematische Darstellung des Kreuztest-ELISA**

a) anti-HLA Klasse I-mAK, gegen monomorphes Epitop gerichtet b) HLA Klasse I-Antigene aus lysiertem Donormaterial c) Donor-spezifischer anti-HLA Klasse I-Antikörper der Rezipienten d) Enzym-konjugierter anti-human IgG/mAK (violett) e) Substrat [Quelle: (Vortrag Stöhr, 2015)]

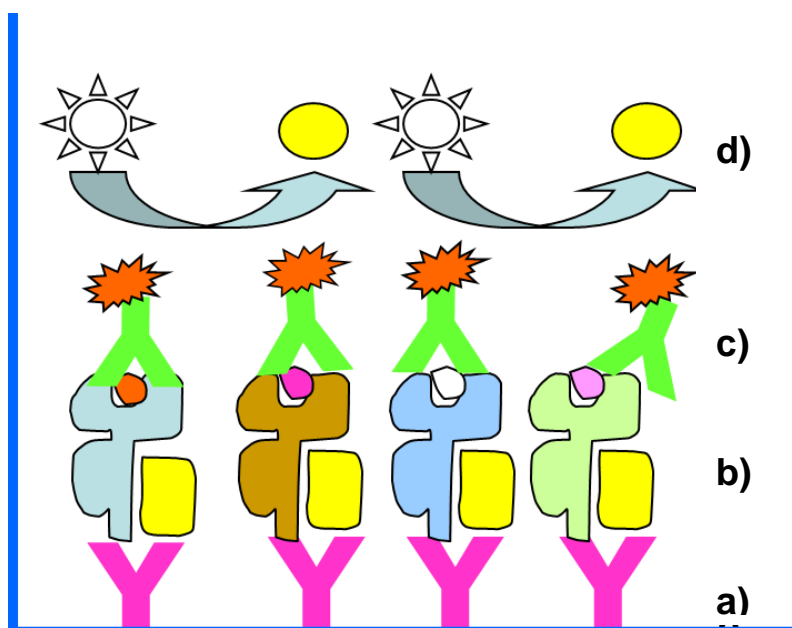


Abbildung 5: **Lysatkontrolle des Kreuztest-ELISA (Positivkontrolle)**

Substratreaktion mit signifikanter Extinktion nur bei ausreichendem Donormaterial (lysierte HLA Moleküle) a) anti-HLA Klasse I-mAK, gegen ein monomorphes Epitop gerichtet b) HLA Klasse I-Antigene aus lysiertem Donormaterial c) **Lysatkontrolle**, Enzym-konjugierter mAK, gegen ein monomorphes Epitop gerichtet, d) Substrat [Quelle: (Vortrag Stöhr, 2015)]

Im ersten Schritt werden je 10µl des verdünnten Spenderlysats in die Kavitäten der mit den Fangantikörpern belegten Abcross HLA-Mikrotestplatte (MP)/Terasakiplatte

pipettiert (Abbildung 4, Schritt **b**). Die Kavitäten für den Leerwert bleiben bei diesem Schritt ausgespart, diese werden nur mit Verdünnungspuffer (DIL) belegt. Nun erfolgt eine erste Inkubation für 30 Minuten bei 37°C, um die Bindung der HLA-Klasse I oder II Moleküle aus dem Spendermaterial an die jeweiligen Fangantikörper zu bewirken.

Tabelle 4: Pipettierschema; Schritt 1: Auftragung der Spender-Antigene im Donorlysat

	A	B	
1	Lysat 1:5	Lysat 1:5	HLA-Klasse I
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
7	Lysat 1:5	Lysat 1:5	
8	Lysat 1:5	Lysat 1:5	
9	Lysat 1:5	Lysat 1:5	
10	DIL	DIL	

Im Anschluss an die erste Inkubation erfolgt eine dreimalige Waschung der MP mit Waschpuffer (WB). Dazu wird die Platte mit Waschpuffer geflutet, geschwenkt und ausgeklopft. Zurückbleibende Tropfen in den Kavitäten werden am Ende der letzten Waschung herauspipettiert. Im nächsten Schritt werden (immer in Doppelansätzen) je 10µl 1:3 und 1:6 mit DIL verdünnte Empfängerseren (Abbildung 4, Schritt **c**) sowie je 10µl der Positiv- und Negativkontrollseren aufgetragen. Die Leerwertkavitäten werden mit je 10 µl DIL gefüllt. In der nachfolgenden Inkubation binden nun gegebenenfalls im Empfängerserum vorliegende DSA an die immobilisierten HLA-Moleküle des Spenders auf der Mikrottestplatte.

Tabelle 5: Pipettierschema; Schritt 2: Zugabe des Empfängerserums

	A	B	
1	PC I 1:6	PC I 1:6	HLA-Klasse I
2	NC 1:6	NC 1:6	
3	Empfänger 1:3	Empfänger 1:3	
4	Empfänger 1:6	Empfänger 1:6	
5	DIL	DIL	
6	PCII 1:6	PCII 1:6	HLA-Klasse II
7	NC 1:6	NC 1:6	
8	Empfänger 1:3	Empfänger 1:3	
9	Empfänger 1:6	Empfänger 1:6	
10	DIL	DIL	

Nicht gebundene Serumbestandteile werden in erneuten drei Waschschrritten mittels Waschpuffer entfernt. Im nächsten Schritt werden in jede Kavität 10µl des mit

Peroxidase markierten anti-human IgG-Antikörpers (Sekundärantikörper) pipettiert (Abbildung 4, Schritt **d**), nachdem dieser 1:600 mit dem Konjugatverdünnungspuffer (CONJDIL) verdünnt wurde. In Übereinstimmung mit dem vorhergehenden Schritt werden auch hier in die Leerwertkavitäten 10 µl DIL pipettiert. Es schließt sich erneut eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C an. Die Inkubation des Sekundärantikörpers wird durch fünf aufeinander folgende Waschschrte abgeschlossen.

Tabelle 6: Pipettierschema; Schritt 3: Zugabe des anti-human IgG Sekundärantikörpers

	A	B	
1	CONJ 1:600	CONJ 1:600	HLA-Klasse I
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
7	CONJ 1:600	CONJ 1:600	
8	CONJ 1:600	CONJ 1:600	
9	CONJ 1:600	CONJ 1:600	
10	DIL	DIL	

Nach Zugabe von 5µl des Substrats 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in jede Kavität (Abbildung 4, Schritt **e**), bewirkt die gebundene Peroxidase eine enzymatische Reaktion zum blau gefärbten 3,3'5,5'-Tetramethylbenzidin-Radikalkation.

Tabelle 7: Pipettierschema; Schritt 4: Substratzugabe

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

Die Reaktion wird nach etwa 10-minütiger Inkubation ohne Lichteinfall durch Zugabe von 5µl Schwefelsäure (STOP) abgestoppt.

Bei dem gelb gefärbten Produkt der sauren Stoppreaktion handelt es sich um 3,3'5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diamoniumion. In einem speziellen Spektralphotometer zur Aufnahme und Vermessung der Mikrottestplatten (Terasakiplatten) wird dessen Absorption bei 450nm gegen eine Referenzlängenwelle von 620nm gemessen.

Donor-spezifische anti-HLA Antikörper im Empfängerserum, nachgewiesen als sogenannte Detektionsantikörper im vorliegenden ELISA eines sogenannten „Sandwich-Designs“, gelten dann als detektiert, wenn der **Extinktionswert** der Empfängerseren **mindestens doppelt so hoch ist wie der Wert der Negativkontrollseren**.

Tabelle 8: Pipettierschema, Schritt 5: Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure

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

### 3.6 Komplement-abhängiger Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (CDC-CM / LZT)

Im Deutschen Transplantationsgesetz (§16), umgesetzt durch die Richtlinien der Bundesärztekammer, ist seit Dezember 2010 ein lymphozytärer Kreuztest zum Ausschluss zytotoxischer Donor-spezifischer Antikörper vorgeschrieben. Als Standardverfahren zur Detektion von Donor-spezifischen HLA-Antikörpern wurde somit das Verfahren des **Complement-Dependent-Cytotoxicity CrossMatch (CDC-CM)**, in der deutschen Sprache als Lymphozytotoxizitätstestes (LZT) bezeichnet, als obligatorisches Verfahren definiert. Hiermit wird der potentielle Empfänger vor einer Organtransplantation auf Antikörper HLA-Merkmale/Antigene des Donors untersucht, um die Gefahr hyperakuter oder akuter Abstoßungen zu minimieren.

#### 3.6.1 Aufbereitung des Spendermaterials

Zur Durchführung des CDC-CM werden Spenderlymphozyten aus nicht koaguliertem Vollblut extrahiert. Aus Gründen ausreichender Zellvitalität sollte die Blutabnahme nicht länger als 50 Stunden zurückliegen. Um die Lymphozyten zu isolieren wird die Vollblutprobe mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt und mit sogenanntem Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies, St. Katharinen, Deutschland) versetzt. Dieser enthält tetramere Antikörper, die eine negative Selektion bewirken, indem sie die jeweils unerwünschten Zellen mit Erythrozyten vernetzen. Je nach Zugabe von Total Lymphocyte-, T-Cell- oder B-Cell Enrichment Cocktail können die entsprechenden Lymphozyten selektiv gewonnen werden. Im Anschluss an die Inkubation mit dem jeweiligen Enrichment Cocktail erfolgt für 20 min eine Dichtegradientenzentrifugation über einen

Lymphoprep™-Gradienten. Die jeweils gewünschten Donorlymphozyten sammeln sich aufgrund ihrer geringeren Dichte in der Interphase des Lymphoprep™-Kissens an, während die nicht gewünschten Zellen mit den Erythrozyten vernetzt werden und als sogenannte Erythrozytenrosetten das Lymphoprep™-Kissen durchstoßen und den Bodensatz des Zentrifugenröhrchens bilden. Die zu gewinnenden Lymphozyten der Interphase werden abpipettiert, in ein Glasröhrchen übernommen und mit PBS zur Entfernung des längerfristig zelltoxischen Lymphoprep™-Saccharosematerials gewaschen. Nach einer finalen Zentrifugation bei 900 U/min für 10 min werden die sedimentierten Lymphozyten auf eine Zellzahl von 2000/µl eingestellt.

Tabelle 9: Pipettierschema Lymphozyten-Selektion für Dichtegradientenzentrifugation

Zellpopulation	Vol. (1:2)	Citratblut:PBS	RosetteSep™ Cell Komponente/40ml	Preparation	System-
<b>PBL</b>		1ml		Total Lymphocyte Enrichment Cocktail	
<b>T-Lymphozyten</b>		1ml		T-Cell Enrichment Cocktail	
<b>B-Lymphozyten</b>		2ml		B-Cell Enrichment Cocktail	

### 3.6.2 Methodik des Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitätstests (CDC-CM/LZT)

Anders als beim Kreuztest-ELISA werden der Namensgebung entsprechend nur das Komplementsystem aktivierende Donor-spezifische Antikörper im Empfängerserum nachgewiesen. Spenderlymphozyten werden initial mit dem Empfängerserum für 30 min. inkubiert, so dass nachzuweisende DSA an korrespondierende HLA-Antigene auf der Zelloberfläche der Spenderlymphozyten binden. Fügt man im nächsten Schritt aus Kaninchenserum angereicherte Komplementkomponenten hinzu, wird das Komplementsystem über den klassischen (d.h. Antikörper-vermittelten) Weg aktiviert, wenn Komplement-aktivierende Antikörper im Empfängerserum vorhanden sind, die gegen HLA-Antigene auf den Spenderlymphozyten gerichtet sind. Voraussetzung für die Komplement-aktivierende Funktion ist eine Klassifizierung der entsprechenden DSA zu den Isotypen IgG1, IgG3 oder IgM. DSA anderer Isotypen werden durch den CDC-CM nicht detektiert. Die Aktivierung des Komplementsystems durch gebundene DSA führt über den sogenannten Membranangriffskomplex (C5b-C9) zur Perforation der Lymphozytenmembran und somit zur Lyse der Lymphozyten. Diese wird in einer Zweifarbenfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Lymphozyten, die durch entsprechend vorhandene DSA gebunden wurden, werden durch den Letalfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) rot angefärbt, da dieser durch die Membranperforationen des aktivierten Komplementsystems Zugang zu der DNA im Zellkern hat. Lymphozyten, die nicht das Ziel

von DSA sind, werden durch die aktive Aufnahme des Vitalfarbstoffes Acridinorange grün angefärbt. Folglich ergibt sich nach Erkennung durch gegebenenfalls vorhandene DSA ein mehr oder weniger großer Anteil an toten (d.h. rot gefärbten) Lymphozyten, dessen Anteil (in %) als Maß einer positiven Reaktion abgeschätzt und vermerkt wird.

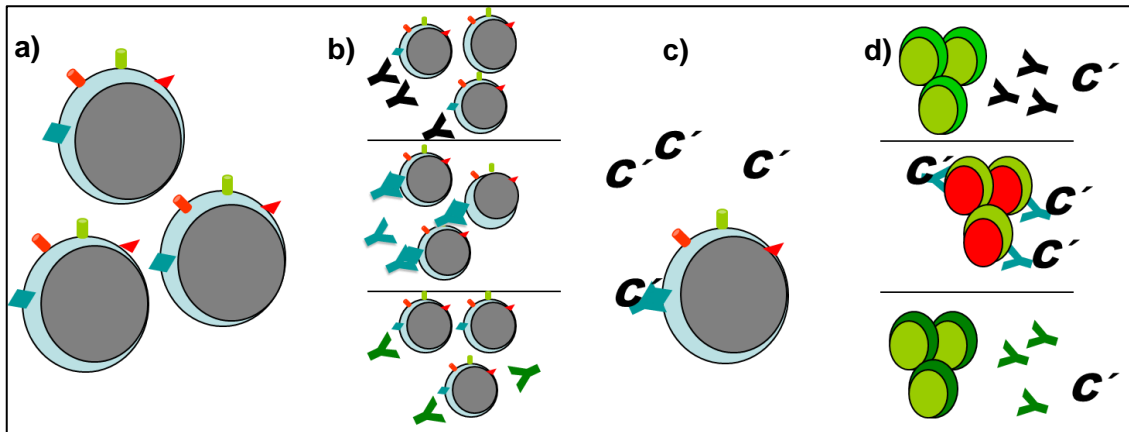


Abbildung 6: **Schematische Darstellung des CDC-CM**

a) Isolierung der Spenderlymphozyten, b) Inkubation von Empfängerseren und Lymphozyten: Donor-spezifische IgG und IgM Antikörper binden an korrespondierende HLA-Klasse I und II Antigene auf der Lymphozytenoberfläche, c) Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg durch Zugabe von Kaninchenkomplement d) Farbstoffzugabe und Auswertung über Zweifarbfuoreszenzmikroskopie. [Quelle: (Stöhr, 2015)]

### 3.6.3 Durchführung des Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitätstests (CDC-CM/LZT)

In die Kavitäten einer Mikrottestplatte (Terasaki-Platte) werden je 1µl des Empfängerserums, des Positiv- und Negativkontrollserums jeweils in Doppelansätzen pipettiert.

Tabelle 10: Pipettierschema, Schritt 1: Auftragen des Empfängerserums und der Kontrollansätze auf die MP

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

Anschließend werden in jede Kavität 1µl der Spenderlymphozyten (2.000/µl) als Gesamt-PBL, isolierte T- und isolierte B-Zellen hinzugegeben und für 30 Minuten mit den vorpipettierten Empfängerantiseren inkubiert.

Tabelle 11: Pipettierschema, Schritt 2: Zugabe der Spenderlymphozyten (PBL, T- und B-Lymphozyten)

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	

In einem weiteren Schritt werden anschließend Komplementkomponenten aus Kaninchenserum hinzugefügt, welche während einer 60-minütigen Inkubation nur dann eine Lyse der Lymphozyten bewirken, wenn zuvor an die Spenderlymphozyten gebundene Antikörper über den klassischen Weg der Komplementaktivierung zu einer Aktivierung dieses Systems der angeborenen humoralen Immunität führen.

Tabelle 12: Pipettierschema, Schritt 3: Komplementzugabe

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

Abschließend erfolgt eine Anfärbung mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen. Zunächst werden jeweils 2µl Fluoro-Quench<sup>TM</sup> zugegeben. Durch eine Komplexbildung mit Calciumionen stoppt enthaltenes EDTA die weitere Aktivierung des Komplementsystems, um die Lymphozytenlyse zu beenden. Während einer letzten Inkubation von 5 Minuten führen die ebenfalls in Fluoro-Quench<sup>TM</sup> enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid und Acridinorange zu einer differentiellen Färbung.

Tabelle 13: Pipettierschema, Schritt 4: Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	PBL
Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	
Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	T-Lymphozyten
Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	
Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	B-Lymphozyten
Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	Fluoro-Quench <sup>IM</sup>	

Während der die Nukleinsäuren interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid nur in letale Zellen eindringen kann und die durch ihn induzierte Rotfärbung der Zellen als positive Reaktion und den Nachweis Donor-spezifischer Antikörper zu werten ist, wird der



Vitalfarbstoff Acridinorange über aktiven Transport von vitalen Zellen aufgenommen. Zunächst färben sich somit alle vitalen Lymphozyten nach Zugabe von Acridinorange grün an. Nur in die letalen, durch das Komplementsystem lysierten Lymphozyten, kann Ethidiumbromid eindringen, um den Zellkern rot angefärbt erscheinen zu lassen. Die Analyse der positiven Reaktion besteht in der optischen Bestimmung des Anteils (in %) rot gefärbter letaler Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dieser Anteil wird entsprechend seiner Reaktionsstärke dem Reaktionsscore des National Institutes of Health (NIH, USA) wie folgt zugeordnet:

Tabelle 14: Auswertung der Fluoreszenzdoppelfärbung unter Verwendung des NIH-Scores (Reaktionsscore des National Institutes of Health, USA)

Anteil letaler Lymphozyten pro Kavität	Beurteilung	NIH-Score
0-10%	negativ	1 (Ø)
10-20%	fraglich	2 (+)
20-40%	schwach positiv	4 (++)
40-80%	positiv	6 (+++)
80-100%	stark positiv	8 (++++)

### 3.7 Virtueller Kreuztest

Der virtuelle Nachweis bzw. Ausschluss Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper im Rezipientenserum gelingt durch den Abgleich der anti-HLA Antikörperspezifitäten des Empfängers mit den HLA-Merkmalen des Spenders. Die Ergebnisse der anti-HLA-Antikörper-Screenings und der anti-HLA-Antikörperspezifizierungen wurden für die vorliegende Arbeit vom HLA-Labor des Universitätsklinikums zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 17 (Kapitel 4.2) dargestellt.

### 3.8 QUIKSCREEN® (anti-HLA Klasse I) und B-SCREEN® (anti-HLA Klasse II) ELISA als anti-HLA Antikörper-Screeningmethode

Die Seren aller Patienten wurden zu Beginn auf das Vorliegen von anti-HLA Antikörpern untersucht („Ja/Nein-Antwort“): Beide Screening-ELISA Systeme (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) dienen dem Nachweis zytotoxischer sowie nicht-zytotoxischer anti-HLA Klasse I (QUIKSCREEN®) bzw. anti-HLA Klasse II- (B-SCREEN®) Antikörper.

Das Funktionsprinzip basiert auf der Bindung der im Patientenserum vorliegenden anti-HLA Antikörper an die bereits in den Vertiefungen der Mikrottestplatte immobilisierten HLA-Klasse I- oder II-Antigene prospektiver Spender (Kao et al., 1993; Lubenko und Rodi, 1998). Anschließend binden mit alkalischer Phosphatase konjugierte Sekundärantikörper (anti-human IgG Antikörper) die primären Antikörper des Patientenserums. Wird nun das Substrat PNPP (Paranitrophenylphosphat) zugegeben, kommt

es zur Farbreaktion, wenn im vorhergehenden Schritt Primärantikörper gebunden worden sind. Diese Farbreaktion wird photometrisch vermessen. Die als Festphasen-immobilisierte Antigene verwendeten und aufgereinigten HLA-Klasse I-Moleküle für den QUIKSCREEN-ELISA stammen aus Thrombozyten, die aufgereinigten HLA-Klasse II-Moleküle im B-SCREEN-ELISA werden als Isolate aus EBV-transformierten B-lymphozytären Zelllinien immobilisiert. Durch die entsprechende Auswahl des Sekundärantikörpers (anti-IgG/M/A) kann der jeweilige Isotyp der anti-HLA Antikörper nachgewiesen werden. Über beide Verfahren kann allerdings keine Antikörper-Spezifizierung erfolgen. Da in einer Kavität das gesamte Spektrum der Klasse I bzw. Klasse II- Antigene in immobilisierter Form vorliegt, erbringen beide Testsysteme allein ein qualitatives Testergebnis („ja/nein-Antwort“). Auf ein positives Testergebnis hin muss folglich eine Identifizierung/Spezifizierung anhand eines weiteren Luminex-basierenden anti-HLA Antikörper Spezifizierungsassays erfolgen.

### **3.9 Luminex™ -Technologie zur anti-HLA Antikörper-Spezifizierung**

Die im Antikörperscreening (Kapitel 3.8) positiv getesteten Patientenseren, werden im folgenden Schritt auf die Antikörperspezifitäten untersucht: Die Methode beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenzmessung von anti-HLA Antikörpern, die über einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten anti-Human IgG Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Mikrosphären oder sogenannte „Microbeads“ stellen als verwendete Festphasenpartikel mikroskopisch kleine Polystyrolpartikel dar und dienen als Trägermaterial für die Analyte. Die Beads selbst sind zu ihrer Zuordnung mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die Licht im roten und infraroten Wellenlängenbereich emittieren. Zur diagnostischen Verwendung der Beads müssen diese zuvor mit verschiedenen HLA-Molekülen eines Spenders (Single Donor Auflösung) oder Einzelantigenen (Single Antigen Auflösung) auf der Oberfläche eines Mikroträgerpartikels (sogenanntes „Coating“) belegt werden. Bei entsprechender Inkubation binden anschließend gegebenenfalls im Empfängerserum vorhandene anti-HLA Antikörper. Die Detektion wird nachfolgend durch Phycoerythrin-gebundene anti-human-IgG/IgM/IgA-Sekundärantikörper erzielt. Das Luminex-Analysesystem wird nun zur Auswertung verwendet. Der grüne Laser (532nm) erbringt durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs an der Oberfläche der Beads den quantitativen Nachweis des Analyts (gebundener anti-HLA Antikörper), während der rote Laser (633nm) der Klassifizierung der Mikrosphären durch Farbstoffmischung in den Beads dient. Die Kombination der zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe in je 10 unterschiedlichen Codierungen führt zu 100 unterscheidbaren Rot- und Infrarot-Varianten. 100 Beadgruppen können folglich individuell zur Analyse eines definierten Analyts (Antikörper) genutzt werden.

Es wird ersichtlich, dass sich die Verwendung der Luminex™-Technik nicht allein auf die Spezifizierung von Antikörpern als Luminex-basierender anti-HLA Spezifizierungsassay beschränkt. Weitere Verwendungsmöglichkeiten dieser Technik stellen die Ermittlung der anti-HLA Immunisierungsrate (%PRA) [Tabelle 17 in Kapitel 4.2] sowie die Nutzung als Antikörper-Screensystem dar. Zusätzlich kann die Luminex-Technik in einer völlig anderen Konfiguration auch zur HLA-Typisierung mittels sogenannter (Sequence-Specific Oligonucleotide) SSO-Hybridisierungsmethodik genutzt werden. Hinsichtlich der Antikörperdiagnostik gilt die Luminex-Technik aktuell als Methode der höchsten Sensitivität.

### **3.10 Serologische Typisierung (Phänotypisierung) der HLA-Klasse I Merkmale**

Die Ergebnisse der durchgeführten HLA-Klasse I Phänotypisierungen wurden für die Patienten der vorliegenden Arbeit vom HLA-Labor des Universitätsklinikums zur Verfügung gestellt. Diese sind in Tabelle 15 in Kapitel 4.1 dargestellt. Das Verfahren der serologischen Typisierung (Phänotypisierung) sei hier kurz beschrieben:

Der bereits erwähnte komplementabhängige Lymphozytotoxizitätstest (CDC) ist die Methode der Wahl, um HLA-Moleküle serologisch zu typisieren (Phänotypisierung). Demnach erfolgt die Durchführung der HLA-Typisierung in Analogie zu dem in Kapitel 3.6 beschriebenen LZT/CDC-CM mit dem Unterschied, dass für die HLA-Typisierung an Stelle des Rezipientenserums eine Vielzahl verschiedener Antiseren mit bekannten Antikörperspezifitäten verwendet wird. Diese wurden auf 2 x 72 Kavitäten einer Mikrottestdoppelplatte (Terasakiplatte) verteilt/vorgetropft (Firma BAG Health Care GmbH, Lich, Deutschland), um gegebenenfalls an die HLA-Antigene auf den nachfolgend zugesetzten Lymphozyten zu binden. Von der Aufzeichnung des Reaktionsschemas bzw. der Reaktionsstärken in einem Reaktionsprotokoll kann auf die erkannten HLA-Antigene/Phänotypen geschlossen werden. Als Zielzellen finden für die Phänotypisierung periphere Blutlymphozyten der zu typisierenden Person Verwendung. Mit dieser Methode werden im HLA-Labor am Universitätsklinikum Halle aus hier nicht näher erläuterten Gründen ausschließlich HLA-Merkmale der Klasse I bestimmt.

### **3.11 Niedrigauflösende Genotypisierung der HLA-Klasse I und Klasse II Allele**

Wie die Ergebnisse der Phänotypisierungen wurden auch die Ergebnisse der HLA-Klasse I und II Genotypisierungen für die vorliegende Arbeit im HLA-Labor des Universitätsklinikums routinemäßig erhoben und zur Verfügung gestellt. Diese sind in Tabelle 15 in Kapitel 4.1 dargestellt. Im Folgenden soll das Verfahren der niedrigauflösenden Genotypisierung der HLA-Klasse I und II-Allele kurz skizziert werden. Das

HLA-A\*/B\*/C\* Cycloplate System der Firma Protrans GmbH (Hockenheim, Deutschland) wurde zur Bestimmung der HLA-Klasse I Allele verwendet. Für die Genotypisierung der HLA-Klasse II Allele diente das HLA-Ready Gene DRDQ-System (Firma InnoTrain Diagnostik GmbH Kronberg, Deutschland).

Prinzipiell basiert die Durchführung der HLA-Genotypisierung auf der Erzeugung Allelspezifischer Amplifikate entsprechender DNA-Sequenzen. Dies gelingt durch die Methode der **Sequence-Specific-Primer-Polymerasekettenreaktion (SSP-PCR)** und die daraufhin durchgeführte Gelelektrophorese spezifisch generierter Amplifikate. Unter Beachtung der entsprechenden firmenspezifischen Reaktionsprotokolle können die generierten HLA-Genotypen identifiziert werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gegenüberstellung der HLA-Typisierungsdaten und resultierende Bestimmung der HLA-Kompatibilitäten von 33 Empfängern der Organe Herz oder Lunge mit ihren korrespondierenden post-mortem Spendern aus Transplantationen, vorgenommen am Herzzentrum Leipzig zwischen 12/2014 und 10/2016

In der vorliegenden Arbeit wurden 33 Empfänger von Herz- und Lungentransplantaten sowie deren Organspender unter Bestimmung der HLA-Klasse I Merkmale A, B und C sowie der HLA-Klasse II Merkmale DR, DR51/52/53 und DQ typisiert. Die HLA-Kompatibilität der Transplantate zu den korrespondierenden Empfängern wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Bildung der Mismatch-Formeln, in der (als Minimalkonsens) nur die Merkmale der Genloci A, B und DR eines Spenders und seines jeweiligen Empfängers Berücksichtigung finden, bestimmt.

Als Folge der ko-dominanten Vererbung der HLA-Merkmale ergeben sich für die drei berücksichtigten Genorte bei vollständiger Inkompatibilität als Maximum zwei „Inkompatibilitätspunkte“ für jeden Genort. Aufgrund der vorwiegend heterozygot vorliegenden HLA-Merkmale können sich in der Summe demnach bis zu 6 Punkte ergeben, wenn sich alle Merkmalskombinationen als inkompatibel erweisen, dargestellt durch die HLA-A-B-DR Mismatch-Formel 2-2-2. Im Gegensatz dazu findet die bestmögliche Übereinstimmung der HLA-Merkmale o.g. Genorte, auch als sogenannte „Full-House Organ-spende“ bezeichnet, durch die HLA A-B-DR Mismatch-Formel 0-0-0 ihren Ausdruck. Die HLA-Typisierungsdaten der untersuchten Empfänger-/Spenderpaare sowie die daraus resultierenden HLA-A-B-DR Mismatch-Formeln sind in Tabelle 15 zusammengefasst:

Tabelle 15: Vergleich der HLA-Typisierungsdaten von 33 Herz- und Lungen- post-mortem Organspendern und ihren Empfängern, vorgenommen am Herzzentrum Leipzig von 12/2014 bis 10/2016, und Ableitung der korrespondierenden HLA-A-B-DR Mismatch-Formeln

<b>Patient ID</b>	<b>HLA-Merkmale Empfänger (serologische Darstellung)</b>	<b>HLA-Merkmale Spender (serologische Darstellung)</b>	<b>HLA A-B-DR-Mismatch-Formel</b>
<b>1 (He)</b>	A3,24; B27,35 (Bw4,6); Cw2,4; DR8,16; DR51, DQ4,5	A2; B27,62 (Bw4,6); Cw2,3; DR11,4; DR 52,53; DQ3	1-1-2

<b>2</b> <b>(He)</b>	A1; B52,61 (Bw4,6); Cw2,12; DRB4,15; DR51,53; DQ6,8	A2, 23; B44 (Bw4); Cw4,16; DR7,13; DR52,53; DQ2,6	2-1-2
<b>3</b> <b>(He)</b>	A1; B8 (Bw6); Cw7; DR4,17; DR52,53; DQ2,8	A1,2; B27,35 (Bw4,6); Cw2,4; DR11,13; DR52; DQ6	1-2-2
<b>4</b> <b>(He)</b>	A29,32; B44,60 (Bw4,6); Cw3,16; DR7,13; DR52,53; DQ2,6	A3,32; B35,44 (Bw4,6); Cw4,5; DR1,12; DR52; DQ5,7	1-1-2
<b>5</b> <b>(Lu)</b>	A3,32; B7,60 (Bw6); Cw2,7; DR11,15; DR51,52; DQ6,7	A11,30; B13,35 (Bw4,6); Cw6,4; DR7,14; DR52,53; DQ2,5	1-2-2
<b>6</b> <b>(He)</b>	A2,3; B27,62 (Bw4,6); Cw2,3; DR4,10; DR53; DQ5,8	A3,11; B14,51 (Bw4,6); Cw8,15; DR1,4; DR53; DQ5,8	1-2-1
<b>7</b> <b>(He)</b>	A2; B8,35; (Bw6); Cw4,7; DR4; DR53; DQ8	A1,2; B44,62 (Bw4,6); Cw3,5; DR4; DR53; DQ8	1-2-0
<b>8</b> <b>(He)</b>	A3,33; B7,44 (Bw4,6); Cw4,7; DR7,15; DR51,53; DQ2,6	A2; B51,57 (Bw4); Cw5,6; DR8,15; DR51;DQ4,6	1-2-1
<b>9</b> <b>(Lu)</b>	A1,3; B7,8 (Bw6); Cw7; DR13,17; DR52; DQ2,7	A31,32; B27,60 (Bw4,6); Cw2,3; DR9,13; DR52,53; DQ6,9	1-2-1
<b>10</b> <b>(He)</b>	A3,24; B7,51 (Bw4,6); Cw4,7; DR11,13; DR52; DQ6,7	A23,24; B7,44 (Bw4,6); Cw4,7; DR7; DR53; DQ2	0-1-1
<b>11</b> <b>(He)</b>	A2,3; B7,38; Bw4,6; Cw7,12; DR13,15; DR51,52; DQ6	A11,68; B35; Bw6; Cw4; DR1,17; DR52; DQ2,5	2-1-2
<b>12</b> <b>(He)</b>	A1,26; B8,62 (Bw6); Cw3,7; DR4,7; DR52,53; DQ2,8	A3,26; B37,60 (Bw4,6); Cw3,6; DR10,11; DR52; DQ5,7	1-2-2
<b>13</b> <b>(He)</b>	A1,25; B39,57 (Bw4,6); Cw6,12; DR17; DR52,53; DQ2,9	A2; B37,44 (Bw4); Cw5,6; DR10,11; DR52; DQ5,7	1-2-2
<b>14</b> <b>(He)</b>	A1,24; B44,55 (Bw4,6); Cw3,5; DR4,11; DR52,53; DQ7,8	A2,3;B7,13 (Bw4,6); Cw7,17; DR1,11; DR52; DQ5,7	2-2-1
<b>15</b> <b>(He)</b>	A1,2; B41,44 (Bw4,6); Cw5,17; DR13,15; DR51,52; DQ6,7	A2,30; B38 (Bw4); Cw12; DR4,7; DR53; DQ8,9	1-1-2
<b>16</b> <b>(Lu)</b>	A2,26; B7,44 (Bw4,6); Cw5,7, DR4,15; DR51,53; DQ6,7	A2,30; B37,51 (Bw4); Cw5,6; DR10,13; DR52; DQ5,6	1-2-2
<b>17</b> <b>(He)</b>	A11,24; B14,35 (Bw6); Cw4,8; DR1,4; DR53; DQ5,8	A2,11; B35,60 (Bw6); Cw3,4; DR1,13; DR52;DQ5,6	1-1-1
<b>18</b> <b>(He)</b>	A1,26; B38,39 (Bw4,6); Cw12; DR9,13; DR52,53; DQ6,9	A1,3; B18,38 (Bw4,6); Cw7,12; DR1,4; DR53;DQ5,8	1-1-2
<b>19</b> <b>(He)</b>	A26,28; B7,35 (Bw6); Cw4,7; DR1,13; DR52; DQ5,6	A2,11; B18,62 (Bw6); Cw3,5; DR8,13; DR52; DQ4,6	2-2-1
<b>20</b> <b>(Lu)</b>	A1,2;B8,51 (Bw4,6); Cw7,14; DR1,14; DR52; DQ5	A23,68; B44,49 (Bw4); Cw5; DR11,15; DR51,52; DQ 6,7	2-2-2
<b>21</b> <b>(He)</b>	A2,29; B57,62 (Bw4,6); Cw3,7; DR4,8; DR53; DQ4,8	A2; B7,37 (Bw4,6); Cw6,7; DR1,4; DR53; DQ5,8	0-2-1
<b>22</b> <b>(He)</b>	A1,11; B8,35 (Bw6); Cw4,7; DR1,7; DR53; DQ5,9	A2; B7,51 (Bw4,6); Cw7; DR11,15; DR51,52; DQ6,7	1-2-2

<b>23 (Lu)</b>	A1,33; B8,14 (Bw6); Cw7,8; DR1,17; DR52; DQ2,5	A2,68; B44,53 (Bw4); Cw4,7; DR13,15; DR51,52; DQ6	2-2-2
<b>24 (Lu)</b>	A2,30; B13,62 (Bw4,6); Cw3,6; DR4,7; DR53; DQ2,8	A2; B7,62 (Bw6); Cw3,7; DR1,7; DR53; DQ5,9	0-1-1
<b>25 (Lu)</b>	A1,3; B52,62 (Bw4,6); Cw3,12; DR12,15; DR51,52; DQ6,7	A11,24; B27,35 (Bw4,6); Cw2,4; DR7,11; DR52,53; DQ3	2-2-2
<b>26 (He)</b>	A24,26; B51,62 (Bw4,6); Cw3,14; DR11,13; DR52; DQ6,7	A3,24; B35,60 (Bw6); Cw3,4; DR1,15; DR51; DQ5,6	1-2-2
<b>27 (Lu)</b>	A3,32; B7,27 (Bw4,6); Cw2,7; DR11,15; DR51,52; DQ6,7	A3,24; B35,60 (Bw6); Cw3,4; DR1,15; DR51; DQ5,6	1-2-1
<b>28 (He)</b>	A1; B8,57 (Bw4,6); Cw6,7; DR7,17; DR52,53; DQ2,9	A32,68; B14,44 (Bw4,6); Cw5,8; DR11,13; DR52; DQ7	2-2-2
<b>29 (He)</b>	A2,32; B8,61 (Bw6); Cw2,7; DR11,17; DR52; DQ2	A2,3; B35,62 (Bw6); Cw3,9; DR4,7; DR53; DQ2,8	1-2-2
<b>30 (He)</b>	A2,31; B38,57 (Bw4); Cw6; DR4,7; DR53; DQ8,9	A2,3; B13,62 (Bw4,6); Cw3,6; DR7,13; DQ2,6	1-2-1
<b>31 (He)</b>	A3,24; B7,51 (Bw4,6); Cw1,7; DR1,7; DR53; DQ5,9	A11,24; B27,58 (Bw4);Cw2,3; DR12,13; DR52; DQ3,6	1-2-2
<b>32 (He)</b>	A1,2; B7,8 (Bw6); Cw7; DR15,17; DR51,52; DQ2,6	A1; B8 (Bw6); Cw7; DR17; DR52; DQ2	0-0-0
<b>33 (He,Lu)</b>	A1,2; B8,13 (Bw4,6); Cw6,7; DR4,7; DR53; DQ2,8	A2,3; B7,13 (Bw4,6); Cw6,7; DR7,15; DR51,53; DQ2,6	1-1-1

He.: Herz-transplantiert; Lu.: Lungen-transplantiert; HLA-A-B-DR Mismatch-Formel: Angabe der HLA-Inkompatibilitäten unter Berücksichtigung der HLA-Klasse I Genorte HLA-A und -B und des HLA-Klasse II Genortes DR

Bezugnehmend auf die *Collaborative Transplant Study* der Universität Heidelberg (Opelz et al.,1994) wurde eine Klassifizierung der HLA-Kompatibilitäten für weltweite Nierentransplantationen auf die in Tabelle 15 dargestellten Herz- und Lungentransplantationen übertragen. Dabei wurde die Anzahl der in der HLA A-B-DR Mismatch-Formel erfassten HLA-Inkompatibilitäten in Analogie zu der seinerzeit von Opelz und Mitarbeitern vorgenommenen Graduierung, die sich an der Zeitdauer des Transplantatüberlebens orientierte, folgendermaßen klassifiziert: Einer Summe von null bis zwei HLA-Inkompatibilitäten wurde die Bewertung „gut“ zugeteilt (grüne Darstellung, Tabelle 16). Drei inkompatible HLA-Merkmale repräsentieren einen mittleren Kompatibilitätsgrad (gelbe Darstellung, Tabelle 16), während vier bis zu sechs maximal mögliche Inkompatibilitäten als schlechte HLA-Kompatibilitätskonstellation zwischen einem Spender und seinem Empfänger gelten muss (rote Darstellung, Tabelle 16). Mit zunehmendem Mismatchgrad, das heißt abnehmender HLA-Kompatibilität, nimmt die Wahrscheinlichkeit für akute und chronische humorale Abstoßungsepisoden nach Transplantationen

solider Organe zu, was zu einer korrespondierenden statistischen Verkürzung des Transplantatüberlebens führt.

Tabelle 16: Verteilung der den HLA-Mismatch-Formeln entnommenen summierten individuellen HLA-Inkompatibilitäten unter den Spender / Empfängerkombinationen der Herz- und Lungentransplantationen (n=33) und in Abhängigkeit von der Inkompatibilität der HLA-Merkmale abgeleitete dreistufige Klassifizierung der Transplantationen

Mismatch-Anzahl	Anzahl vorgenommener Tx je Mismatch / Anzahl der Herz bzw. Lungen-Tx (gesamt)	Klassifizierung der Inkompatibilitäten; Anteil an Gesamt-Tx (%)
6	4 / 33	26/33 (79%)
5	13 / 33	
4	9 / 33	
3	4 / 33	4/33 (12%)
2	2 / 33	3/33 (9%)
1	0 / 33	
0	1 / 33	

Aufgeführt sind die prozentualen Anteile der hinsichtlich ihrer HLA-Kompatibilitäten schlecht (4-6 MM, rote Darstellung), mäßig (3 MM, gelbe Darstellung) bzw. optimal bis gut (0-2 MM, grüne Darstellung) transplantierten Patienten; Tx.:Transplantationen; Mismatch-Anzahl: Summe der in der HLA A-B-DR Mismatch-Formel aufgeführten Inkompatibilitäten.

Übertragen auf die 33 Rezipienten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ist festzustellen, dass nur 3 / 33 (9%) der Herz- bzw. Lungentransplantierten [ID 10, 24, 32] mit Transplantaten optimaler bis guter HLA-Kompatibilitäten versorgt wurden. Gleichmaßen wiesen nur 4 / 33 (12%) der Transplantatempfänger [ID 7, 17, 21, 33] eine mäßige HLA-Kompatibilität ihres Transplantates auf. Dementgegen wurden 26 / 33 (79%) der Organempfänger [z.B. ID 20, 23, 25, 28] Organe mit schlechter bis maximal ungünstiger HLA-Kompatibilität implantiert. Aus den Daten ist grundsätzlich und bereits auf den ersten Blick abzuleiten, dass die HLA-Kompatibilität zwischen den Patienten und ihren erhaltenen Transplantaten nicht als Auswahlkriterium berücksichtigt wurde. Die lediglich einen Anteil von etwa 10% umfassende Patientengruppe mit guter HLA-Kompatibilität ihres Transplantates ist auf zufällige Auswahlen +/- gut HLA-kompatibler Spenderorgane zurückzuführen. Mehr als 80% der Patienten zeichnen sich durch schlechte bis maximal schlechte HLA-Kompatibilitäten ihrer Transplantate aus, was durch die hohe Anzahl der HLA-Polymorphismen begründet und bei hinsichtlich ihrer HLA-Kompatibilität als Zufallsauswahl zu bezeichnenden Transplantaten auch nicht anders zu erwarten ist. Dieser Aspekt, auch hochgradige HLA-Inkompatibilitäten für die Transplantatauswahl zu akzeptieren, wird im Kontext seiner Relevanz auf die



erhebliche diagnostische Bedeutung eines Kreuztestes in der Diskussion (Kapitel 5) Erwähnung finden.

#### **4.2 Daten des ELISA-basierenden Kreuztestes zur Detektion Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA) im Vergleich mit ihrem virtuellen Nachweis**

Von den 33 Empfängern wurden Seren, die zum Zeitpunkt der Herz- bzw. Lungentransplantation entnommen worden waren, durch Verwendung entsprechender HLA-Screening- bzw. Spezifizierungs-Testsysteme retrospektiv auf den Nachweis und gegebenenfalls die nachfolgende Identifikation/Spezifizierung von anti-HLA Klasse I- und II Antikörpern untersucht. Zusätzlich wurde mit dem Herzzentrum Leipzig vereinbart, routinemäßig alle Patienten retrospektiv, das heißt zwei bis fünf Tage nach ihrer Transplantation, auf den Nachweis von DSA zu untersuchen, um die zum Zeitpunkt der Transplantation bestehende Spender-Empfängerkonstellation festzuhalten. Für diesen diagnostischen Ansatz fand das System „Kreuztest-ELISA“ Anwendung, da vitale, d.h. für den Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (CDC-CM) verwendbare Spenderlymphozyten grundsätzlich nicht mehr zur Verfügung standen. Als Spendermaterial diente in der Regel ein bereitgestelltes Milzfragment von diesem, in wenigen Fällen wurden auch Citratblutproben der *post-mortem* Spender verwendet. Bei sechs der Patienten ID 7, 10, 17, 18, 21 und 29 wurden anti-HLA Antikörper schon zum Zeitpunkt der Transplantation nachgewiesen. Die nach dem positiven Antikörperscreening identifizierten Antikörper-Spezifitäten sind in Tabelle 17, Spalte 2 aufgeführt. Diesen bereits vor bzw. zum Zeitpunkt der Transplantation nachzuweisenden anti-HLA Antikörpern liegen Immunisierungen gegen HLA-Antigene aus zurückliegenden Transfusionen oder Schwangerschaften zugrunde. Weiterhin wurde ein Kreuztest-ELISA durchgeführt, um die als besonders gefährlich geltenden Donor-spezifischen anti-HLA-Antikörper (DSA) unabhängig vom virtuellen Nachweis zu detektieren (Tabelle 17, Spalte 4). Entsprechend fanden sich die den beiden Patienten (ID 21, 29) virtuell nachweisbaren DSA auch in einem positiven Resultat des Kreuztest-ELISA wieder.

Die Situation beider Patienten sei nachfolgend beschrieben. Die Patientin ID 21 [HLA-A2,29; B57,62 (Bw4,6); Cw3,7; DR4,8; DR53; DQ4,8] erhielt ein Spenderherz mit den Merkmalen HLA-A2; B7,37 (Bw4,6); Cw6,7; DR1,4; DR53; DQ5,8. Folglich ergab sich die HLA-A-B-DR Mismatch-Formel 0-2-1. Zum Zeitpunkt der Transplantation konnten bei ihr anti-HLA Antikörper der Spezifitäten **anti-B7**, -B41, -B60, -B61 und -B81 nachgewiesen werden. Anti-HLA Klasse II Antikörper waren nicht nachweisbar. Ihre Gesamt-PRA betrug aufgrund der gelisteten anti-HLA-Klasse I Antikörper 30%. Somit lag bereits eine Vorimmunisierung vor, die im konkreten Fall dieser Patientin (ID 21) auf vergangene Schwangerschaften zurückgeführt wurden. Die virtuelle Kreuzprobe war

mit dem Nachweis des anti-HLA B7 Antikörpers als positiv gegenüber dem angebotenen Spenderherz einzustufen. Diese virtuell hergeleitete Donorspezifität wurde durch den retrospektiv und *de facto* durchgeführten Kreuztest-ELISA mit positivem anti-HLA Klasse I Resultat unter Verwendung von Spendermilzgewebe und Empfängerserum bestätigt.

Für eine weitere Patientin (ID 29) [HLA-A2,32; B8,61 (Bw6); Cw2,7; DR11,17; DR52; DQ2] wurde ein Spenderherz mit den Merkmalen HLA-A2,3; B35,62 (Bw6); Cw3,9; DR4,7; DR53; DQ2,8 akzeptiert, woraus sich die HLA A-B-DR Mismatch-Formel 1-2-2 ableiten ließ. Unter Verwendung der entsprechenden HLA-Screening- und Spezifizierungs-Testsysteme wurden folgende anti-HLA-Klasse II Antikörper nachgewiesen: anti-DR1, **-DR7**, -DR9, -DR10, -DR15, -DR16, -DQ5, -DQ6. Gegen HLA-Klasse I Antigene hatte die Patientin keine Antikörper gebildet. Virtuell ergab sich somit ein positiver Kreuztest gegen das HLA-Klasse II Antigen DR7 des Spenders. Im retrospektiv durchgeführten *de facto* Kreuztest (Kreuztest-ELISA) wurde die gegen ein oder verschiedene Antigene der HLA-Klasse II bestehende Positivität bestätigt, so dass das Kreuztest-ELISA Verfahren beide hier dargestellten Fälle *virtueller* Kreuztest-Positivität korrekt bestätigte.

Den Patientinnen (ID 21, 29) wurden die angebotenen Spenderorgane aufgrund pathophysiologischer Dringlichkeiten trotz des vor der Transplantation bekannten positiven virtuellen Kreuztestergebnisses transplantiert. Dies führte bei beiden Patienten zu Rejektionsepisoden, die jeweils pharmazeutisch und durch mehrfachen Einsatz von Apheresen bzw. Immunadsorptionen therapiert werden mussten.

Bei den übrigen 27 der 33 Empfänger konnten in bester Übereinstimmung mit den *virtuellen* Betrachtungen zum Zeitpunkt der Transplantation (d.h. PRA=0%) keine DSA gegen HLA-Merkmale der Klassen I und II nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der beschriebenen Daten findet sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Nachweis bzw. Spezifizierung allogener und Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper (jeweils virtuell und mittels Kreuztest-ELISA) sowie Bestimmung des anti-HLA Immunisierungsgrades (PRA%) der 33 Rezipienten

Patient-ID	Detektion/Spezifizierung anti-HLA Antikörper Klasse I / II	Panelreakti- vität (PRA%)	Donor-spezifische Antikörper (Abcross- ELISA) Klasse I / II
1 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
2 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
3 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
4 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / n.a.
5 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
6 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
7 (He)	neg. / anti-DR8, -DR11, -DR13, -DR14, -DR17, -DR18, -DQ2	57%	neg. / neg.
8 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
9 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
10 (He)	anti-A2, -A28 / neg.	30%	neg. / neg.
11 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
12 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
13 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
14 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
15 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
16 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
17 (He)	anti-B60, -B61 / neg.	8%	neg. / neg.
18 (He)	anti-A2, -B57 / neg.	28%	neg. / neg.
19 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
20 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
21 (He)	<b>anti-B7</b> , -B41, -B60, -B61, -B81 / neg.	30%	<b>pos.</b> / neg.
22 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
23 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
24 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
25 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
26 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
27 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
28 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
29 (He)	neg. / <b>anti-DR7</b> , -DQ5, -DQ6, -DR1, -DR10, -DR15, -DR16, -DR9	64%	neg. / <b>pos.</b>
30 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
31 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
32 (He)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.
33 (Lu)	neg. / neg.	0%	neg. / neg.

n.a.: nicht aufgeführt; neg.:negativ / keine Antikörper nachgewiesen; **pos.**: positiv / Antikörper nachgewiesen; He.: Herz-transplantiert; Lu.: Lungen-transplantiert; PRA% panel-reactive antibodies als Grad der Immunisierung; anti-XY.: in den verwendeten Spezifizierungsassays nachgewiesene Antikörperspezifitäten

### 4.3 Kasuistiken zur Durchführung des Kreuztest-ELISA unter Verwendung asservierten Donormaterials mit dem Ziel, eine Beteiligung Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper nachzuweisen bzw. auszuschließen

Die diagnostische Bedeutung des AbCross-ELISA für den einzelnen Patienten in Situationen subakuter-, akuter- sowie chronischer Rejektionsepisoden soll in diesem Kapitel anhand der folgenden drei, im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift bearbeiteten Kasuistiken dargestellt werden. Zum Zweck der Detektion Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper erwies sich das Festphasen-Verfahren im Vergleich mit dem bis dato als Standardverfahren geltenden CDC-CM in vielerlei Hinsicht als vielseitiger verwendbar. Das Ziel der nachfolgend beschriebenen Kasuistiken lag darin, die Verwendbarkeit des Kreuztest-ELISA zur Diagnose von Rejektionsepisoden zu untersuchen. Dabei wurde als Leukozytenpellet asserviertes Spendermaterial verwendet, das über lange Zeiträume (teilweise über mehr als vier Jahre) tiefgefroren aufbewahrt worden war und nun zur Durchführung des Kreuztest-ELISA zur Verfügung stand. Damit konnte dieser *de facto* Kreuztest zusätzlich zur virtuellen Variante und folglich zur Diagnosesicherung verwendet werden. Kasuistik 3 präsentiert darüber hinaus eine Situation, die unter alleiniger Verwendung des virtuellen Kreuztestes kein ausreichendes diagnostisches Ergebnis lieferte. In diesem Fall war der Nachweis von DSA zunächst allein durch den Einsatz des Kreuztest-ELISA zu führen.

#### 4.3.1 Kasuistik 1: Nachweis Donor-spezifischer anti-HLA-Klasse I Antikörper unter Verwendung von Spenderleukozyten aus der Spendermilz, die über fünf Monate tiefgefroren aufbewahrt worden war, zur Diagnose einer Abstoßungsepisode einer 42-jährigen Lungentransplantierten Patientin

Eine 42-jährige Patientin, die an der autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung Zystische Fibrose leidet, wurde zum Eintritt auf die Warteliste HLA-typisiert, um eine Spenderlunge zu erhalten (Tabelle 18).

Tabelle 18: HLA-Typisierung der Patientin

HLA-Klasse I	A11,26; B27,62 (Bw4,6); Cw2,3
HLA-Klasse II	DR13,15; DR51,52; DQ6

Initiale Untersuchungen mit den entsprechenden HLA-Screening ELISA Testsystemen QuickScreen und B-Screen Assay ergaben, dass die Patientin bereits gegen einige HLA-Klasse I Antigene immunisiert war, als sie im August 2012 auf die Warteliste für den Erhalt einer Lunge kam. Ihr Serum wies einen Immunisierungsgrad / eine Panelreaktivität (PRA-Wert) von 54% gegen HLA-Klasse I und von 0% gegen HLA-Klasse II Moleküle auf. Zusätzlich zu dem Immunisierungsgrad konnten die entsprechenden

Antikörperspezifitäten der Patientin mittels Luminex-basierender Analyse als anti-HLA A23, anti-HLA A24; anti-HLA B7; anti-HLA B27; anti-HLA B40 (60,61); anti-HLA B47 und anti-HLA B81 bestimmt werden. Mögliche Ursachen dieser Immunisierungen wurden dem HLA-Labor trotz mehrfacher Nachfragen nicht mitgeteilt. Nach sechs Monaten Wartezeit wurde der Patientin im Februar 2013 eine Spenderlunge mit folgenden HLA-Merkmalen transplantiert (Tabelle 19):

Tabelle 19: HLA-Typisierung des Spenders

HLA-Klasse I	A3; B7,38 (Bw4,6); Cw7,12
HLA-Klasse II	DR13, DR52; DQ6

Daraus ergab sich die HLA-A-B-DR Mismatch-Formel 1-2-0. Durch die Inkompatibilität der Cw-HLA-Antigene existierten theoretisch zwei zusätzliche immunologische Angriffsziele, die über die HLA-A-B-DR Mismatch-Formel grundsätzlich nicht erfasst werden. Das HLA-Klasse II Antigen DQ6, ebenfalls nicht in obiger Mismatch-Formel erfasst, war hingegen identisch und ergab theoretisch kein zusätzliches immunologisches Abstoßungsziel. Folglich zeigte der bereits für die Aufnahme in die Warteliste durchgeführte Nachweis von anti-HLA B7 Antikörpern, dass die Patientin gegen einen positiven virtuellen Kreuztest transplantiert worden war. Den Richtlinien von Eurotransplant und der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) entsprechend stellen spezifizierte DSA keine absolute Kontraindikation gegen den Erhalt eines Lungentransplantates dar, wie dies gegenteilig für den Erhalt eines Nierentransplantates gilt. Bei Nierentransplantationen gelten HLA-Merkmale, gegen die DSA nachgewiesen wurden, als inakzeptable Spenderantigene, deren Spendernieren automatisch für einen prospektiven Transplantatempfänger gesperrt werden (sogenannte *unacceptable antigens*).

Schließlich fand ungeachtet des Vorhandenseins von anti-HLA B7 Antikörpern eine Transplantation des Spenderorgans statt. Nach fünf Monaten (Juli 2013) zeigte die Patientin histopathologische und funktionelle Abweichungen des Transplantates, deren Ursache zunächst nicht klar war. Zur Ursachendiagnostik, d.h. zu einem möglichen Nachweis von DSA wurde eine Serumprobe der Abnahme Juli 2013 im HLA-Labor am UK-Halle untersucht. In Übereinstimmung mit den bereits im Zuge der Wartelistenaufnahme nachgewiesenen Antikörperspezifitäten ergab diese erneute Antikörperspezifisierung (Juli 2013) mit einer etwa gleichen PRA von 60% erneut das Spektrum der oben aufgeführten anti-HLA Antikörper, darunter deutlich nachweisbare Donorspezifische anti-HLA B7 Antikörper.

Da ursprünglich zum Zweck der DNA-Präparation ein Leukozytenpellet des Organspenders bei -28°C asserviert worden war, reifte schließlich die Idee, dieses Zellpellet zur Gewinnung des Antigenlysates für einen Kreuztest-ELISA zu verwenden und die virtuell darstellbaren DSA über den Nachweis in einem *de facto* Kreuztest zu erhärten.

Da keine vitalen Lymphozyten aus diesem Leukozytenpellet gewonnen werden konnten, war die Durchführung eines CDC-CM als Vitalitätstest von vornherein ausgeschlossen. Alternativ wurde aus dem tiefgefrorenen Spendermaterial ein Detergenzlysat hergestellt, um den Kreuztest-ELISA durchzuführen. Im Serum, welches im Zuge der klinisch bzw. histopathologisch manifesten Abstoßungsepisode (Juli 2013) entnommen worden war, konnten in den Serumverdünnungen 1:3 und 1:6 eindeutig Donor-spezifische anti-HLA Antikörper (DSA) gegen HLA-Klasse I Antigene nachgewiesen werden. DSA, die gegen HLA-Klasse II Antigene des Spenders gerichtet waren, konnten in Übereinstimmung mit dem virtuellen Kreuztest nicht nachgewiesen werden. Das noch vorhandene Spender-Zellpellet lieferte im beschriebenen Fall zu wenig Material, um für ein fortlaufendes Antikörper-Monitoring der Patientin ausreichend zur Verfügung zu stehen. Folglich konnte nach drei Apherese-Zyklen im August 2013 nur ein weiterer ELISA-Kreuztest als „Follow-Up-Untersuchung“ zur Überprüfung des Vorhandenseins von DSA im Serum der Patientin durchgeführt werden. Der therapeutische Ansatz zeigte allerdings keine Reduzierung der DSA sowie anderer anti-HLA Antikörper im Serum der Patientin, u.a. belegt durch die ermittelte PRA, die nicht unter 58% sank. DSA konnten stets bei Verdünnungen von 1:3 sowie 1:6 ermittelt werden; und auch das Spektrum an HLA-Klasse I Antikörpern blieb unverändert. Das nach den drei Apherese-Zyklen durchgeführte weitere DSA-Monitoring im Verlauf zusätzlich durchgeführter Antikörper-reduzierender Therapien erfolgte ausschließlich über die Luminex-basierende Antikörperspezifizierung (d.h. virtuell).

Tabelle 20: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Luminex-basierenden anti-HLA Antikörper Spezifizierung und der Ergebnisse des Kreuztest-ELISA unter Hervorhebung nachgewiesener DSA und positiver Kreuztestergebnisse

<b>Serum- Abnahme</b>	<b>Antikörper-Spezifitäten</b>	<b>PRA%</b>	<b>ELISA-CM Klasse I</b>	<b>Klasse II</b>
<b>08/2012 vor Eintritt auf die War- teliste</b>	HLA-Klasse I: anti-A23,-A24, <b>anti- B7</b> , -B27, -B47, -B60, -B61, -B81 HLA-Klasse II: negativ	54% 0%	n.d.	n.d.
<b>07/2013 Rejektions- periode</b>	HLA-Klasse I: anti-A23,-A24, <b>anti- B7</b> , -B27, -B47, -B60, -B61, -B81 HLA-Klasse II: negativ	60% 0%	<b>positiv (1:6)</b>	Negativ
<b>08/2013 nach 3 Apherese- Zyklen</b>	HLA-Klasse I: anti-A23,-A24, <b>anti- B7</b> , -B27, -B47, -B60, -B61, -B81 HLA-Klasse II: negativ	58% 0%	<b>positiv (1:6)</b>	Negativ

n.d.: nicht durchgeführt; PRA%: panel-reactive antibodies als Grad der Immunisierung; fett gedruckt: Spezifitäten detektierter DSA im virtuellen- (Luminex) und de facto Kreuztest in der höchsten Verdünnungsstufe

### 4.3.2 Kasuistik 2: Die Untersuchung der Rejektionsepisode eines 48-jährigen Patienten durch Nutzung des über vier Jahre asservierten Donormaterials zur Abklärung einer möglichen Beteiligung von DSA

Ein 48-jähriger Patient (HLA-Typisierung siehe Tabelle 21) erhielt im August 2010 nach einer Wartelistenzeit von nur zwei Monaten ein Spenderherz (HLA-Typisierung siehe Tabelle 22).

Tabelle 21: HLA-Typisierung des Patienten

HLA-Klasse I	HLA-A1,11; B8,35 (Bw6); Cw4,7
HLA-Klasse II	DR1,7; DR53; DQ5,9

Tabelle 22: HLA-Typisierung des Spenders

HLA-Klasse I	HLA-A2; B7,51 (Bw4,6); Cw7
HLA-Klasse II	DR11,15; DR51,52; DQ6,7

Anhand der HLA-Merkmale von Organempfänger und Organspender wurde eine HLA-A-B-DR Mismatch-Formel von 1-2-2 ermittelt, da bei diesem Spender das HLA-A2 Merkmal homozygot ausgeprägt war und folglich für den Klasse I Genort HLA-A nur ein potentiell Immunziel geboten wurde. Die retrospektive Untersuchung drei Tage nach der Herztransplantation, die unter Verwendung des Patientenserums durchgeführt wurde, welches am Tag der Transplantation abgenommen worden war, konnte weder DSA mittels Kreuztest-ELISA noch andere anti-HLA-Klasse I/II Antikörper mittels Luminex-Analyse detektieren. Ein Teil des aus der Spendermilz gewonnenen Leukozytenpellets wurde bei -30°C tiefgefroren und als Spender-Rückstellprobe mit zunächst unklarer weiterer Verwendung aufbewahrt. Sämtliche Untersuchungen lieferten über einen Zeitraum von vier Jahren keinerlei Hinweise auf Funktionseinschränkungen des Herztransplantats. Im Verlauf mehrerer nachfolgender durch das Herzzentrum Leipzig angeforderter Routineuntersuchungen zum gewünschten Nicht-Nachweis / Ausschluss von anti-HLA Antikörpern wurden bei diesem Patienten in den Jahren 2011, 2012, 2013 und 2014 ELISA-basierende Screeninguntersuchungen (Klasse I und II) durchgeführt (Tabelle 23). In den Jahren 2012 und 2014 wurden zusätzlich Antikörperdifferenzierungen mittels Luminex-Analysen durchgeführt (Tabelle 23). All diese in Tabelle 23 zusammengefassten Untersuchungen ergaben im Verlauf von vier Jahren keinerlei Hinweis für eine *de novo*-Bildung von anti-HLA Antikörpern durch den Patienten. Aus diesem Grund wurde im März 2015 völlig unerwartet eine klinisch manifeste Abstoßungs-episode bei diesem Patienten diagnostiziert, die den Anlass dafür bot, das Patientenserum im HLA-Labor auf DSA zu untersuchen.

Wie in Tabelle 23 ersichtlich, lieferte keines der obligatorisch durchgeführten Verfahren zur HLA-Antikörper-Detektion bzw. zur Antikörperspezifizierung (ELISA-Screening,

Luminex-Analyse, anti-HLA Single Antigen-ELISA, anti-HLA-Klasse I/II Single Donor-ELISA) Hinweise auf die Existenz von anti-HLA Antikörpern, so dass die virtuelle Variante des Kreuztests eindeutig ein negatives Ergebnis zeigte. Die Eindeutigkeit der klinisch manifesten und histopathologisch bestätigten Abstoßung einerseits und die andererseits bestehende Möglichkeit, dass sich die Abstoßung gegebenenfalls gegen eine seltene allelische HLA-Variante des Donors richtete, die in den Antigenpanels der Screen- bzw. Spezifizierungsassays nicht berücksichtigt wurde, veranlassten zu weiteren Untersuchungen. Zusätzlich wurde deshalb ein *de facto*-Kreuztest unter Verwendung von Spendermaterial, das über einen Zeitraum von 4 Jahren und 7 Monaten gelagert worden war, durchgeführt (Tabelle 23, Ergebnis des ELISA-CM 2015). Auch dieser Kreuztest-ELISA konnte keine Donor-spezifischen anti-HLA-Klasse I/II Antikörper detektieren. Aufgrund der Tatsache, dass die entsprechenden Positivkontrollen eindeutige Reaktionen zeigten, bestand kein Zweifel an der Validität des negativen Ergebnisses unter Verwendung des Patientenserums. Die entsprechende Positivkontrolle, Lysate-Control-Reagent (Abbildung 5, Kapitel 3.5.4), zeigte, dass eine quantitativ und qualitativ ausreichende Menge extrahierter HLA Klasse I und Klasse II Moleküle zur validen Durchführung des Kreuztest-ELISA trotz der langen Lagerungszeit von mehr als 4,5 Jahren immobilisiert worden war. Im Empfängerserum vorhandene DSA hätten mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit zu einem adäquaten Signal in diesem Festphasen-Assay geführt. Aufgrund der Tatsache, dass trotz der Vielfalt der verwendeten diagnostischen Verfahren weder Donor-spezifische noch generelle anti-HLA Antikörper nachgewiesen werden konnten, ergab sich die Schlussfolgerung, dass die offensichtlich vorliegende Abstoßungsreaktion gegen andere als HLA-Moleküle gerichtet sein musste. Grundsätzlich sei der in diesem Zusammenhang wichtige Aspekt erwähnt, dass „nur“ etwa 70% der als solche diagnostizierten Rejektionen gegen HLA-Moleküle als allogenes Immunziel gerichtet sind (siehe Kapitel 1.3.2).

Tabelle 23: Ergebnisse der verwendeten Methoden zur Antikörper-Detektion und Spezifizierung im Vergleich mit den Ergebnissen des ELISA-Kreuztests, die übereinstimmend keine Hinweise für eine Beteiligung von DSA an der Rejektionsepisode des 48-jährigen Patienten liefern

<b>Serum-Abnahme</b>	<b>ELISA-Screening Klasse I/II</b>	<b>Luminex (ID) Klasse I/II</b>	<b>ELISA-CM Klasse I/II</b>
<b>06/2010<sup>a</sup></b>	neg. / neg.	n.d. / n.d.	n.d. / n.d.
<b>08/2010<sup>b</sup></b>	neg. / neg.	neg. / neg. (PRA=0%)	neg. / neg.
<b>07/2011<sup>c</sup></b>	neg. / neg.	n.d. / n.d.	n.d. / n.d.
<b>08/2012<sup>c</sup></b>	neg. / neg.	neg. / neg. (PRA=0%)	n.d. / n.d.
<b>08/2013<sup>c</sup></b>	neg. / neg.	n.d. / n.d.	n.d. / n.d.



11/2014 <sup>c</sup>	neg. / neg.	neg. / neg. (PRA=0%)	n.d. / n.d.
03/2015 <sup>d</sup>	neg. / neg.	neg. / neg. (PRA=0%)	neg. / neg.

03/2015 zusätzlich:  
anti-HLA Klasse I Single Antigen ELISA: negativ  
anti-HLA Klasse I/II Single Donor (ID) ELISA: negative  
n.d.: nicht durchgeführt; neg.:negativ; PRA%:panel-reactive antibodies; SD: Single Donor (ID)/PRA resolution; <sup>a</sup>Untersuchung vor Aufnahme auf die Warteliste; <sup>b</sup>Untersuchung am Tag der Transplantation; <sup>c</sup>jährliche Routineuntersuchungen; <sup>d</sup>Untersuchung bei klinisch diagnostizierter Rejektionsepisode

### 4.3.3 Kasuistik 3: Identifizierung Allel-spezifischer Antikörper, die über den virtuellen Kreuztest im niedrig-auflösenden (zweistelligen) Typisierungsbereich nicht erkennbar sind, als Donor-spezifisch

Im Jahr 2014 wurde im HLA-Labor der Universitätsklinik Halle das Serum eines Patienten, der an einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz erkrankt war, im Zuge der vorliegenden Arbeit erneut untersucht. Es galt, den endgültigen Beweis zu erbringen, dass der Patient im Alter von 10 Jahren ein bereits 1998 initial erhaltenes Nierentransplantat durch sogenannte Allel-spezifische anti-HLA Antikörper und durch eine durch diese bedingte humorale Abstoßungsreaktion verloren hatte. Die Rejektion mit nachfolgendem Organfunktionsverlust ereignete sich, obwohl der besagte Patient eine initiale *post-mortem* Nierenspende erhalten hatte, die laut virtuellem Kreuztest, der entsprechend der gering auflösenden, d.h. zweistelligen Auflösung der HLA-Typisierungsdaten von Spender und Empfänger, durchgeführt worden war, vollständig HLA-kompatibel erschien. Auch als Beitrag zur Lösung dieser eher seltenen Problematik erwies es sich als extrem vorteilhaft, dass der Kreuztest-ELISA im Gegensatz zum CDC-Kreuztest durch die Verwendung von asserviertem Spendermaterial hilft, historische Situationen abzubilden, die ohne Verwendung dieses diagnostischen Systems nicht zu klären sind. Diese außergewöhnliche Kasuistik sei im Folgenden dargestellt. Bereits im Jahr 1998 wurde der seinerzeit 10-jährige Patient wie folgt hinsichtlich seiner HLA-Merkmale typisiert.

Tabelle 24: HLA-Typisierung des Patienten aus dem Jahr 1998 (gering auflösend)

HLA-Klasse I	A3, <b>25</b> ; B8,18 (Bw6); Cw7,12
HLA-Klasse II	DR15,17; DR51,52; DQ6

Auch aufgrund des als absolutes Dringlichkeitskriterium geltenden jungen Alters des Patienten erhielt er bereits im selben Jahr (1998) ein Nierentransplantat in offensichtlich kompletter Übereinstimmung der HLA-Merkmale (Tabelle 25). Infolge der homozygoten DR- und DQ-Phänotypen des Spenders boten sich für die Merkmale dieser Genorte keine weiteren immunologischen Angriffsziele einer Abstoßungsreaktion, so dass

sich die bestmögliche HLA-A-B-DR Mismatchformel 0-0-0 ergab. Die in diesem Falle vorliegende sehr günstige Empfänger- versus Spenderkonstellation wird auch als sogenannte „Full-House“-Nierenspende bezeichnet.

Tabelle 25: HLA-Typisierung des Spenders aus dem Jahr 1998 (gering auflösend)

HLA-Klasse I	A3, <b>25</b> ; B8,18(Bw6); Cw7,12
HLA-Klasse II	DR15; DR51; DQ6

Entsprechend den seinerzeit gültigen Richtlinien für eine Nierentransplantation und entsprechend den aufgrund der überaus günstigen HLA-Kompatibilität von Empfänger und Spender existierenden Erwartungen fiel der durchgeführte Prätransplantations-CDC-Kreuztest für die drei untersuchten Zellpopulationen PBL, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten negativ aus und ermöglichte so die unmittelbare Transplantation. Aufgrund dieser günstigen Voraussetzungen völlig unerwartet verlor das Transplantat nach acht Jahren jedoch seine Funktion und brachte den in der Zwischenzeit 18-jährigen Patienten im Jahr 2006 erneut auf die Warteliste. Der Organverlust führte zur Anforderung einer erklärenden anti-HLA Antikörperdiagnostik, deren Ergebnis zunächst allerdings völlig unverständlich erschien:

Tabelle 26: Vergleich der Typisierungsdaten des Patienten mit dem Ergebnis seiner Antikörperspezifitäten im Jahr 2006

<b>anti-HLA A25</b> , anti-HLA A26, anti-HLA A34, anti-HLA A66	
HLA-Klasse I	A3, <b>25</b> ; B8,18 (Bw6); Cw7,12
HLA-Klasse II	DR15,17; DR51,52; DQ6

Während der gegen HLA-Merkmale der Klasse I gerichtete Screen-ELISA (Quik-Screen) eindeutig positiv ausfiel, ergab seine anti-HLA Klasse II Variante (B-Screen) keinerlei Hinweise auf Antikörper gegen HLA-Klasse II Antigene. Das seinerzeit in Benutzung befindliche DynaChip-Spezifizierungssystem bestätigte das Ergebnis des Screen-ELISA durch die Identifizierung der Spezifitäten **anti-HLA A25**, anti-HLA A26, anti-HLA A34 und anti-HLA A66, wohingegen ebenfalls in Übereinstimmung mit dem HLA Klasse II Screen-ELISA (B-Screen) keine Antikörper gegen HLA-Klasse II Moleküle nachgewiesen, d.h. spezifiziert wurden (Tabelle 26). All diese als Antikörperspezifitäten aufgeführten Nebengruppen- (Split) -Antigene (HLA-A25, -26, -34 und -66) sind dem sogenannten Hauptgruppen- (Broad)-Antigen HLA A10 zuzuordnen. Somit war zu folgern, dass der Patient Antikörper gegen das Epitop des gemeinsamen Hauptgruppen-Antigens HLA-A10 gebildet hatte, angesichts des eigenen Antigens HLA-A25, das dieses HLA-A10 Epitop des Hauptgruppenantigens ebenfalls trägt, eine immunologische Unmöglichkeit. Der virtuelle Kreuztest, beruhend auf der niedrig auflösenden (d.h.

zweistelligen) HLA-Typisierung, blieb folglich eine Erklärung für diese Situation im Jahr 2006 schuldig, so dass die Möglichkeit auszuschließen war, bei den anti-HLA A25 (A10) Antikörpern handele es sich um Autoantikörper. Ein daraufhin durchgeführter CDC-basierender Auto-Kreuztest zeigte keine positive Reaktion, so dass die Situation im Jahr 2006 nicht geklärt werden konnte.

Allerdings handelt es sich bei einer gegen HLA-Antigene gerichteten Autoreaktivität um ein extrem seltenes immunpathologisches Phänomen. In den meisten Fällen stellt sich eine auf einem CDC-Autokreuztest beruhende Entdeckung von HLA-Autoantikörpern als artifizielles positives Ergebnis des CDC-Kreuztestes heraus, der trotz seines Status als etabliertes diagnostisches System überaus anfällig für vielerlei Artefakte und Störfaktoren ist, ein Punkt, der in der Diskussion noch ausführlich aufgegriffen werden wird (siehe Kapitel 5.2).

Bei der Wiederaufnahme auf die Warteliste für Spendernieren im Jahr 2006 zeigte der inzwischen 18-jährige Patient folglich weder einen positiven CDC-Autokreuztest, noch litt er nach Auskunft seines Dialysezentrums unter einer Immunerkrankung. Dennoch musste eine weitere dem Patienten im Jahr 2009 angebotene Transplantatniere wegen eines positiven Prätransplantations-CDC-Kreuztestes abgelehnt werden. Auch gegen die HLA-Antigene dieser Niere existierten erneut virtuell keine Antikörper.

Tabelle 27: HLA-Typisierung (gering auflösend) des abgelehnten Nierenspenders (2009)

HLA-Klasse I	A3, 25; B18,49(Bw4,6); Cw7,12
HLA-Klasse II	DR4,14; DR52,53; DQ5,8

Die auf diesem positiven Kreuztestergebnis beruhende Vermutung, dass wahrscheinlich DSA den Grund für den Transplantatverlust darstellten sowie die daraus resultierende Ablehnung der Spenderniere waren letztlich der Anlass für eine Genotypisierung des Patienten im hochauflösenden (vierstelligen) Bereich. Die Genotypisierung ergab, dass der Patient das sehr seltene Allel HLA A\*25:14 aufwies und nicht wie erwartet das am häufigsten auftretende Allel HLA A\*25:01. Natürlich war zu diesem Zeitpunkt kein zelluläres Material und auch keine eingelagerte DNA des ersten Nierenspenders aus dem Jahr 1998 mehr verfügbar, um gegebenenfalls Rückschlüsse auf das HLA-A25 Allel dieses ersten Nierenspenders ziehen zu können. Im Hinblick auf die Antikörper-Spezifisierung des Patienten, der wider Erwarten nur Antikörper gegen das Hauptgruppenmerkmal HLA-A10 aufwies, zu denen auch das Antigen HLA-A25 als sogenanntes Split- oder Nebengruppenmerkmal gehört, musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass DSA gegen den Phänotyp des Spenderallels HLA A\*25:01 gebildet worden waren. Der ELISA-Kreuztest, der 2009 zusätzlich als HLA-spezifisches Auto-Kreuztestverfahren verwendet worden war, ergab keine Hinweise auf autoreaktive

Antikörper, eine weitere wenn auch extrem unwahrscheinliche Möglichkeit, die vorliegende Immunreaktion zu erklären. Zur retrospektiven Unterstützung dieser Hypothese der Bildung Allel-spezifischer DSA wurde der ELISA-Kreuztest genutzt, um entsprechende DSA gegen drei weitere gelagerte Spenderzelllysate zu detektieren. In diesem Sinne wurden Donor-Leukozytenlysate ausgewählt, die alle den vom Allel HLA A\*25:01 abgeleiteten Phänotyp HLA-A25 besaßen. Drei Serumproben des Patienten (Abnahmedaten: 06/2009, 07/2011, 12/2012) wurden gegen diese „Spenderauswahl“ untersucht. Zweifelsfrei zeigten sich in allen drei Fällen DSA gegen HLA-Klasse I Antigene dieser „Test-Donoren“, während sich keinerlei Hinweise auf Donor-spezifische anti-Klasse II Antikörper ergaben (siehe Tabelle 29). Wäre eingelagertes Zellmaterial des Spenders aus dem Jahr 1998 verfügbar gewesen, so hätte der ELISA-basierende Kreuztest mit originärem Spendermaterial verwendet werden können, um das Patientenserum bereits frühzeitig nach dem Transplantatverlust auf möglicherweise vorhandene DSA zu untersuchen.

Für den Patienten lag die grundsätzlich missliche Lage vor, dass aufgrund der zweistelligen Typisierung in Vorbereitung einer Transplantation solider Organe sogenannte Allel-spezifische Antikörper nicht detektiert werden konnten. Mit Hilfe des Kreuztest-ELISA konnte jedoch die vorliegende Donorspezifität als alloreaktive Immunantwort im Gegensatz zu der virtuell vermeintlich vorliegenden Autoreaktivität in vollem Umfang dargestellt werden.

Tabelle 28: HLA-Typisierungsergebnisse des Patienten, seines ersten Nierenspenders aus dem Jahr 1998 und des abgelehnten Nierentransplantats aus dem Jahr 2006. Angabe detektierter HLA-spezifischer Antikörper und historischer CDC-CM -basierender Kreuztestergebnisse

<b>HLA-Typisierung des Patienten</b>	<b>HLA-Typisierung des Spenders aus dem Jahr 1998<sup>a</sup></b>	<b>HLA-Typisierung des abgelehnten Spenderorgans aus dem Jahr 2009<sup>b</sup></b>
<b>A3,25(10)</b>	A3,25(10)	A3,25(10)
<b>A*03 : 01</b>	(Hochauflösung n.d.)	A*03 : 01
<b>A*25 : 14</b>	(Hochauflösung n.d.)	<b>A*25 : 01</b>
<b>B8,18 (Bw6)</b>	B8,18 (Bw6)	B18,49 (Bw4,6)
<b>Cw7,12</b>	Cw7,12	Cw7,12
<b>DR15,17</b>	DR15	DR4,14
<b>DR51,52</b>	DR51	DR52,53
<b>DQ2,6</b>	DQ6	DQ3(8),5

2006 detektierte anti-HLA Antikörper des Patienten: anti-A25 (10), zusätzlich nachgewiesene anti-HLA-A10 Split-Spezifitäten: anti-A26 (10), anti-A34 (10) und anti-A66 (10)

<sup>a</sup>die Kreuztestdurchführungen einer Prätransplantations-Serumabnahme des Patienten führten 1998 zu einem negativen CDC-CM -Ergebnis gegen PBL, T- und B-Lymphozyten

<sup>b</sup>die Kreuztestdurchführungen mit einer weiteren Serumabnahme des Patienten aus dem Jahr 2006 führten zu einem positiven CDC-CM -Ergebnis gegen PBL, T- und B-Lymphozyten

Tabelle 29: Ergebnisse des ELISA-CM unter Verwendung von drei Serumabnahmen des Patienten (06/2006, 07/2011, 12/2012) zum Nachweis von DSA gegen gelagertes Material (Leukozytenpellet) von drei virtuellen Spendern, die das Allel HLA-A\*25:01 besitzen.

Patienten-Serumprobe	<b>ELISA-CM Ergebnisse gegen virtuell ausgewählte Spender mit dem Allel HLA-A*25:01</b>		
	<i>B.H.</i> Klasse I/II	<i>K.P.</i> Klasse I/II	<i>T.H.</i> Klasse I/II
<b>06/2009</b>	<b>pos. / neg.</b>	<b>pos. / neg.</b>	<b>pos. / neg.</b>
<b>07/2011</b>	<b>pos. / neg.</b>	<b>pos. / neg.</b>	<b>pos. / neg.</b>
<b>12/2012</b>	<b>pos. / neg.</b>	<b>pos. / neg.</b>	<b>pos. / neg.</b>

Ergebnisse der high-resolution Typisierung der virtuellen Spender

B.H.: HLA-A\*24:02,\*25:01, K.P.: HLA-A\*25:01,\*26:01, T.H.: HLA-A\*02:01,\*25:01

pos.:positiv; neg.:negativ

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Allokationskriterien für Transplantationen der Organe *Herz und Lunge* erfordern eine besondere spenderorientierte Rejektionsdiagnostik

Im Jahr 2017 befanden sich nach Angaben der Stiftung *Eurotransplant* allein in Deutschland **703** Patienten auf der Warteliste für ein Spenderherz, während sich **377** Patienten auf der Warteliste für eine Spenderlunge befanden. Diesen Zahlen zum Trotz wurden nur **257** Herzen sowie **309** Lungen transplantiert (*Eurotransplant Statistics Report Library*, 2017).

Laut den Richtlinien der Bundesärztekammer zur Organtransplantation und gemäß § 16 des Transplantationsgesetzes müssen Patienten für die Aufnahme auf die Warteliste für ein Spenderherz das Kriterium eines finalen Herzversagens, welches zur Erhaltung des Lebens eine medikamentöse, apparative oder transplantationschirurgische Behandlung erforderlich macht, erfüllen. Ursachen, die bereits vorab als vitales Risiko gelten bzw. die Minderung eines langfristigen Transplantatüberlebens darstellen, gelten als Kontraindikationen für eine Transplantation. Im Speziellen handelt es sich dabei um zusätzliche Erkrankungen wie z.B. eine akute Lungenembolie und/oder eine endgültige Nieren- oder Leberinsuffizienz. Auch psychosoziale Faktoren, beispielsweise eine mangelnde Compliance, zählen dazu. Die Aufnahme von Patienten auf die Warteliste für eine Spenderlunge bedingt, dass ein endgültiges, nicht rückbildungsfähiges Lungenversagen vorliegt, welches eine lebenserhaltende medikamentöse, apparative oder transplantationschirurgische Ateminsuffizienzbehandlung erforderlich macht. Klinisch manifeste Infektionserkrankungen, nicht-kurativ behandelbare Tumore sowie analog zur Herztransplantation psychosoziale Faktoren gelten beispielsweise als Kontraindikationen (Bundesärztekammer, Richtlinien zur Wartelistenführung und Organvermittlung für Herz und Lunge 2013, 2017).

Entsprechend den Kriterien von *Eurotransplant* und den Richtlinien der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) erfolgt die Vergabe von Spenderherzen in erster Linie anhand der Körpergröße sowie dem Alter des Organspenders. Bei der Vergabe von Lungentransplantaten werden die totale Lungenkapazität sowie das Alter des Spenders einbezogen (*Eurotransplant, Organ Match Characteristics*, 2018). Im Vorfeld einer Transplantation, d.h. zur Aufnahme auf die Warteliste, werden für beide Organe folgende Parameter der Patienten/prospektiven Empfänger erfasst: i) die AB0-Blutgruppen Zuordnung, ii) HLA-Merkmale in der gering auflösenden (Low Resolution-) Typisierung und iii) der Antikörperstatus durch die quartalsweise Untersuchung des Empfängerserums auf Antikörper mit Bestimmung der sogenannten Panelreaktivität (PRA in %). Trotz der Erfassung dieser immunologischen Parameter erfolgt den Richtlinien von *Eurotransplant* und der Bundesärztekammer (RiLiBÄK) entsprechend die Organzuteilung (Organallokation)

unabhängig von der HLA-Kompatibilität, d.h. in kompletter Abweichung von der Allokation des Organs Niere, bei dem eine Berücksichtigung der HLA-Kompatibilität obligatorisch ist. Zusätzlich stellen spezifizierte Donor-spezifische anti-HLA Antikörper (DSA) keine absolute Kontraindikation gegen den Erhalt eines Herz- bzw. Lungentransplantates dar, wenn diese virtuell, d.h. durch den Vergleich der Antikörperspezifitäten der Empfänger mit den HLA-Merkmalen der Spender, diagnostiziert werden.

Diesen, die immunologischen Parameter kaum berücksichtigenden Kriterien, liegen ausschlaggebend Dringlichkeitskriterien für den Erhalt beider Organe zugrunde. Wie zu Beginn der Diskussion dargestellt, steht einer beträchtlichen Anzahl an Patienten auf der Warteliste sowohl für Herz- als auch für Lungentransplantate eine bei weitem nicht ausreichende Menge an entsprechenden Organangeboten gegenüber. Bereits seit dem Jahr 2000 wird das Allokationsverfahren so umgesetzt, dass die Transplantate in erster Linie hochdringlichen, sogenannten „High Urgency“- (HU-) Empfängern, die intensivmedizinisch und katecholaminpflichtig behandelt werden müssen, zugeteilt werden (Strüber et al., 2009). Für „normale“ Wartelistenpatienten steht demgegenüber keine ausreichende Anzahl an Spenderorganen zur Verfügung.

Dieser Aspekt hat zur Folge, dass Organe ohne eine angemessene Berücksichtigung transplantationsimmunologischer Parameter und somit trotz einer hohen HLA-Inkompatibilität transplantiert werden (siehe Tabelle 16, Kapitel 4.1), was wiederum zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von DSA führt. Da Abstoßungsepisoden nach Transplantationen in der Regel nicht nur subakut und akut, sondern auch chronisch auftreten, ist ein regelmäßiges Post-Transplantations-Antikörpermonitoring für die Rezipienten mit beschriebenem Risiko von höchster Priorität. Die Identifizierung aufkommender DSA ist über die sogenannte Antikörperspezifizierung (d.h. mittels virtuellem Kreuztest) nicht immer zuverlässig möglich, wenn es sich beispielsweise um seltene HLA-Antigene handelt, die auf den Spezifizierungsassays als immobilisierte Antigene keine Berücksichtigung finden können. Gegebenenfalls lassen sich DSA nur über einen *de facto* Kreuztest, d.h. unter der Verwendung von Antigenen eines Spenders nachweisen. Da derartige Rejektionsepisoden mitunter noch Jahre nach einer erfolgten Transplantation auftreten, stellt der CDC-CM als Vitalitätstest keine geeignete Methode für den Nachweis *de novo* generierter Donor-spezifischer Antikörper nach einer Transplantation dar. Dem liegt zugrunde, dass der CDC-CM nur plausible Ergebnisse liefert, wenn vitale Spenderzellen (>90%) verwendet werden, welche zur Aufrechterhaltung ihrer Vitalität nicht länger als zwei bis maximal drei Tage adäquat, d.h. gekühlt gelagert worden sind. Aus diesen Einsichten und einem dagegenstehenden gesetzlich nicht geforderten Prätransplantations-Kreuztest ergab es sich, dass bereits seit dem Jahr 2010 in Vereinbarung mit dem Herzzentrum Leipzig alle Patienten nach

einer Herz- bzw. Lungentransplantation retrospektiv, das heißt drei bis fünf Tage nach ihrer Transplantation und zusätzlich gegebenenfalls beim Auftreten von Rejektionsepisoden auf das Vorkommen von DSA getestet werden. Hierfür wurde unter Verwendung von asserviertem Material (gekühlt oder nicht gekühlt gelagertes Leukozytenpellet bzw. dessen Detergenzlysat) des jeweiligen Spenders ein Kreuztest-ELISA durchgeführt, der in Übereinstimmung mit den virtuellen Kreuztestergebnissen mit offensichtlich hoher Plausibilität einen Nachweis oder Ausschluss von Donor-spezifischen Antikörpern ermöglichte.

## **5.2 Vergleich des Kreuztest-ELISA mit dem als Standardverfahren festgelegten Komplement-abhängigen Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (CDC-CM) für verschiedene Patientengruppen**

Die vielfachen Nachteile des CDC-CM, der bereits in den späten 1960er Jahren als Verfahren entwickelt (Patel und Terasaki, 1969) und bis in die späten 1970er Jahren als Standardverfahren in fast allen HLA-Laboratorien Verwendung fand, wurden in den letzten 10 bis 15 Jahren in zunehmender Anzahl publiziert (Sumitran-Holgersson, 2001; Slavcev et al., 2003; Altermann et al., 2006; Book et al., 2005; Schlaf et al., 2010; 2012a; 2013; 2014a; 2014b; 2015). Kritische Publikationen wurden insbesondere im Zusammenhang nicht valider bzw. artifizieller Ergebnisse abgefasst, die der CDC-CM unter verschiedenen Bedingungen lieferte, wie sie für Transplantatempfänger in Vorbereitung einer Transplantation aber auch in der Diagnostik klinischer Abstoßungen nicht selten auftreten. Oben aufgeführte Publikationen demonstrieren klar, dass der CDC-CM unter den jeweils untersuchten Begleitumständen einer pharmazeutischen Konditionierung oder aufgrund bestimmter Begleiterkrankungen im Kontext der immunologischen Gesamtdiagnostik keine plausiblen Ergebnisse liefert, d.h. nicht zu einer Identifikation von DSA führt.

Die mittlerweile vielfach beschriebenen durch Artefakte gekennzeichneten Ergebnisse des CDC-CM sind dadurch bedingt, dass dieses Testsystem als Vitalitäts- bzw. Letalitätstest grundsätzlich auf der Aktivierung zugegebener Komplementfaktoren durch gebundene Donor-spezifische Antikörper beruht. Generell ist das Messsystem „Komplementaktivierung“ stark anfällig für Artefakte/Störfaktoren, die auch ohne die Anwesenheit von DSA zu einer Aktivierung des Komplementsystems als Bestandteil des angeborenen humoralen Immunsystems führen. Folglich verfälschen derartige Artefakte das Ergebnis des Assays durch die Simulation DSA-vermittelter positiver Reaktionen.

Die medikamentöse Behandlung, insbesondere die Verwendung humanisierter therapeutischer monoklonaler Antikörper (mAK) des Komplement-aktivierenden Immunglobulin-Isotypen IgG1, zu dem auch die beiden therapeutischen Antikörper Rituximab und Basiliximab gehören, sind in diesem Zusammenhang zu nennen (Ozturk und



Terasaki, 1980; Book et al., 2005; Schlaf et al., 2010; 2012; 2015). Rituximab, der am häufigsten im Transplantationskontext verwendete mAK, führt durch seine Bindung an das CD20-Molekül auf der B-Zell Oberfläche zur Depletion dieser Zellen. Verhindert werden soll auf diese Weise eine humorale Immunantwort gegen ABO-Blutgruppenantigen-inkompatible Lebendnierenspenden. Ebenso ist der mAK Basiliximab (Handelsname Simulect), als anti-CD25 Antikörper gerichtet gegen die alpha-Kette des Interleukin 2 Rezeptors auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, zu nennen. Demnach führen therapeutische mAK, die zur Präkonditionierung des Organempfängers bei ABO-Blutgruppen-inkompatiblen Nierentransplantationen (Rituximab) und zur Prophylaxe und Therapie akuter Abstoßungsreaktionen (Basiliximab und Rituximab) verwendet werden und aus deren Verwendung die Komplement-vermittelte Lyse der Zielzellen resultiert, zu falsch positiven Ergebnissen des CDC-CM. In klarem Gegensatz zum CDC-CM erbrachte in diesbezüglichen vergleichenden Untersuchungen der ELISA-Kreuztest sowohl für Rituximab- als auch Basiliximab-behandelte Patienten Ergebnisse, die jeweils in vollem Umfang durch den virtuellen Kreuztest bestätigt wurden und somit als plausibel und valide gelten müssen (Schlaf et al., 2015).

Auch andere in Patientenserum enthaltene therapeutische Antikörper, wie der an das auf der Zelloberfläche von normalen und malignen B- und T-Lymphozyten exprimierte Glykoprotein CD52 bindende humanisierte monoklonale IgG1-Antikörper Alemtuzumab, beeinflussten in vergangenen Untersuchungen das Ergebnis des CDC-CM falsch positiv, während das Ergebnis des ELISA-basierenden Kreuztestes durch die therapeutischen Antikörper nicht manipuliert wurde (Wagenknecht et al., 2004; Book et al., 2005).

Im Zusammenhang mit Stammzelltransplantationen bei malignen Erkrankungen des blutbildenden oder lymphatischen Systems wurden zusätzlich falsch positive Ergebnisse des CDC-CM bei Patienten gefunden, die therapeutisch mit dem Zytostatikum 6-Mercaptopurin behandelt worden waren (Schlaf et al., 2012a). Als beste Voraussetzung für den Erfolg einer Stammzelltransplantation gilt derzeit die vollständige HLA-Identität von Spendern und Empfängern im hochauflösenden vierstelligen (Allel-) Bereich. Jedoch können in Ausnahmefällen wie z.B. in Ermangelung eines HLA-identischen Spenders sogenannte haploidentische Stammzellspenden z.B. zwischen Geschwistern oder von Eltern auf ihre Kinder durchgeführt werden. In diesen Fällen müssen im Rezipientenserum nachweisbare DSA ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass offensichtlich auch 6-Mercaptopurin durch eine Schädigung von Lymphozyten des prospektiven Stammzellempfängers zu einer erhöhten Mortalität der Spenderlymphozyten und somit zu einem falsch-positiven Ergebnis des CDC-CM führte. Auch in diesen Untersuchungen zeigte der alternativ durchgeführte

Kreuztest-ELISA in Übereinstimmung mit dem virtuellen Kreuztest ein negatives und somit plausibles Ergebnis (Schlaf et al., 2012a).

Als Patienten, die sich in besonderer Weise durch falsch positive Ergebnisse des CDC-CM auszeichnen, gelten auch Personen, die unter Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises und dabei insbesondere unter Erkrankungen des sogenannten Immunkomplex-Typus (Typ III) leiden. Zu diesen Erkrankungen zählen z.B. der Systemische Lupus Erythematoses (**SLE**) oder die Rheumatoide Arthritis (**RA**). Schlaf et al. (2012a) untersuchten in diesem Zusammenhang an SLE und RA erkrankte Patienten, deren Seren den Resultaten verschiedener Antikörper-Spezifizierungsassays entsprechend (d.h. virtuell) keine DSA aufwiesen. Unerwartet zeigten Seren dieser Patienten im CDC-Kreuztest und dabei im B-Zell Kreuztest oft in noch erhöhter Intensität zumeist positive Ergebnisse. Der Kreuztest-ELISA konnte dagegen auch in diesem Zusammenhang in bester Übereinstimmung mit dem virtuellen Kreuztest DSA ausschließen oder nachweisen. Lediglich in Einzelfällen, d.h. bei Patienten, die sich quasi auf dem Gipfel eines akuten Schubes ihrer RA befanden, zeigte auch der Kreuztest-ELISA falsch positive Ergebnisse. Im Gegensatz zum CDC-Kreuztest fielen jedoch weitaus weniger Ergebnisse (2/14) des Kreuztest-ELISA falsch positiv aus, was auch in diesem Krankheitskontext dem Kreuztest-ELISA eine erheblich höhere Zuverlässigkeit bescheinigte (Schlaf et al., 2012a; Schlaf et al., 2013). Generell sei darauf hingewiesen, dass sich RA-Patienten im Zuge eines akuten Krankheitsschubes immunchemischen Messsystemen (z.B. ELISA) durch sogenannte Rheumafaktoren mehr oder weniger grundsätzlich entziehen. Bei diesen Faktoren handelt es sich um autoreaktive anti-IgG Antikörper vom IgM-Isotyp, die über eine Vernetzung der Antikörper in den unterschiedlichen Schichtungen z.B. eines ELISA häufig artifiziell positive Ergebnisse hervorrufen. Dennoch stellte sich über im Krankheitsverlauf der Patienten parallel durchgeführte Kreuztestansätze heraus, dass die Empfindlichkeit des Kreuztest-ELISA gegenüber dem Artefakt „Rheumafaktoren“ weitaus geringer als die des CDC-CM ist. Anders formuliert kommt es ganz offensichtlich bereits bei geringsten Konzentrationen dieser Faktoren zu einer Aktivierung des Komplementsystems, während der Kreuztest-ELISA als immunchemisches Verfahren in Übereinstimmung mit den Antikörper-Screen- und Spezifizierungssystemen, die ebenfalls immunchemische Verfahren darstellen, eine erheblich geringere Suszeptibilität für diese Art eines Artefaktes aufweist (Schlaf et al., 2012a; Schlaf et al., 2013; Schlaf et al., 2016).

Ungeachtet der beschriebenen Artefakt-vermittelten falsch positiven Ergebnisse des CDC-CM, die in den letzten Jahren aufgrund ihrer Brisanz für die betroffenen Patienten verstärkt diskutiert wurden (Sumitran-Holgersson, 2001, Slavcev et al., 2003; Book et al., 2005; Altermann et al., 2006; Schlaf et al., 2010; 2012a; 2013; 2014; 2015; 2016;

Desoutter et al., 2016; 2017), ist in diametralem Gegensatz zu den Erkenntnissen der aufgeführten Arbeiten genau dieser Test 2010 in den RiLiBÄK als Standardkreuztestverfahren für postmortale Nierenspenden festgelegt worden. Damit kann eine Vergabe von Spenderorganen über die Stiftung Eurotransplant (Leiden, Niederlande) nur erfolgen, wenn ein negatives Ergebnis des vorausgehenden CDC-CM erzielt wurde.

Als weiterer Nachteil im vorliegenden Kontext ist der ausschließliche Nachweis zytotoxischer, d.h. Komplement-fixierender bzw. aktivierender DSA durch den funktionellen CDC-CM zu erwähnen. Diese nicht Komplement-fixierenden Antikörper zeichnen sich nicht durch eine Aktivierung des Komplementsystems, sondern durch andere Effektormechanismen wie die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) und/oder eine direkte Endothel-Aktivierung (siehe Kapitel 1.2) aus und sind durch den ELISA-basierenden Kreuztest detektierbar. In verschiedenen Studien zeigte sich deutlich, dass auch die nicht-komplementfixierenden DSA das Transplantatüberleben negativ beeinflussen (Sumitran-Holgersson, 2001; Slavcev et al., 2003; Valenzuela et al., 2014; Lefaucheur et al., 2016).

### **5.3 Verwendung des ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens für die Durchführung eines *de facto*-Kreuztestes zur Detektion von Donorspezifischen Antikörpern nach *post-mortem* Organspenden**

Zusätzlich zu den zunehmend diskutierten und in Abschnitt 5.2 aufgeführten vorwiegend falsch positiven Ergebnissen, die der CDC-Kreuztest für bestimmte Patientengruppen der Organwartelisten zeigt und die insgesamt nicht nur einen prozentual zu vernachlässigenden Anteil der Patienten betreffen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein weiterer methodischer Aspekt, der unter Verwendung eines Komplement-vermittelten Vitalitätsassays (d.h. des CDC-Kreuztest) grundsätzlich nicht zu leisten ist, systematisch untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob eingelagertes, d.h. nicht vitales Spendermaterial grundsätzlich verwendet werden kann, um aufkommende DSA gegen ein beliebiges Transplantat eines *post mortem* Spenders zuverlässig zu detektieren. Damit würde das ELISA-basierende Kreuztestverfahren erstmalig die methodische Grundlage liefern, im Falle von Rejektionsepisoden nicht nur einen virtuellen, sondern zusätzlich einen aussagekräftigeren ***de facto* Kreuztest** durchzuführen. Grundsätzlich werden DSA in diesen Fällen standardmäßig virtuell, d.h. durch den Abgleich spezifizierter Antikörper mit den HLA-Merkmalen des entsprechenden Spenders, identifiziert. Allerdings weist dieses Verfahren, dass aufgrund der verwendeten Antikörperspezifizierungssysteme, die gar keine oder nur wenige der selteneren HLA-Antigene enthalten, erhebliche Lücken auf.

Der ELISA-basierende Kreuztest liefert ganz offensichtlich erstmalig in der Historie der Diagnostik von Transplantatabstoßungen das entsprechende Werkzeug, um die

Einschränkungen durch die Verwendung von nicht vitalem, tiefgefrorenem und über einen langen Zeitraum gelagertem Spendermaterial komplett zu überwinden. Dem Kenntnisstand der vorliegenden Arbeit zufolge fand der einzige methodische Ansatz, einen *de facto* Kreuztest unter Verwendung von asserviertem Spendermaterial durchzuführen, vor mehr als 20 Jahren im Zusammenhang mit Cornea-Transplantationen statt. Als postmortales Spendergewebe wurden retinale Pigmentepithelzellen von explantierten Spenderaugen verwendet. Die Zellen, die nach ihrer Isolation in flüssigem Stickstoff gelagert worden waren, wurden für die Kreuztestuntersuchung kultiviert und dabei mit Interferon- $\gamma$  stimuliert, um die Expression der HLA-Moleküle für eine anschließende durchflusszytometrische Kreuztest-Analyse heraufzuregulieren (Zavazava et al., 1996). Dieser historische Ansatz mit der obligatorischen Nutzung vitaler Zellen muss nachteiliger Weise als technisch höchst anspruchsvoll, absolut zeitaufwendig und sehr kostenintensiv betrachtet werden. Zusätzlich ist das Überleben auch nach Vitalitätsaspekten in flüssigem Stickstoff optimal tiefgefrorener Zellen nicht als unendlich anzusehen, wobei ein Verlust von 10-20% der vitalen Gesamtzellen pro Jahr als realistisch anzusetzen ist. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei retinalen Pigmentepithelzellen nicht um Tumorzellen handelt, die sich nach dem Auftauen erneut teilen, um wieder in ausreichender Anzahl zur Verfügung zu stehen, ist die stark begrenzte Endlichkeit dieses Verfahrens offensichtlich. Auch technisch ist dieses Verfahren für die Routinearbeit eines jeden Gewebetypisierungslabors in der Tat als nicht realisierbar anzusehen. All diese Nachteile zeichnen in keiner Weise den ELISA-basierenden Kreuztest, der in der vorliegenden Arbeit präsentiert wird, aus. Dessen bedeutendster Vorteil ist, dass grundsätzlich keine vitalen Lymphozyten zur Durchführung benötigt werden. In Bezug auf seine technische und zeitliche Umsetzbarkeit, die bei etwa 3,5 Stunden liegt, ist er in jedem Labor implementierbar. Abgesehen von einem Plattenphotometer, das ohnehin zum apparativen Grundbestand eines jeden HLA-Labors gehört, ist er ohne eine weitere kostenintensive Komponente wie z.B. ein Durchflusszytometer für die in diesem Kontext bei Zavava und Mitarbeitern (1996) aufgeführte FACS-Analyse durchführbar.

Der Gedanke, einen *de facto*- an Stelle eines virtuellen Kreuztests durchzuführen, ergab sich nicht zuletzt aus der steigenden Anzahl sogenannter in der Literatur beschriebener „Allel-spezifischer Antikörper“ (Proust et al., 2009; Arnold et al., 2010; Schlaf et al., 2012b). Diese Antikörper sind gegen ein oder mehrere Allele eines HLA-Phänotyps gerichtet, welcher im zweistelligen Bereich typisiert wurde. Ein Phänotyp kann in der Tat jedoch eine ganze Gruppe von Allelen besitzen und durch verschiedene Epitope charakterisiert sein (siehe Kapitel 1.2). Somit erlauben die Typisierungsergebnisse in zweistelliger Auflösung nicht immer die plausible virtuelle Identifikation von

DSA. Diese Antikörper erscheinen virtuell folglich als Autoantikörper (Proust et al., 2009; Arnold et al., 2010; Schlaf et al., 2012b; Alhamid et al., 2014), obwohl sie nur gegen ein anderes Allel desselben in zweistelliger Auflösung typisierten HLA-Moleküls gerichtet sind. Der Gegenstand des Aufkommens dieser Allel-spezifischen-Antikörper, die unmittelbar zum Transplantatverlust führen können, lässt in Übereinstimmung mit Proust und Mitarbeitern (2009) folgern, dass es von äußerstem Nutzen wäre, grundsätzlich Antikörper-Epitope zu bestimmen, die möglicherweise zu Alloantikörpern führen können. Diese gilt es darzustellen, um dadurch falsche HLA-Kompatibilitäten (Pseudokompatibilitäten) zwischen Spendern und Empfängern zu umgehen (Proust et al., 2009). Diese Überlegung wäre insbesondere nützlich für die Vergabe von Nierentransplantaten durch Eurotransplant, da die Verteilung entsprechend den Hauptgruppenantigenen (Broad-Antigene) für die HLA-Klasse I Merkmale HLA-A und HLA-B und einzig für die HLA-Klasse II Merkmale HLA-DR entsprechend ihren Nebengruppentantigenen (Split-Antigene) erfolgt. Seit 2010 ist ein erheblicher Erkenntnisgewinn zu dem Aspekt zu verzeichnen, dass erheblich mehr Epitope das Potential zur Generierung von Alloantikörpern haben als durch den derzeit als Standard geltenden „Reduced Match Mode of Allocation“ (HLA-A-B-DR Mismatchformel) definiert werden können.

In diesem Zusammenhang wurden bereits im Jahr 2010 Daten von Arnold und Mitarbeitern präsentiert, die darauf hindeuten, dass ein Anteil von etwa 44% der Empfänger einer Spenderniere Antikörper gegen HLA-Antigene ihrer Spender bilden. Dabei generiert ein Anteil von 11% der Empfänger Antikörper gegen Split-Antigene bei Transplantation identischer Broad-Antigene, obwohl bereits diese für HLA-Klasse I Antigene den Eurotransplant Richtlinien entsprechend als HLA-kompatibel (entsprechender Mismatchgrad 0) gelten. Wird also die Verteilung eines zweiten Transplantates ebenfalls entsprechend der HLA-A-B-DR Mismatchformel durchgeführt, ergibt sich die geradezu groteske Situation, dass Broad-Antigene eines Empfängers einschließlich seiner eigenen Split-Antigene gegebenenfalls als inakzeptabel deklariert werden müssen, wenn Antikörper gegen nur ein Split-Antigen eines früheren Spenders auftreten. Diese Konstellation würde folglich völlig unnötiger Weise zur Ablehnung eines Organangebots führen (Arnold et al., 2010). Die beschriebene Allokationsproblematik, die sich aus der alleinigen Berücksichtigung der Hauptgruppen- (Broad-) Antigene ergeben kann, wurde trotz vielfacher Hinweise aus den diagnostisch beteiligten HLA-Laboratorien von Eurotransplant nicht einmal ansatzweise gelöst. Auch in Kasuistik 3 der vorliegenden Arbeit besteht die einzige Möglichkeit, um das extrem hohe Risiko einer erneuten Abstoßungsreaktion zu vermeiden, darin, das ganze Hauptgruppen-Antigen HLA-A10, das in diesem Fall die vier Nebengruppentantigene HLA-A25, -A26, -A34 und -A66 umfasst, für den Patienten zu blockieren, da es in diesem speziellen Fall aufgrund der Antikörper-

bildung gegen die Gesamtheit der Split-Antigene die Rejektionsepisode verursacht hat. In diesem speziellen Fall ist also die Blockade des gesamten Hauptgruppen-Antigens (HLA-A10) unumgänglich. Schwierigkeiten mit dem Eurotransplant Allokationsprogramm ergaben sich hier in der Weise, dass eine Blockade/Sperrung von „Selbstantigenen“ eines Patienten grundsätzlich nicht vorgesehen war und im Zuge der alleinigen Berücksichtigung der Hauptgruppenantigene das Antigen HLA-A10 als Selbstantigen gelten musste. Zum Wohle des betroffenen Patienten wurde in Zusammenarbeit mit dem entsprechenden Transplantationszentrum dennoch ein Weg gefunden, um das Pseudo-Selbstantigen HLA-A10 für den Patienten zu sperren, denn jede weitere Exposition mit diesem Antigen wäre für den in Patienten in höchstem Maße schädigend, wenn nicht lebensbedrohlich.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass zur Durchführung einer sicheren Typisierung mit dem Zweck der Vergabe von bestmöglich kompatiblen Spenderorganen und zur genauen Antikörperdiagnostik zukünftig die Epitope der Haupt- und Split-Antigene definiert werden sollten anstatt wie bisher die HLA-Phänotypen von Spendern und Empfängern im zweistelligen Bereich zu vergleichen (Schlaf et al., 2012b). Allel-spezifische DSA als Ursache für die Abstoßung virtuell HLA-identischer Transplantate sind mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit mit höherer Validität und Plausibilität durch einen *de facto* Kreuztest detektierbar als durch einen virtuellen Kreuztest auf Basis einer Genotypisierung im niedrig-auflösenden, d.h. zweistelligen Typisierungsbereich. So zeigte der entsprechende ELISA-basierende Kreuztest unter Verwendung von asserviertem Spendermaterial der drei ausgewählten Spender mit dem Allel HLA-A\*25:01 deutlich das Vorliegen Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper gegen dieses häufig vorkommende HLA-Allel (Tabelle 29 aus Kasuistik 3, Kapitel 4.3.3).

#### 5.4 Konklusion und Ausblick

Die Evaluation des ELISA-basierenden Kreuztestverfahrens zum Nachweis bzw. Ausschluss von DSA unter Verwendung von asserviertem Spendermaterial gelingt im Rahmen der vorliegenden Arbeit evident. Zweifellos ist der ELISA-Kreuztest der CDC-basierenden Variante hinsichtlich der **Unabhängigkeit von der Zellvitalität** der Spenderlymphozyten, der **Nicht-Beeinflussbarkeit durch therapeutische Antikörper** sowie der **Detektion komplementfixierender und nicht-komplementfixierender DSA** überlegen. Zusätzlich erlaubt dieses Verfahren als besonders **innovative Anwendungsmöglichkeit** die Verwendung von über Jahre tiefgefrorenem, d.h. asserviertem Spendermaterial.

In diesem Sinne sei abschließend auf den in der vorliegenden Arbeit thematisierten logistisch-technischen Aspekt hingewiesen. Die Asservierung/Lagerung einer ausreichenden Menge an Donormaterial ist die unumgängliche Voraussetzung, um zukünftig

ELISA-basierende Kreuztests für ein Monitoring aufkommender DSA durchzuführen. Dies wurde für die geschilderten drei Fallbeispiele nicht initial realisiert, da die ursprüngliche Absicht der Einlagerung nicht darin bestand, das gelagerte Material für die Detektion oder den Ausschluss Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper zu verwenden. Das eingelagerte Material sollte ursprünglich vielmehr als DNA-Quelle für eine gegebenenfalls durchzuführende Retypisierung des Spenders dienen. Allerdings legen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten folgenden generellen Ansatz nahe: Wenn für die Spendertypisierung nicht benötigtes Milzgewebe bzw. Blut im Zuge einer postmortalen Organspende in ein HLA-Labor mitgeliefert wird (was das generelle Prozedere für fast alle postmortalen Organspenden darstellt), so kann problemlos und systematisch eine ausreichende Menge an Donormaterial eingelagert werden, um eine *Spenderbank* für prospektive *de facto*-Kreuztestungen im Falle auftretender Rejektionsepisoden anzulegen.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und in Übereinstimmung mit den o.g. Autoren, die zuvor in Publikationen vielfältige Nachteile des bisher als Standardverfahren geltenden CDC-CM diskutierten, ist es sinnvoll, den Kreuztest-ELISA als ergänzende Methode in der immunologischen Diagnostik der HLA-Labore zu implementieren und wenigstens in den Situationen zu verwenden, in denen der CDC-CM zu nicht plausiblen Ergebnissen führt.

## 5.5 Limitationen der Arbeit

Limitationen der vorliegenden Arbeit ergaben sich aus einer teilweise geringen Menge an asserviertem Spendermaterial, da die ursprüngliche Absicht der Asservierung zum Zweck der DNA-Isolierung und nicht zum Zweck der Detektion oder den Ausschluss Donor-spezifischer anti-HLA-Antikörper durchgeführt worden war.

Zusätzlich war im Zeitraum der Erstellung der vorliegenden Arbeit jeweils kein alternativer Festphasen-basierender Kreuztest verfügbar, so dass allein der virtuelle Kreuztest als Referenzmethode zur Verfügung stand, um den Nachweis/Ausschluss von Donor-spezifischen anti-HLA Antikörpern zu bestätigen. Trotz eines positiven *de facto* Kreuztestes kann der dazu komplementäre virtuelle Kreuztest negativ ausfallen, wenn anti-HLA Antikörper gegen seltene, im Antigenpanel eines Antikörperspezifizierungsassays nicht eingeschlossene HLA-Antigene gerichtet sind (Kapitel 5.3). Allerdings trat diese Konstellation, die sich durch einen positiven *de facto*- und einen negativen korrespondierenden virtuellen Kreuztest auszeichnet, in der vorliegenden Arbeit nicht auf.

## 6 Zusammenfassung

Das Aufkommen sogenannter Donor-spezifischer anti-HLA Antikörper (DSA), die gegen HLA-Antigene eines Organspenders gerichtet sind, stellt die häufigste Ursache für hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen dar. Die entscheidende Voraussetzung für das initiale Überleben eines Transplantates ist aus diesem Grund ein negatives Kreuztest-Ergebnis, das heißt die Nicht-Nachweisbarkeit von DSA zum Zeitpunkt einer Transplantation. Methodisch wurde im Jahr 2010 der komplementabhängige Lymphozytotoxizitäts-Kreuztest (LZT/CDC-CM) zum Ausschluss zytotoxischer Antikörper bei *post mortem* Spenden solider Organe in den Richtlinien von Eurotransplant und denen der Bundesärztekammer (RiliBÄK) als obligatorisches Standardverfahren definiert. Bei diesem Verfahren beeinflusst die Vitalität der Spenderlymphozyten, das heißt die Lagerzeit der entsprechenden Blut- bzw. Milzgewebeprobe die Validität dieses funktionellen Assays maßgeblich. Ebenso können sich artifizielle Aktivierungen des Komplementsystems und damit verbundene falsch-positive Ergebnisse der CDC-Verträglichkeitsprobe z.B. aus Begleiterkrankungen bzw. pharmazeutischen Behandlungen der Empfänger ergeben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob der ELISA-basierende Kreuztest (AbCross-HLA ELISA) unter Verwendung auch längerfristig gelagerten bzw. eingefrorenen Spendermaterials unabhängig vom Faktor Zellvitalität valide Ergebnisse erzielt und infolgedessen eine methodische Alternative zum CDC-CM darstellt, die dessen Verwendbarkeit ergänzt bzw. erweitert.

33 Seren Herz- und Lungen-transplantierte Patienten wurden unter diesem Aspekt retrospektiv mit mehrtägig (> 3 Tage) gelagertem Spenderblut bzw. Spendermilzfragmenten unter Durchführung des ELISA-basierenden Kreuztests auf das Vorkommen von DSA untersucht. Keines dieser 33 verwendeten Spendermaterialien erlaubte aus Vitalitätsgründen enthaltener Lymphozyten die Durchführung des CDC-CM als Standardassay. Für alle Empfänger wurden zusätzlich anti-HLA Antikörper-Spezifisierungen durchgeführt und die resultierenden Spezifitäten mit den HLA-Merkmalen der korrespondierenden Spender verglichen. Diese sogenannten virtuellen Verträglichkeitsproben dienten als Referenzmethode, um die Resultate der durchgeführten ELISA-basierenden *de facto*-Kreuztestverfahren zu überprüfen. Basierend auf drei Kasuistiken wurde zusätzlich die diagnostische Möglichkeit der Verwendung von langfristig tiefgefrorenem Spendermaterial aufgezeigt.

Unter den 33 untersuchten Spender-Empfängerkombinationen für die Organe Herz und Lunge ließen sich im retrospektiv durchgeführten Kreuztest-ELISA lediglich bei 2 Patienten DSA gegen HLA-Klasse I- und II Merkmale nachweisen und virtuell bestätigen, so dass der Kreuztest-ELISA bei allen hier dargestellten 33 Fällen virtuell belegbare Resultate lieferte. Die zusätzlich in der vorliegenden Arbeit behandelten Kasuistiken



zeigen darüber hinaus den ersten Ansatz einer routinemäßigen Verwendung von tiefgefrorenem Donormaterial aus *post mortem*-Organspenden, um aufkommende DSA, die meist auch chronischen Abstoßungsreaktionen Jahre nach einer Transplantation zugrunde liegen, in einem realen (*de facto*-) Kreuztest nachzuweisen. Somit beschreibt die vorliegende Arbeit einen Ansatz, humoral-alloreaktive anti-HLA Immunreaktionen zuverlässig zu erkennen und in Ihrem Nachweis nicht auf die Begrenztheit des virtuellen Kreuztestes beschränkt zu sein. Insgesamt weisen die vorliegenden Ergebnisse erstmalig den Weg einer individualisierten *de facto*-Kreuztestdiagnostik, auch wenn diese erst Jahre nach einer Transplantation benötigt wird.

## Literaturverzeichnis

Alhamid N, Alterky H, Almouslem A, Al-Rayess H, Othman MI (2014). Successful kidney transplant in a patient with IgG anti HLA Class-I auto-antibodies: a case report. *Hum Immunol*, 75(7): 597-601.

Altermann WW, Seliger B, Sel S, Wendt D, Schlaf G (2006). Comparison of the established standard complement-dependent cytotoxicity and flow cytometric cross-match assays with a novel ELISA-based HLA crossmatch procedure. *Histol Histo-pathol*, 21(10): 1115-1124.

Arnold ML, Geithner M, Herber M (2010). Defining the mismatch: what is the meaning of a 'reduced match' for the definition of donor-specific anti-HLA antibodies? *Proc 18th Ann Conf German Soc Immunog* (DGI 2010), Wien, Österreich.

Becker LE, Morath C, Süsal C (2016). Immune mechanism of acute and chronic rejection. *Clin Biochem*, 49(4): 320-323.

Billen EVA, Christiaan MHL, van den Berg-Loonen EM (2009). Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches: data from 165 renal transplants. *Tissue Antigens*, 74: 205-212.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, 329: 506-512.

Book BK, Agarwal A, Milgrometal AB, Bearden CM, Sidner R, Higgins NG, Pescovitz MD (2005). New crossmatch technique eliminates interference by humanized and chimeric monoclonal antibodies. *Transplant Proc*, 37(2):640-642.

Bundesärztekammer, Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Herz- und Herz-Lungen-Transplantation, zuletzt geändert mit Wirkung vom 09.12.2013 [http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/Herz-Lunge\\_09122013.pdf](http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/Herz-Lunge_09122013.pdf) (Abruf vom 22.06.2018).

Bundesärztekammer, Richtlinie gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lungentransplantation, zuletzt geändert mit Wirkung vom 07.11.2017, [http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliOrgaWIOvLungeTx-ab20171107.pdf](http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliOrgaWIOvLungeTx-ab20171107.pdf) (Abruf vom 22.06.2018).

Crudele V, Picascia A, Infante T, Grimaldi V, Maiello C, Napoli C (2011). Repeated immune and non-immune insults to the graft after heart transplantation. *Immunol Lett*, 141(1): 18-27.

Dausset J (1958). Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*, 20(1-4): 156-66.

Dausset J, Colombani J, Legrand L, Feingold N, Rapaport FT (1970). Genetic and biological aspects of the HLA-System of human histocompatibility. *Blood*, 35(5): 591-612.

Densmore TL, Goodenough LT, Ali S, Dynis M, Chaplin H (1999). Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*, (39): 103-106.

Desoutter J, Apithy MJ, Bartczak S, Guillaume N (2016). False positive B-cells cross-match after prior rituximab exposure of the kidney donor. *Case Rep Transplant*, Article ID 4534898, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4534898>.

Desoutter J, Apithy MJ, Guillaume N (2017). Unexpected positive prospective cross-matches in organ transplant. *Exp Clin Transplant*, 15(3): 253-259.

Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), Herz-Warteliste und Vermittlung, <https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/warteliste-und-vermittlung/herz.html> (Abruf vom 22.06.2018).

Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), Lunge-Warteliste und Vermittlung, <https://www.dso.de/organspende-und-transplantation/warteliste-und-vermittlung/lunge.html> (Abruf vom 22.06.2018).

Dunker K, Schlaf G, Bukur J, Altermann WW, Handke D, Seliger B (2008). Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma, *Tissue Antigens*, 72(2): 137-148.

Duquesnoy RJ (2014). Human leukocyte antigen epitope antigenicity and immunogenicity. *Curr Opin Organ Transplant*, 19(4): 428-435.

Eurotransplant, Organ Match Characteristics, [https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=organ\\_match\\_char](https://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=organ_match_char) (Abruf vom 22.6.2018).

Eurotransplant Statistics Report Library, ET Yearly Statistics Overview, 2017. URL [http://statistics.eurotransplant.org/index.php?search\\_type=overview&search\\_text=9023](http://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=overview&search_text=9023) (Abruf vom 18.06.2018).

Fuggle SV, Martin S (2008). Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation*, (86): 384-390.

Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, Perkins H, Colombe B, Feduska M, Salvatierra N (1983). Flow cytometry analysis: A high technology cross-match technique facilitating transplantation. *Transplant Proc*, 15(3): 1939-1940.

Geneugelijk K, Thus KA, Spierings E (2014). Predicting alloreactivity in transplantation. *J Immunol Res*, Article ID 159479, doi: 10.1155/2014/159479. Epub 2014 Apr 28.

Gilbert ON, Chang PP (2017). The approach to antibodies after heart transplantation. *Curr Transplant Rep*, 4(3): 243-251.

Hajeer AH, Saleh S, Sutton P, Shubaili A, Anazi H (2009). Pronase-free B-cell flow cytometry crossmatch. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20: 662-665.

Harris PE, Bian H, Reed EF (1997). Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. *J Immunol*, 159: 5697-5704.

IMGT/HLA Database unter: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> (Abruf vom 13.03.16).

Kao KJ, Scornik JC, Small SJ (1993). Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies-an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation*, 55: 192-196.

Kelley J, Walter L, Trowsdale J (2005). Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, 177(4): 1269-1273.

Kramer CSM, Roelen DL, Heidt S, Claas FHJ (2017). Defining the immunogenicity and antigenicity of HLA epitopes is crucial for optimal epitope matching in clinical renal transplantation. *HLA*, 90: 5-16.

Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, van Duong Huyen JP, 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.

Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Latremouille C, Fabiani JN, Dausset J, Carosella E, Carpentier A (2002). Human Leukocyte Antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Circulation*, 105(16): 1949-1954.

Lobo PI, Isaacs RB, Spencer CE, Pruett TL, Sanfey HA, Sawyer RG, McCulloch C (2002). Improved specificity and sensitivity when using pronase-digested lymphocytes

to perform flow-cytometric crossmatch prior to renal transplantation. *Transpl Int*, 15: 563-569.

Locke JE, Zachary AA, Warren DS, Segev DL, Houp JA, Montgomery RA, Leffell MS (2009). Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody. *Am J Transplant*, 9: 2136-2139.

Lucas DP, Leffell MS, Zachary AA (2015). Differences in immunogenicity of HLA antigens and the impact of cross-reactivity on the humoral response. *Transplantation*, 99(1): 77-85.

Lubenko A, Rodi KM (1998). The detection by enzyme-linked immunosorbent assays of non-complement-fixing HLA antibodies in transfusion medicine. *Transfusion*, 38: 41-44.

Mehra NK, Baranwal AK (2016). Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. *Int J Immunogenet*, 43: 351-368.

Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberu J (2008). "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in non-alloimmunized healthy males. *Transplantation*, 86: 1111-1115.

Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C A, Seidler L, Ehrenstein M, Haußer-Stiller I, *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 7.Auflage, 2009, S.227-273. ISBN 978-3-8274-2047-3. **a**

Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C A, Seidler L, Ehrenstein M, Haußer-Stiller I, *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 7.Auflage, 2009, S.803-817. ISBN 978-3-8274-2047-3. **b**

Omrani O, Alawami M, Buraiki J, Selimovic N (2018). Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after heart transplantation. *Ann Saudi Med*, 38(2): 2789-2792.

Opelz G, Wujciak T, Back D, Mytilineos J, Schwarz V, Albrecht G (1994). Einfluss der HLA-Kompatibilität auf die Nierentransplantation. *Infusionther Transfusionsmed*, 21(3): 198-202.

Ozturk G, Terasaki PI (1980). Cytotoxic antibodies against surface immunoglobulin. *Transplantation*, 29(2): 140-142.

Patel R, Terasaki PI (1969). Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 280(14): 735-739.

Paul Ehrlich Institut, Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion (vom 18. August 2000), Bundesanzeiger, 2000 (174): 18396, ([http://www.pei.de/cln\\_180/nn\\_155914/SharedDocs/bekanntmachungen/2000/banz-174-14-09-2000-s18396.html](http://www.pei.de/cln_180/nn_155914/SharedDocs/bekanntmachungen/2000/banz-174-14-09-2000-s18396.html)).

Powers A, Stowell CP, Dzik WH, Saidman SL, Lee H, Makar RS (2008). Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion*, 48: 2549-2558.

Proust B, Kennel A, Ladriere M, Kessler M, Perrier P (2009). Unexpected anti-HLA-DR and -DQ alloantibodies after nephrectomy of an HLA-DR and -DQ identical first renal transplant. *Transpl Immunol*, 21(3): 166-168.

Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P and Marsh SGE (2013). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res*, 41: 1222-1227.

Rouass-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 11520-11525.

Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED (2005). HLA-G proteins in cancer: Do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res*, 65: 10139-10144.

Rouass-Freiss N, Moreau P, LeMaout J, Carosella ED (2014). The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*, Article ID 359748, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/359748>.

Sánchez-Fueyo A, Strom TB (2011). Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology*, 140: 51-64.

Schlaf G, Pollok-Kopp B, Manzke T, Schurat O, Altermann W (2010). Novel solid phase-based ELISA assays contribute to an improved detection of anti-HLA antibodies and to an increased reliability of pre- and post-transplant cross-matching. *Nephrol Dial Transplant PLUS*, 3(6): 527-538.

Schlaf G, Mauz-Körholz C, Ott U, Leike S, Altermann W (2012a). 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, Radam C, Wahle A, Altermann W (2012b). Generation of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies after the transplantation of a fully matched kidney

allograft and its impact on the selection of a subsequent renal regraft: a case report. *Transplant Proc*, 44(5): 1442-1445.

Schlaf G, Pollok-Kopp B, Schabel E, Altermann W (2013). Artificially positive cross-matches not leading to the refusal of kidney donations due to the usage of adequate diagnostic tools. *Case Rep Transplant*, Article ID 746395, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/746395>

Schlaf G, Rothhoff A, Altermann W, (2014a). 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(2): 1-9.

Schlaf G, Pollok-Kopp B, Altermann W (2014b). 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, Apel S, Wahle A, Altermann W (2015). Solid-phase based cross-matching as solution for kidney allograft recipients pre-treated with therapeutic antibodies. *Bio Med Research Intern*, Article ID 587158, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/587158>.

Schlaf G, Rothhoff A, Altermann W (2016). Der Festphasen-Kreuztest als valides diagnostisches Werkzeug zum Nachweis falsch positiver Kreuztestresultate bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen. *Transfusionsmedizin*, 6(4): 169-173.

Scornik JC, Meier-Kriesche HU (2011). Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. *Am J Transplant*, 11: 1785-1791.

Sigdel TK, Sarwal MM (2013). Moving beyond HLA: a review of non-HLA antibodies in organ transplantation. *Hum Immunol*, 74(11): 1486-1490.

Slavcev A, Lácha J, Honsová E (2003). Clinical relevance of antibodies to HLA antigens undetectable by the standard complement-dependent cytotoxicity test. *Transpl Int*, 16(12): 872-878.

Stöhr K (2015). Vortrag auf dem 3. Kongress für Doktorandinnen und Doktoranden der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 20-21. Nov. 2015, Universitätsklinikum Halle/Saale

Strüber M, Meyer AL, Malehsa D, Kugler C, Simon AR, Haverich A (2009). Situation der Herztransplantation und Weiterentwicklung von Kunstherzen, *Dt Ärztebl*, Jg. 106, Heft 28-29.

Süsal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhestroth A, Tran TH, 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.

Sumitran-Holgersson S (2001). HLA-specific alloantibodies and renal graft outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 16(5): 897-904.

Tait BD (2016). Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients - triumphs and challenges of the solid phase bead assay. *Front Immunol*, 7:570, published online 2016 Dec 9. doi: 10.3389/fimmu.2016.00570.

Terasaki PI, Ozawa M (2004). Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*, 4: 438-443.

Thorsby E (2009). A short history of HLA. *Tissue Antigens*, 74: 101-116.

Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD (1991). Map of the human MHC. *Immunology Today*, 12(12): 443-446.

van Besouw NM, Zuijderwijk JM, Vaessen LM, Balk AH, Maat AP, van der Meide PH, Weimar W (2005). The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation. *Clin Exp Immunol*, 141(3): 534-40.

van Marwijk-Kooy M, van Prooijen HC, Moes M, Bosma-Stants I, Akkerman JW (1991). Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunization: a prospective, randomized trial. *Blood*, (77): 201-205.

van Rood J, van Leeuwen A (1963). Leukocyte grouping. A method and its application. *J Clin Invest*, (42): 1382-1389.

Valenzuela NM, Reed EF (2013). Antibodies in transplantation: The effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol Biol*, 1034: 1-26.

Valenzuela NM, McNamara JT, Reed EF (2014). Antibody-mediated graft injury: complement-dependent and complement-independent mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant*, 19(1): 33-40.



Wagenknecht D, Sizemore J, House K (2004). Humanized monoclonal Campath-H1 can mimic allo antibodies in CDC and flow cytometry crossmatches. *Hum Immunol*, 65(9): 73-78.

Waßmuth R. *Einführung in das HLA-System*, ecomed Medizin, Landsberg/Lech, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, 2005. S. 1-45, ISBN 3-609-16332-1.

Zavazava N, Nolle B, Duncker G, Jenisch S, Westphal E, Eckstein V, Muller-Ruchholtz W (1996). Cross-matches on donor cadaver retinal pigment epithelial cells in corneal risk patients. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234(3): 164-170.

Zhang Q, Cecka JM, Gjertson DW, Ge P, Rose ML, Patel JK, Ardehali A, Kobashigawa JA, Fishbein MC, Reed EF (2011). HLA and MICA: Targets of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *Transplantation*, 91(10): 1153-1158.

Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G (2007). Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*, 357: 1293-1300.

## Thesen

1. Der komplementabhängige Lymphozytotoxizitätstest (LZT/CDC-CM) ist seit 2010 das durch Eurotransplant und die Richtlinien der Bundesärztekammer obligatorisch festgelegte Standardverfahren zum Ausschluss von Donor-spezifischen anti-HLA Antikörpern (DSA).
2. Der CDC-basierende Kreuztest ist ein funktioneller Test (Vitalitätstest), dessen Validität stark vom Alter bzw. der Vitalität verfügbarer Donorlymphozyten abhängt. Der CDC-Kreuztest ist als Vitalitätstest folglich zur Darstellung allo-spezifischer Antikörper unter Verwendung von asserviertem (nicht vitalem) Spendermaterial generell ungeeignet.
3. Die Detektion von DSA durch den LZT/CDC-CM beruht auf einer Aktivierung des Komplementsystems, so dass nicht-komplementaktivierende Donor-spezifische anti-HLA Antikörper durch diesen Test nicht erfasst werden.
4. Der CDC führt bei Vorhandensein von Störfaktoren wie pharmazeutisch konditionierten Patientenseren sowie Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises dieser Empfänger häufig zu falsch positiven Ergebnissen.
5. Der virtuelle Kreuztest, d.h. der Abgleich nachweisbarer anti-HLA Antikörper der Empfänger mit den typisierten Spendermerkmalen ist in Abhängigkeit von dem entsprechenden Antigenpanel des verwendeten Antikörperspezifizierungsassays nicht immer plausibel.
6. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass durch die Verwendung des Kreuztest-ELISA eine methodische Alternative existiert, die unabhängig von dem Parameter „Zellvitalität“ eine Verträglichkeitsprobe erlaubt. Der Kreuztest-ELISA erbringt in Kongruenz mit dem als Referenzmethode verwendeten virtuellen Kreuztest valide Ergebnisse bei der Detektion von DSA gegen gelagertes Spendermaterial. Damit schließt er eine eindeutig vorhandene diagnostische Lücke in der Transplantationsmedizin.
7. Das ELISA-basierende Kreuztestverfahren bietet somit erstmalig die methodische Grundlage, um im Falle von Rejektionsepisoden in der Post-Transplantationsdiagnostik einen aussagekräftigeren *de facto* Kreuztest durchzuführen. Auf diese Weise trägt das Verfahren zu einer validen individualisierten Rejektionsdiagnostik bei.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit 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 (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

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.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

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

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Karolin Lisa Stöhr  
Geburtsdatum 03.03.1993  
Geburtsort Ebersdorf/Thür.

### Promotion und Studium

Promotion Stabsstelle „HLA-Labor des Klinikumsvorstandes“  
am Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
2015-2018  
Studium der Medizin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
2011-2017

### Schulische Ausbildung

Gymnasium Staatliches Gymnasium „Christian-Gottlieb-Reichard“  
Bad Lobenstein  
2003-2011

Beruflicher Werdegang

### Ärztin in Weiterbildung

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde am  
Universitätsklinikum Leipzig  
01/2019

Halle/Saale, 25.02.2019

## **Danksagung**

*Nun ist es an der Zeit mich bei all jenen zu bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch ungemein lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet und mich beim Erstellen meiner Dissertation unterstützt haben.*

*Mein Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. Gerald Schlaf, meinem Doktorvater, für die Betreuung. Seine Hilfe, Motivation und konstruktive Kritik haben ausschlaggebend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.*

*Ich danke ebenso dem gesamten Team des HLA-Labors Halle für die Unterstützung bei der Durchführung der Kreuztest-ELISA, sowie der Aushändigung notwendiger Daten aus den Unterlagen des Antikörperscreenings sowie Anregungen und Hilfestellungen bei methodischen Fragen.*

*Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Familie, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichte und der ich diese Arbeit widme.*

*Karolin Lisa Stöhr*