

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung eines C4d-Luminex-Festphasen-Assays zum
Nachweis komplementaktivierender HLA-Antikörper nach
Nieren-Transplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kremena Georgieva Todorova
aus Stara Zagora, Bulgarien

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Schulze
 2. Prof. Dr. med. D. Barz
 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Mytilineos

Datum der Promotion: 22.03.2013

Meiner Mutter Violeta und meinem Vater Georgi

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Nierentransplantation	1
1.2 HLA-System: Struktur und Funktion	2
1.3 Immunsystem und Komplementsystem	5
1.3.1 Immunantwort	5
1.3.2 Antikörper: Struktur	6
1.3.3 Komplementsystem	7
1.4 Transplantatabstoßung und Monitoring nach Nieren-TX.....	10
1.5 Detektion von HLA-AK: Übersicht	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Pufferlösungen und Geräte	15
2.1.2 Antigenbeschichtete Beads, Komplementquellen und diagnostische Antikörper	16
2.1.3 Bearbeitung und Aufbewahrung der biologischen Proben.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Lymphozytotoxizitätstest (LCT)	19
2.2.2 Luminex-Technologie allgemein.....	20
2.2.3 Der Luminex C4d Test	25
2.3 Biologische Proben, Patienten, Ethikkommission	28

2.3.1	Patientenkollektiv und Einschluss in die Studie.....	28
2.3.2	Testseren zur Optimierung der C4d-Methode.....	28
2.3.3	Ethikkommission	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Validierungsergebnisse der C4d-Methode.....	30
	Sensitivität und Cut off im C4d-Luminex-Test.....	30
	Spezifität des C4d-Luminex-Tests	34
	Präzision des C4d-Luminex-Tests.....	36
	Auswahl der C4d-AK zur Detektion	37
	Optimierung der Inkubationszeit im C4d-Luminex-Test	38
	Optimierung der Inkubationstemperaturen, Ansatzvolumina und Waschschrte	39
	Auswahl der Komplementquelle und -konzentration im C4d-Luminex-Test	40
	Prüfung der Auftaughtechnik und Stabilität des Komplements im C4d-Luminex-Test	43
	Inaktivieren der Patientenseren	44
	Die inhibitorische Wirkung des humanen Serums in der C4d-Methode.....	45
	Plausibilität der Ergebnisse im C4d-Test	50
3.2	Patientenseren im C4d.....	52
3.2.1	Immunoglobulin-Klassen der HLA-AK im C4d-Luminex-Test	52
3.2.2	Background und grenzwertige Ergebnisse im C4d-Luminex-Test	55
3.2.3	Vergleich der Resultate im LCT und im C4d-Luminex-Test.....	57
3.2.4	Statistische Auswertungen.....	65
3.2.5	Fallbeschreibungen.....	65

4	Diskussion	73
4.1	Besonderheiten bei der Etablierung der C4d-Methode	73
4.1.1	Unterschiede des <i>in house</i> C4d-Luminex-Tests zu den bekannten Modifikationen	76
4.1.2	Bedeutung des „Cut-off“ Wertes beim C4d-Luminex-Test	77
4.1.3	Background, DTT-Behandlung und Inaktivieren der Seren im C4d-Luminex-Test	78
4.1.4	Klassenzugehörigkeit der komplementbindenden HLA-AK im C4dLuminex--Test....	82
4.2	C4d-Luminex-Test versus Standard-Methoden, Relevanz der HLA-AK	85
4.3	Nutzen von C4d-Luminex und Ausblick.....	94
5	Zusammenfassung	96
6	Eigenständigkeitserklärung	98
7	Danksagung	99
8	Lebenslauf von Kremena Todorova	100
9	Publikationsliste	100
10	Literaturverzeichnis.....	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AMM	<i>Acceptable mismatch program</i>
AMR	<i>Antibody mediated rejection</i>
ATG	<i>Antithymocyte globulin</i>
B-LCT	B-Zell Lymphozytotoxizitätstest
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C4d-Mix	C4d-Screeningtest
C4d-SA I/II	C4d-Single antigen Klasse I Test/ Klasse II Test
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CREGs	Kreuzreagierende Gruppen
DAF	<i>Decay Accelerating factor</i>
DRA	Donorreaktive Antikörper
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTT	Dithiotreitol
ET	Eurotransplant
FS	Serum aus frischem Blut
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
G-LCT	Gesamt-Zell Lymphozytotoxizitätstest
HC	lyophilisiertes humanes Komplement
HD	<i>hypotonic dialysis</i>
HLA	Humanes leukozyten Antigen
IgA	Immunoglobulin A

IgD	Immunoglobulin D
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL	Interleukin
LCT	Lymphozytotoxtest
LSM	Luminex Screeningtest
LSA	Luminex Single Antigen Test
MAC	Membranangriffskomplex
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Einheiten
MICA	<i>Major histocompatibility complex class I-related chain A</i>
MMF	Mycophenolatmofetil
MW	Mittelwert
NBG	Ratio normalisiertes Hintergrundverhältnis zur Ermittlung der Stärke jeder Anti-HLA-Reaktion
NC	negatives Kontrollbead
NKS	negatives Kontrollserum
NS	negatives Serum
NTX	Nierentransplantation
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	positives Kontrollbead
PKS	positives Kontrollserum gepoolt
PKS-E	positives Kontrollserum aus Einzelspender
PRA	Panel Reaktivität
PS	positives Serum
RT	Raumtemperatur
Rxn	Reaktion
SA I/II	Single Antigen I /II

SD	Standardabweichung
SPA	<i>Solid phase assay</i>
TX	Transplantation
VK	Variationskoeffizient

1 Einleitung

1.1 Nierentransplantation

Die Organtransplantation in Deutschland und weltweit ist derzeit ein sehr aktuelles Thema. Jahrelang werden die Änderungen im Transplantationsgesetz kontrovers diskutiert mit dem Hintergrund des Mangels an Spenderorganen [1]. Bei allen Patienten mit irreversiblen terminalem Nierenversagen sollte eine Nierentransplantation (Nieren-TX) erwogen werden, da sie sowohl mit einer besseren Lebenserwartung, als auch mit einer besseren Lebensqualität verbunden ist. Durchschnittlich funktionieren circa 90% der Transplantate nach einem Jahr und 75% nach 5 Jahren [2],[3]. Eine Nierentransplantation ist auf Dauer auch mit einer Kosten-Effektivität für das Gesundheitssystem verbunden [4,5]. Derzeit sind circa 8000 Dialysepatienten auf der Warteliste in Deutschland. In 2010 wurden 2937 Patienten transplantiert (Info: Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) [6]. Die DSO agiert als Koordinierungsstelle im Eurotransplantbund (ET: Österreich, Belgien, Kroatien, Deutschland, Holland, Luxemburg and Slovenien [7]), mit Aufgaben bei der Führung der Wartelisten. ET ist die Vermittlungsstelle für die Vergabe (Allokation) der Spenderorgane (*ET Kidney Allocation System*). Die wichtigsten Kriterien für die Organallokation sind die Blutgruppenkompatibilität zwischen Spender und Empfänger und an zweiter Stelle die Berücksichtigung der HLA-Merkmale (Transplantationsgesetz [8,9]). Eine Grundvoraussetzung für das Anmelden von Patienten bei Eurotransplant ist die HLA-Typisierung und HLA-AK Testung. Als absolute Kontraindikation zur Transplantation gilt der Nachweis von zytotoxischen HLA Antikörper (AK) im Empfängerserum, die gegen HLA-Merkmale des Spenders gerichtet sind (donorreaktive Antikörper, DRA) [10]. Die Betreuung der Patienten vor TX beinhaltet eine regelmäßige HLA-AK-Testung ein Mal pro Quartal. Das Bestreben aktuell ist, neue Labormethoden zu entwickeln, die eine Transplantatabstoßung (Organschädigung) ohne invasive Methoden (Biopsie) diagnostizieren können. Nach Transplantation kann eine regelmäßige, meist jährliche, Kontrolle der HLA-Antikörper im Serum wesentliche Hinweise zur immunologischen Situation (mögliche Rejektion) geben.

1. Einleitung

1.2 HLA-System: Struktur und Funktion

Das humane Leukozytenantigenensystem (HLA-System) umfasst Zellproteine, welche die Gewebeverträglichkeit, das Unterscheiden zwischen Selbst und nicht- Selbst, bestimmen und eine wesentliche Rolle bei der Immunantwort spielen. Diese HLA-Proteine stellen das Haupthistokompatibilitätssystem des Menschen dar („major histocompatibility complex“ MHC) [11]. Das erste HLA-Merkmal wurde 1958 von Dausset beschrieben und als Mac-2, heute HLA-A2 definiert [12]. Die HLA-Proteine werden auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert und sowohl membranständig wie auch im Serum in löslicher Form angetroffen [13]. Auf Abbildung 1 ist schematisch die Struktur des HLA-Systems dargestellt [14].

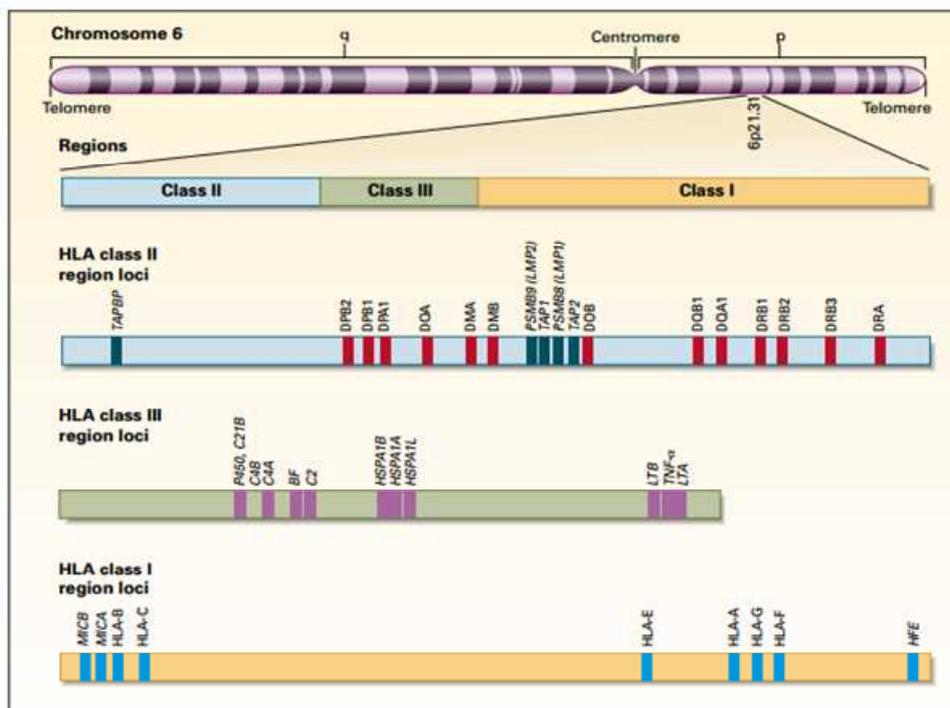


Abbildung1: Struktur des HLA-Systems auf Chromosom 6. Es sind die wichtigsten Regionen (Klasse I, II und III) gezeigt und die Loci aufgelistet. (The HLA-System, J.Klein 2012)

1. Einleitung

Der HLA-Komplex ist in drei Regionen aufgeteilt: Klasse I, II, III. Jede Region beinhaltet verschiedene Loci (Gene). In der Abbildung sind die wichtigsten Gene gezeigt. Für die Organtransplantation werden Klasse I und Klasse II berücksichtigt. Die Klasse III Gene sind mit den Klassen I und II strukturell sowie funktional nicht verbunden. Die wichtigsten Genorte im HLA-Klasse I Region sind HLA-A, B und C. Locus C wird bei einer serologischen Typisierung als Cw bezeichnet. Die HLA B-Gene sind eng mit zwei Bw-Merkmale assoziiert: Bw4 oder Bw6. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden wurde gezeigt, dass im HLA-System mehr als 20 weitere Genorte vorliegen, einige davon (z.B. HLA-J, -K usw.) gelten als Pseudogene, die keine vollständige Produkte ausbilden. Die „klassischen“ HLA-Klasse I Antigene HLA- A, -B und -C sind extrem polymorph und werden in nahezu allen Geweben exprimiert. Die Klasse II-Region umfasst auch zahlreiche Genorte. Die bisher als relevant für die Transplantationen genannten sind HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1, -DQA1. Die „klassischen“ HLA-Klasse-II Antigene sind DRB1 und DQB1. Im Gegensatz zu der HLA-Klasse I, sind die Klasse II-Antigene nicht auf allen Zellen des Organismus nachweisbar, sondern auf B-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen, wie aktivierten T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, sowie aktivierten Epithelzellen und Endothelzellen zu finden [11]. Die MICA Antigene (*major histocompatibility class I chain-related antigen A*) sind die derzeit bekanntesten non-HLA Ag, die sehr polymorph und fähig eine Antikörpervermittelte Immunreaktion zu induzieren sind [15]. MICA sind in der Niere auf Endothelzellen und Podozyten exprimiert.

Die HLA-Klasse I Moleküle bestehen aus einer schweren Kette von 44 kD (α) und einer leichten Kette von 12 kD, dem β 2-Mikroglobulin. Die α -Kette ist ein Transmembranprotein mit drei Domänen α 1, α 2 und α 3, sowie einem transmembranen und einem intrazellulären Anteil (s. Abbildung 2). Die HLA-Klasse II Moleküle bestehen aus je zwei Ketten, der α -Kette mit 33-35 kD und der β -Kette mit 26-28 kD. Beide Ketten bestehen aus je zwei extrazellulären Domänen (α 1, α 2, bzw. β 1, β 2), an die sich jeweils ein transmembraner Teil und ein intrazellulärer Teil anschließen. Im Gegensatz zu den konservierten α 2- und β 2-Domänen sind die α 1- und β 1-Domäne hoch polymorph [16]. Das beeinflusst direkt deren Bindungsaffinität und indirekt die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten.

1. Einleitung

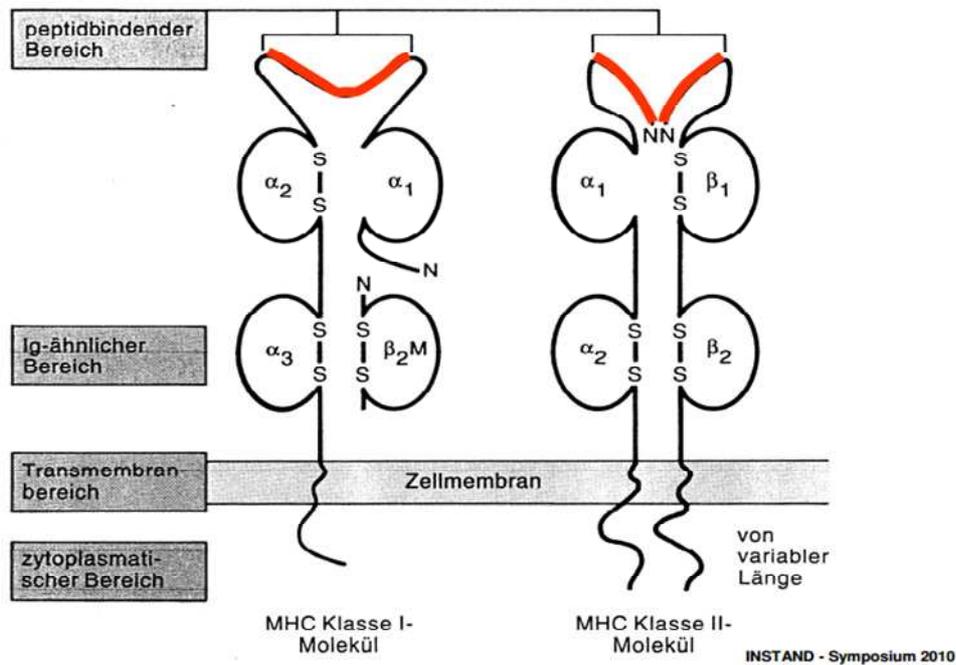


Abbildung 2. Struktur der HLA-Moleküle Klasse I und Klasse II. Gezeigt sind die intra- und extrazelluläre Domäne der HLA-Klasse I und II Moleküle. Die Klasse I-Moleküle bestehen aus drei α -Domäne und aus β_2 -Mikroglobulin. Die Klasse II-Moleküle haben zwei α - und zwei β -Domäne.

Auf der molekularen Ebene besteht die Funktion von HLA darin, Peptide intrazellulär zu binden und auf der Zell-Oberfläche zu präsentieren. Klasse I HLA-Moleküle präsentieren die fremden Peptide an CD8+ T-Zellen (zytotoxische T Zellen), die Klasse II Moleküle- an CD4+ T-Zellen (T Helfer Zellen). Immunreaktionen anderer Zellen (B-Zellen, T-Zellen) werden verstärkt und können Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Bei der Interaktion von Zellen des Immunsystems ist HLA auf der antigenpräsentierenden Zelle der Ligand für Rezeptoren auf Lymphozyten und NK-Zellen. Bei der Erkennung neu entstandener Pathogene durch Peptidpräsentation ist der Polymorphismus von HLA sehr wichtig um die Vielfalt neuer Antigene zu erkennen [11]. Bei einer Organtransplantation können die Unterschiede in den HLA-Merkmalen (Gewebeermkmale) zwischen Spender und Empfänger eine Immunantwort mit Schädigung des Transplantats und damit eine Abstoßung hervorrufen.

Die Benennung der HLA-Gene wird von der Weltgesundheitsorganisation und dem HLA-Nomenklaturkomitee festgelegt. Beim HLA-Gen bezeichnen die Buchstaben A-, B- usw. die Gen-Loci; 1,2,3 sind die Zahlen, die die Spezifität des Antigens (Ag) innerhalb eines Locus

1. Einleitung

definieren. Der Stern zwischen Buchstabe und Zahl (s. Abb.3) dient als Separator und bezeichnet, dass diese HLA-Bestimmung molekulargenetisch durchgeführt wurde. Mit Doppelpunkt sind die verschiedenen Spezifitäten abgetrennt: nach dem ersten Doppelpunkt sind die Allele benannt, nach dem zweiten Doppelpunkt stehen Zahlen, die eine stille Mutation bezeichnen. Zahlen und Buchstaben nach dem letzten Doppelpunkt geben die Spezifitäten außerhalb der kodierenden Gen-Regionen an (s. Abbildung 3). Für die Organtransplantationen werden aktuell die Hauptantigene (die ersten zwei Zahlen) berücksichtigt. Bisher sind mehr als 5000 Allele entdeckt worden (Klasse I Allele 5880, Klasse II Allele 1647, Stand April 2012, HLA-Database IMGT) [17]. Die Allel-Spezifitäten (erste vier Zahlen) innerhalb eines Antigenes sind für die Knochenmarktransplantationen wichtig, scheinen aber auch eine Rolle bei den Organ-TX zu haben, da immer häufiger in vielen Publikationen über HLA-AK gegen bestimmte Allele gesprochen wird (Allel-spezifische AK) [18].

HLA - A * 24 : 02 : 01 : 02 L

Abbildung 3: HLA-Nomenklatur [17,19]. Die Buchstabe A bezeichnet den Genort, der Stern weist darauf hin, dass die HLA-Typisierung molekulargenetisch durchgeführt wurde, die ersten zwei Zahlen (24) bezeichnen den Haupt-Antigen, die Doppelpunkte dienen als Trennzeichen zwischen den Zahlen, die unterschiedliche Bedeutung haben. Die dritte und vierte Zahl zeigen die Allel-Spezifität dieses Ag, die Zahlen hinter dem zweiten Doppelpunkt bezeichnen eine stille Mutation, die letzten zwei Zahlen zeigen die Spezifitäten, die außerhalb des kodierenden Regions diesen Gen charakterisieren. Die Buchstabe L steht für niedrig exprimierte Spezifität auf der Zell-Oberfläche.

1.3 Immunsystem und Komplementsystem

1.3.1 Immunantwort

Die Immunabwehr wird durch das Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem aufrechterhalten. Nur das adaptive Immunsystem hat Ag-spezifische Erkennungsmechanismen und reagiert mit einer entsprechenden Immunantwort. Die Abwehr des Ag-s erfolgt primär durch das angeborene Immunsystem. Dazu gehören evolutionär

1. Einleitung

entwickelte Abwehrmechanismen wie das Komplement-System, phagozytierende Zellen, Makrophagen mit allgemeiner Mustererkennung (Pathogen-assoziierte molekulare Muster = PAMP). Die Elimination dieses Ag-s erfolgt im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Das adaptive Immunsystem besteht aus zellulären Komponenten wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und humoralen Komponenten wie Antikörpern und Zytokinen, also aus Lymphozyten und aus humoralen Komponenten. Immunkompetente B-Zellen exprimieren auf ihrer Membran Rezeptoren mit der Struktur von IgM- oder IgD-Molekülen. Antigen-stimulierte B-Zellen sezernieren entweder IgM-Moleküle beim Erstkontakt mit dem Fremd-Ag oder (nach Klassenwechsel) Immunglobuline der Subklassen IgG, IgA oder IgE, beim Zweitkontakt, unter Beibehaltung (oder Erhöhung) der AK-Spezifität. Die Spezifität der humoralen Antwort beruht auf dem Selektionsvermögen der B-Zelle, die nur ein Ag mit hoher Affinität binden und erkennen kann. Effektoren der zellulären Immunantwort sind die T-Zellen und die von ihnen produzierten Lymphokine. Die T-Zellen erkennen die Fremd-Ag durch die T-Zell-Rezeptoren. Dem T-Zell-Rezeptor wird das Ag als Peptid-Fragment von ca. 8 bis 12 Aminosäuren (Klasse I) bzw. 9 bis 25 Aminosäuren (Klasse II) von dem MHC-Molekül (gleich HLA) präsentiert. Erfolgt die Ag-Präsentation von einem HLA-Klasse-II-Liganden, werden T-Helfer-Zellen mit einem CD4-Rezeptor (CD: *cluster of differentiation*) aktiviert, erfolgt die Ag-Präsentation vom Klasse I-Liganden, werden zytotoxische T-Zellen mit dem CD8-Rezeptor aktiviert [11,20]. Vergleichbar der humoralen Immunantwort, bei der durch Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung Antigene eliminiert werden können, ist dies auch durch CD8+ T-Zellen möglich [21].

1.3.2 Antikörper: Struktur

Die Effektor-Proteine der humoralen Immunantwort, die nach Aktivierung der B-Zellen aus den Plasmazellen gebildet werden, sind die Immunglobuline (Ig). Sie sind eine heterogene Gruppe von Proteinen mit Antikörperfunktion. Sie haben eine gemeinsame Grundstruktur, bestehend aus zwei schweren (H-) und zwei leichten (L-) Ketten. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden [20]. Die H- und L-Ketten im Antikörper sind an den gleichen Enden aminoterminal. Diese Enden bilden die variable Region des Ig-Moleküls. In dieser Region unterscheiden sich die Ig in der Aminosäuresequenz, da diese für die Spezifität gegenüber eines Ag-s verantwortlich ist.

1. Einleitung

Im Serum Gesunder sind die Ig-Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE in abnehmender Konzentration vorhanden. Innerhalb der IgG-Klasse werden die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 differenziert. Für die IgG1 und IgG3-Klassen ist bekannt, dass sie stark Komplement aktivieren, was eine Rolle bei der Organtransplantation spielt [22,23]. Die IgG-AK sind bei Erstinfektion die zweitproduzierten Antikörper nach IgM und die Erstantikörper bei wiederholter Infektion mit dem gleichen Erreger oder beim zweiten Treffen mit dem gleichen Fremd-Ag. Die IgG-Subklassenantwort kann durch Interleukine reguliert und moduliert werden. IgM ist das Ig der primären Immunantwort und der Antigenrezeptor auf der nicht-aktivierten B-Zelle. Das pentamere IgM-Molekül hat 10 Antigenbindungsstellen. Wegen sterischer Hinderung können aber nur fünf genutzt werden. Während der Immunantwort werden Immunglobuline verschiedener Klassen gebildet, zunächst IgM. Dieser Prozess geschieht im Laufe des Reifungsprozesses der B-Zellen, durch Gen-Reorganisation und unter verschiedenen Stimuli, wie z.B Interleukine [16,24]. Die hochaffine Bindung zwischen AK und den entsprechenden Fremd-HLA-Ag führt im Rahmen einer TX zur Schädigung des transplantierten Organs. Als Auslöser einer Antikörper-vermittelten Immunreaktion werden verschiedene Immunisierungsereignisse definiert: Schwangerschaften, Transfusionen sowie (vorherige) Transplantationen. Die Organtransplantationen haben den stärksten Alloimmunisierungseffekt, gefolgt von Schwangerschaften und Transfusionen. Bei Frauen, verglichen mit Männern, und bei Re-TX, verglichen mit Erst-TX, ist der Anteil an HLA-AK signifikant größer[25] . Die Relevanz solcher HLA-AK ist durch viele Forschungsarbeiten belegt [25-28].

1.3.3 Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus etwa 20 Plasmaproteinen und bildet das wichtigste humorale Effektorsystem der angeborenen Immunität. Im Serum liegen die Faktoren in ihrer inaktiven Form vor. Wird das System angestoßen, so kommt es zur sequentiellen Aktivierung seiner Komponenten. Das führt weiterhin zur direkten Lyse von Zielzellen, Aktivierung von Entzündungszellen und die Opsonierung von Zielzellen. Die Komplementkaskade kann durch den klassischen, alternativen und den Lektin-Weg aktiviert werden. Alle Wege führen zu terminaler Zelllyse über die C3-Komponente. Die einzelnen Komponenten des klassischen Wegs und des terminalen Effektorwegs werden mit C1 bis C9 bezeichnet [20]. Abbildung 4

1. Einleitung

stellt die wichtigsten Wege des klassischen und des alternativen Wegs (ohne Lektin-Weg) der Komplementkaskade graphisch dar.

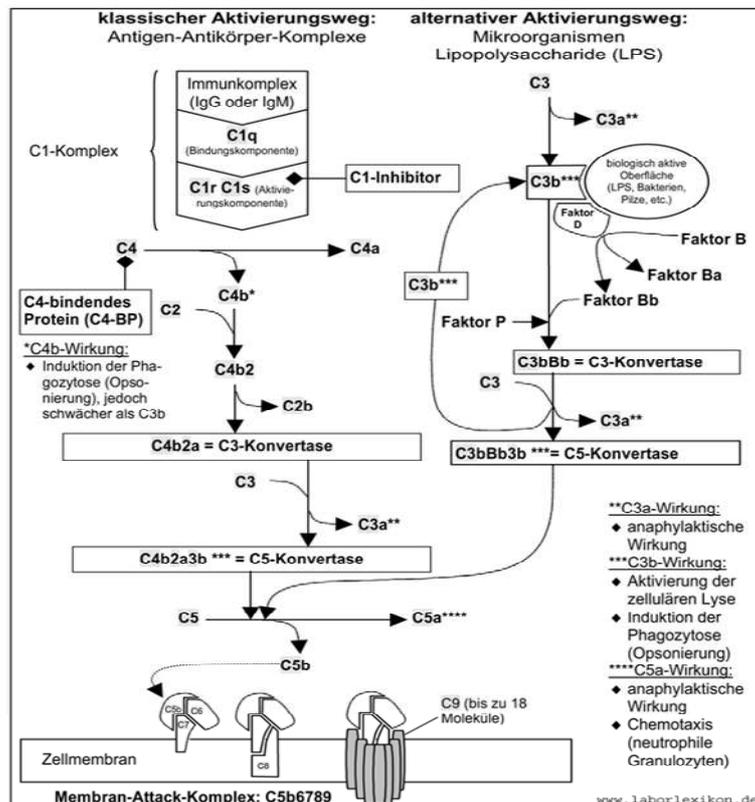


Abbildung 4: Ablauf und Aktivierungswege der Komplementkaskade (Laborlexikon.de). Hier sind der klassische und der alternative Weg gezeigt.

Für die vorliegende Arbeit wird insbesondere der AK-abhängige klassische Weg der Kaskade behandelt. An dem klassischen Weg der Komplementaktivierung sind die Proteine C1, C4, C2 und C3 beteiligt. Die Komponente C1, bestehend aus C1q, C1r und C1s, ist die erste und die wichtigste Komponente für den Start der Kaskade. Die C1s-Komponente spaltet folglich die C4-Komponente, die weiterhin die C3-Konvertase aktiviert. Als Stimuli dafür gelten IgM und IgG-AK, die im Immunkomplex zu den entsprechenden Ag gebunden sind. Von den IgG-Subklassen aktivieren IgG1, IgG3 stark Komplement, IgG2 schwach und IgG4 dagegen nicht. Der zweite mögliche Weg der Aktivierung ist der alternative Weg. Dieser Weg ist AK-unabhängig und wird durch Signale von Bakterien, Viren, CRP, Polysaccharide und andere biologisch aktive Oberflächen ausgelöst. Diese Stimuli führen direkt zur Aktivierung der C3-Komponente. Der dritte Weg ist der Lektin-Weg und ist weniger gut untersucht. Dabei erfolgt

1. Einleitung

eine Aktivierung der Komplementkaskade, wenn Mannose-bindende-Lektine mit Mannose-enthaltenden Oberflächen reagieren. Solche Oberflächen haben zum Beispiel bakterielle Zellen [29], [30]. Der terminale gemeinsame Weg der Effektorsequenz der Komplementkaskade beginnt mit der Spaltung von C3 und C5. An der Spaltung ist das in C2b enthaltene Aktivzentrum beteiligt. Das Fragment C5b bildet die terminale Effektorsequenz, wobei sich ein Heteropolymer, welches als Membran-Angriffskomplex (MAC) bezeichnet wird, bildet. Dabei sind die Komponenten von C5 bis C9 beteiligt. Der MAC führt zur Membranläsion mit anschließender Lyse der Zelle. Mehrere Kontrollproteine sind bei der Komplementkaskade beteiligt, die die Aktivierung inhibieren und vor einer unkontrollierten Komplementaktivierung im Körper schützen. Das wichtigste Protein ist der Inhibitor der C1-Esterase C1INH. Es gibt weitere Proteine, die sich an C4 anlagern und Spaltung von C2 verhindern. Das sind der C4-Bindungsprotein und ein Zelloberflächenprotein DAF (decay accelerating factor) [30-32]. Das alles spricht dafür, dass das Komplementsystem ein komplex reguliertes System ist, das möglicherweise in vitro schwierig und nur in Teilen reproduziert werden kann.

Für die Nieren-TX ist C4d eine wichtige diagnostische Komponente des Komplementsystems. C4d ist der am häufigsten verwendete Marker für die Nieren-Biopsie, um eine humorale Rejektion nach Nieren-TX zu diagnostizieren. Das Fragment entsteht nach der Spaltung der C4b-Komponente durch Faktor I, ein Regulator für die C3-Konvertase gegen übermäßige Aktivierung. C4d ist ein katalytisch inaktives Fragment, das im Gegensatz zu C4b stabil bleibt. Das C4d-Fragment ist wahrscheinlich in der Nähe oder direkt zu dem Ag-AK-Immunkomplex kovalent an Endothelzellen und an der Basalmembran der Gefäße gebunden [33]. C4d-Färbungen von Nierenbiopsien (Banff-Klassifikation [34]) und C4d-Färbungen in der Durchflusszytometrie werden zur Evaluation einer potentiellen Nierenrejektion verwendet. Die C4d-Biopsie korreliert klinisch und pathoanatomisch mit einer Antikörper-vermittelten Rejektion [35].

1.4 Transplantatabstoßung und Monitoring nach Nieren-TX

Bei einem optimalen Verlauf der Nieren-TX nimmt das Transplantat noch intraoperativ seine Funktion auf. Innerhalb der ersten 3-4 Tage normalisiert sich dann die Kreatinin-Serum-Konzentration als Zeichen der aufgenommenen Funktion. In den ersten drei Monaten können verschiedene Ursachen auftreten, die die Funktionsaufnahme verzögern oder eine bestehende Funktion verschlechtern können [2,36]. Einige davon sind: hämodynamische Ursachen, akutes Transplantatversagen wegen langer Ischämiezeit, Nierenvenenthrombosen, Ureterobstruktion und (zahlenmäßig) nicht an letzter Stelle steht die akute Rejektion. Eine akute Rejektion kann eine T-Zell- und/oder Antikörper-/B-Zell-vermittelte Immunantwort des Empfängers gegen Antigene des Transplantates sein, die zu einer Funktionseinschränkung führt. Über 85% der akuten Rejektionen ereignen sich in den ersten drei Monaten nach TX. Im Gegensatz zu den sehr seltenen hyperakuten Rejektionen, bei denen präformierte Antikörper bereits intraoperativ durch eine Komplement-vermittelte Zell-Lyse und schwerste Entzündungsreaktion einen irreversiblen Transplantatschaden induzieren, tritt die akute Rejektion nicht vor dem 5. postoperativen Tag auf. Diese fünf Tage sind die minimale Zeitdauer für eine Aktivierung der Immunantwort. Durch die heutigen immunsuppressiven Regime ist die Rejektionshäufigkeit auf 10-30% gesenkt. Jede Rejektion schädigt das Transplantat, sodass eine Rejektion frühzeitig diagnostiziert und adäquat behandelt werden sollte. Über eine chronische Rejektion wird innerhalb der ersten sechs Monaten nach Nieren-TX gesprochen. Die Diagnostik nach TX umfasst eine Beobachtung der Funktion der Niere (Ansteigen der Kreatinin-Konzentration im Serum, eventueller Rückgang der Diurese, Abnahme der Durchblutung des Nierenparenchyms) und Durchführung einer Biopsie. Der Schweregrad der Nierentransplantatrejektion wird nach der Banff-Klassifikation eingestuft [34]. Ein wichtiger Punkt für die Charakterisierung einer Antikörper-vermittelten Rejektion ist der immunologische Nachweis der Komplement-Komponente C4d in den peritubulären Kapillaren [2]. Dieser Nachweis erfolgt mittels einer invasiven Diagnostik: der Nierenbiopsie. Die Nierenbiopsie ist eine Nadelpunktion eines Nierentransplantats, zur Feststellung der Art der pathohistologischen Veränderung als Ausgangsbasis für Therapieentscheidungen und die Prognosebeurteilung. Etwa 30% aller Rejektionen sind C4d-positiv. Sie gehen signifikant mit bis zu 30 % schlechteren 1-Jahres-Funktionsrate einher als C4d-negative Rejektionen. C4d ist derzeit ein routinemäßig eingesetzter Biomarker zur Detektion der Rejektionen [37-39]. Als solcher wird er ebenso nach Pankreas-TX benutzt [40]. Es wird berichtet, dass das

1. Einleitung

schlechteste Überleben bei der Kombination von C4d-positiver Biopsie mit dem Nachweis DRA (donorreaktive HLA-AK) zu beobachten ist. Böhmig untersuchte mehr als 100 Nieren-Biopsien und korrelierte sie mit im Serum vorhandenen DRA. Die Ergebnisse zeigen, dass C4d-positive Biopsien ein spezifischer Marker für Antikörper-vermittelte Rejektion sind [41]. Es gibt aber Angaben, dass bei einigen Patienten mit humoraler Rejektion keine DRA im Serum detektiert werden, da diese am Transplantat gebunden sind [33]. Es gibt ebenso C4d-negative Biopsien bei Patienten mit Antikörper-vermittelte Rejektion (AMR- *antibody mediated rejection*) [42,43]. Außerdem ist die Interpretation der C4d-Biopsien stark von der verwendeten Technik abhängig und von der Nieren-Region, aus der die Biopsie-Probe entnommen wurde [44]. Derzeit wird nach einem in vitro-Test gesucht, der als Biomarker für eine Rejektion dienen kann, einfach durchzuführen ist, nicht kostenintensiv, möglichst nicht invasiv ist (keine Biopsie erfordert), hoch spezifisch und sensitiv ist und in der Lage ist, eine klinisch relevante Reaktion beim Transplantat so früh wie möglich zu detektieren [45].

1.5 Detektion von HLA-AK: Übersicht

Die Rolle der donorspezifischen HLA-AK vor Transplantation ist bekannt [46-49]. Sie sind klinisch relevant und mit einem schlechteren Überleben des Transplantates verbunden [50,51]. Terasaki berichtete, dass das Transplantatversagen nicht nur mit dem Vorhandensein von anti-HLA DRA korreliert, sondern auch mit dem Serum-Titer dieser AK [52]. Die führende Hypothese bei Nieren-TX ist, dass zytotoxische - gegen HLA-Ag gerichtete - DRA, eine hyperakute Rejektion hervorrufen können und deswegen eine Kontraindikation zur TX sind [10,53,54]. Auf diesen Studien basiert der Hinweis, dass zytotoxische HLA-AK klinisch relevant sind und ein Prediktor für eine akute Transplantat-Abstoßung sowie Funktionsverlust sind [54]. HLA-AK, die nicht donorspezifisch und zytotoxisch sind, werden hingegen für das Transplantatüberleben als fraglich relevant diskutiert [55]. Neuere Studien stellen die nicht zytotoxischen DRA als Kontraindikation zur TX in Frage und diskutieren deren Anwesenheit pre- und post-TX als Risiko-Faktor [56]. Historisch gesehen ist die erste Methode zur HLA-AK-Detektion die Lymphozytotoxizitäts-Methode (LCT). Dieser seit Ende der 1960 verwendete und bekannte LCT-Test ist aktuell die Standardmethode zum Nachweis von komplementaktivierenden (zytotoxischen) HLA-AK [10]. Dabei wird ein Panel von Spender-

1. Einleitung

Lymphozyten verwendet, gegen deren HLA-Ag die HLA-AK des Empfängers reagieren können. Eine Lyse der Lymphozyten würde eine zytotoxische Aktivität der AK zeigen. Schwachpunkte dieser Methode sind die niedrige Sensitivität (schwache zytotoxische AK werden nicht erfasst) und die begrenzte Möglichkeit in einer zeit- und personalaufwändigen Testung, die genaue Spezifität der AK zu definieren, besonders bei Vorhandensein von polyspezifischen HLA-AK oder HLA-Klasse II-AK [57]. Weiterhin falsch positive Reaktionen nach Gabe von antilymphozytären Medikamenten (Rituximab, ATG), Vorliegen von non-HLA-AK, Auto-AK, sowie die Abhängigkeit von der Qualität der isolierten T- und B-Lymphozyten [58]. Im LCT wird die Komplementaktivierung durch einer Zelllyse der B- und T-Lymphozyten sichtbar gemacht. Hier könnte vermutet werden, dass komplementaktivierende HLA-AK, die keinen ausreichenden Titer aufweisen, keine Zelllyse verursachen und nicht erkannt werden. Bemühungen, die Sensitivität des klassischen LCT zu erhöhen, um eine Transplantatabstoßung zu vermeiden und einen für die Routinediagnostik stabilen Test zu entwickeln, führte letztendlich zur Entwicklung von Festphasentests (*Solid phase Assays- SPA*) wie ELISA und Luminex . Hier werden lösliche HLA-Moleküle, fixiert an festen Phasen wie ELISA-Platten oder Mikrosphären-Kügelchen (Beads), als Ziel-Ag verwendet. Die Luminex-Methode ist die derzeit am meisten verwendete Methode [59,60]. Grund dafür ist die höhere Sensitivität als die des LCT. Diskutierter Schwachpunkt von Luminex und ELISA ist, dass hier die Detektion von HLA-IgG-AK, unabhängig von ihrer Komplementbindungsfähigkeit, erfolgt [61]. Smith et al. berichten aber, dass Patienten mit DRA, die nur im Luminex detektiert werden, ebenso wie DRA, die im LCT positiv sind, ein sehr hohes Risiko zur Transplantat-Rejektion haben [62]. Andere Arbeitsgruppen finden hingegen keine signifikante statistische Korrelation zwischen Luminex-AK und Rejektion [63]. Problem bei der Luminex-Technologie, wie auch bei der klassischen Durchflusszytometrie, ist die teilweise schwierige Abgrenzung zwischen positiven und negativen Reaktionen („Cut off“- Definition). Das kann zu unterschiedlichen Ergebnissen in verschiedenen Laboratorien führen. Außerdem bleibt die Frage nach der klinischen Relevanz dieser IgG-AK offen mit dem Hintergrund, dass der Test sehr sensitiv ist und nach vielen Meinungen oft sehr viele AK detektiert [64,65]. Die klinische Relevanz der HLA-AK Befunde, die mit diesen sensitiven Techniken erhoben werden, steht derzeit im Mittelpunkt der Diskussion darüber, welche HLA-AK Spezifitäten mit welchen Nachweisgrenzen (*Cut-off*) in die Entscheidung für oder gegen Transplantation einbezogen werden [66]. Besonders in

1. Einleitung

Frage gestellt wird die Relevanz dieser AK-Spezifitäten, die im LCT negativ und Luminex positiv sind [55]. Die gute Korrelation des LCT zur Transplantatabstoßung legt nahe, dass in vitro detektierte zytotoxische HLA-AK auch in vivo zu einer inflammatorischen Reaktion mit der Folge einer Transplantatschädigung führen. Deswegen müssen die zytotoxischen HLA-AK berücksichtigt werden. Im Gegensatz dazu führt der Nachweis donorspezifischer SPA-AK nicht in jedem Fall zur akuten Transplantatabstoßung [63,67]. Um also die klinische Relevanz von diesen SPA HLA-AK zu erforschen, können die Immunglobulinklassen IgG1, 2, 3,4 bestimmt werden [68]. Die bisherigen Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen dazu haben-wie einleitend beschrieben-zum Teil zwar eine Korrelation gezeigt, aber nicht in dem Maße, dass diese Nachweismethoden praxisrelevant wurden [69]. Ein weiterer Weg ist der Nachweis der Komplementbindungsfähigkeit der SPA HLA-AK. Ein Durchbruch in der Luminex-Methodik hat Wahrmann mit einer Modifikation der Methode zum Nachweis von C4d-bindenden HLA-AK gemacht [70]. Solche Modifikationen könnten eine Lösung für die oben beschriebene Problematik bei der Evaluation der klinischen Relevanz von HLA-AK sein, die im LCT oder mit Festphasentechniken bestimmt werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Monitoring von de novo SPA HLA-AK als Biomarker für eine humorale Immunantwort in der Spätphase nach Nierentransplantation ist aktuell in einer wachsenden Zahl von Transplantationszentren bereits geübte Praxis. Es dient derzeit als ein Hinweis auf das Risiko einer chronischen Transplantatfunktionsverschlechterung. Offen ist die Frage, welcher Patient wann und mit welcher Therapie behandelt werden muss, um diesen Prozess aufzuhalten.

Es wurden folgende Ziele in der vorliegenden Arbeit definiert:

1. Modifikation des Luminex-Tests zur Detektion von HLA-AK mit zytotoxischem Potenzial, über die Detektion von C4d-Komplementspaltprodukten.
2. Evaluierung dieser neuen Modifikation für die Routinediagnostik.
3. Prüfen der klinischen Relevanz der im C4d-Luminex detektierten komplementaktivierenden HLA-AK. Die Analyse erfolgt an Beispielen von Patienten in der Spätphase nach Nierentransplantation.
4. Vergleich des C4d-Luminex-Tests mit dem LCT-Test in einer retrospektiven Untersuchung von HLA-AK bei 261 Patienten in der chronischen Phase (mind. 6 Monate nach TX) nach Nieren-Transplantation mit guter Transplantatfunktion.

2. Materialien und Methoden

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Pufferlösungen und Geräte

Es wurden folgenden Materialien und Geräte verwendet:

PBS-Puffer	GIBCO
Waschpuffer (Bestandteil von Testkit für Luminex)	One Lambda
Ethanol 70 %	Herbeta Arzneimittel
Natrium hypochlorid 12%	Roth
Liqui Chip [®] System Fluid 10x concentrate	Qiagen
LABScan [™] 100 Flow-Analyser	Luminex
Thermomixer comfort	Eppendorf
Plattenschüttler	Grant-bio
Zentrifuge 5804, Rotor 16,1 cm	Eppendorf
Mikrotiterplatten 96 Well	greiner-bio.one
Plastik-Tubes 1,5 mL	Eppendorf
Glasröhrchen 3 mL	Medion Grifols Diagnostics AG
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf

2.1.2 Antigenbeschichtete Beads, Komplementquellen und diagnostische Antikörper

Antigenbeschichtete Beads

Für den Nachweis der Antigen-Antikörper Reaktion werden in der Luminex Technologie farbkodierte Mikrokügelchen (*Beads*) LABScreen® verwendet, die mit gereinigten HLA-Antigenen beladen sind. Der Test wird in drei Konfigurationen hergestellt. In dieser Arbeit wurden zwei von diesen drei Konfigurationen verwendet: Screening-Test Luminex Mix und Luminex Single Antigen Test I und II. Für den Screeningtest zur qualitativen (positiv/negativ) HLA-AK-Bestimmung sind die *Beads* mit lyophilisierten Antigenen aus Zellkulturen beladen, die entweder HLA-Klasse I-Merkmale (HLA-A, B und C) oder HLA-Klasse-II-Merkmale (HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) tragen. Bei dem Luminex Single Antigen Test I und II (SAI, II) sind die *Beads* nur mit einer Antigen-Spezifität beladen (z.B A*24:02). Für die Optimierung des neuen C4d-Luminex-Tests und für die Austestung der Patientenproben wurden folgende *Beads* Chargen verwendet (Tabelle 1):

Tabelle 1: *Beads-Chargen*, verwendet in dieser Studie für den C4d-Luminex-Test.

Bezeichnung	Charge
LSM MIX	LABScreen® Mixed Beads Mix LOT.016
LS SA I	LABScreen® Class I Single Antigen Beads LOT.006
LS SA II	LABScreen® Class II Single Antigen Beads LOT.008

Komplementquellen

Für die Komplementreaktion wurden drei verschiedene biologische Quellen verwendet: Frisches Serum von HLA-Antikörper-negativen Blutspendern (FS), humanes lyophilisiertes käufliches Komplement (in der Arbeit als HC abgekürzt) und Komplement aus Kaninchenserum (s.Tabelle 2).

2. Materialien und Methoden

Tabelle 2: Komplementquellen

Komplementquelle	Firma
Frisches humanes Serum (FS)	Gewinnung, Aufbewahrung s. Punkt 2.1.3
Humanes lyophilisiertes käufliches Komplement (HC)	LOT.906680 Quidel
Lyophilisiertes Komplement aus Kaninchenserum	Biotest (jetzt Biorad)

Laut Hersteller Biotest sind folgende Konzentrationen für die Komplementkomponenten im HC gemessen worden (Tabelle 3):

Tabelle 3: Konzentration der Komplementkomponenten, gemessen in HC (Angaben des Herstellers).

Komplementkomponent	Konzentration
C4d	8,142 µg/mL
C3a	798,7 ng/mL
C5a	14,99 ng/mL
Sc 5b-9	708,7 ng/mL
CH 50	121,3 UEq/mL
C3b	21,82 µg/mL

Diagnostische Antikörper

Als Detektionsantikörper im Test wurden verschiedene anti-humane-C4d-Antikörper verwendet und ausgetestet (s. Tabelle 4). Als Sekundärantikörper wurde ein Fluorophor-markierter Ziege-gegen-Maus IgG-PE AK eingesetzt.

Table 4. Diagnostische AK, verwendet im C4d-Luminex-Test.

Name der AK, Hersteller	Beschreibung
Anti-C4d-AK AbD Serotec	Maus anti-human C4d (Neoantigen), monoklonal, Klone 057-51.5.1.6, Isotyp IgG1, Konzentration 1 mg/mL
Anti-C4d-AK Biomedica	Maus anti-human C4d, polyklonal, BI-RC4D, Konzentration 0,2 mg/mL
Anti-IgG-RPE Southern Biotech	Ziege anti-Maus IgG-PE, Konzentration 0,5 mg/mL
STAR 76 AbD Serotec	Ziege anti-Maus IgG: RPE, polyklonal
DyLight™ 549 Biomedica	Konjugierte anti-human C4d-Antikörper, Polyklonales Kaninchenserum

2.1.3 Bearbeitung und Aufbewahrung der biologischen Proben

Alle Seren, für den C4d-Luminex-Test werden nach der Blutentnahme zentrifugiert (15 Min 2700U/Min, Rotor 16,1 cm), aliquotiert in je 500 µL und bei -30°C eingefroren. Die Kontrollseren für den täglichen Bedarf werden bei 37°C aufgetaut und danach weiter bei 4°C, bis zum Verbrauch der aufgetauten Menge, gelagert. Vor dem Testansatz werden die Seren 30 Min bei Raumtemperatur temperiert, um die Reaktion Ag-AK zu verbessern.

Die Seren, die als Komplementquelle verwendet werden, werden 30 Min nach der Abnahme zentrifugiert, in je 100 µL aliquotiert und sofort bei -70°C eingefroren, weil bekannt ist, dass die Komplementaktivität bei Aufbewahrung bei RT oder zwischen +4 und -22°C, nachlässt. Ebenso ist bekannt, dass wiederholtes Auftauen und Einfrieren das Komplement zerstört [71]. Für die Verwendung als Komplementquelle wird die benötigte Menge kurz vor dem Gebrauch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut (kurz nach dem Auftaupunkt) und sofort auf Eis gelagert, um eine Komplementaktivierung vor der Herstellung der im Test verwendeten Verdünnung des Serums, zu vermeiden. Die Auftaughtechniken wurden ausgetestet.

2.2 Methoden

2.2.1 Lymphozytotoxizitätstest (LCT)

Testprinzip

Wie schon in der Einleitung erwähnt, die erste Methode zur HLA-AK-Detektion ist die Lymphozytotoxizitäts-Methode (LCT). Der Test wird seit Ende der 60'er Jahre verwendet und ist derzeit die Standardmethode zum Nachweis von komplementaktivierenden (zytotoxischen) HLA-AK [10]. Im LCT werden primär komplementabhängige HLA-AK erkannt, die zur Zellyse der Lymphozyten führt. Der Nachweis von lymphozytotoxischen Antikörpern dient zur Erkennung von transplantationsrelevanten Antikörpern in der Rejektionsdiagnostik. Die Zellen werden dabei als Ersatz für die Donor-Ag verwendet. Diese Zielzellen werden als Panel von 57 Spender-Lymphozyten (zusätzlich drei Kontrollen) ausgewählter Blutspender mit bekannten HLA-Antigenen angesetzt. Die in unserem Labor verwendeten Zellplatten sind Lymphoscreen Class II und Antigen Tray Class I (Hersteller Biotest und One Lambda). Die Auswahl der Panelzellen erfolgt so, dass möglichst alle HLA-Spezifitäten repräsentiert sind, möglichst in der Frequenz der untersuchten Population. Die komplementfixierenden HLA-Antikörper einer bestimmten Spezifität binden an den Lymphozyten mit den entsprechenden HLA-Antigenen. Das Komplement lagert sich dann an den Antigen-Antikörper-Komplex an und lysiert die Zelle. Nach Zugabe des Zwei-Komponenten-Fluoreszenzfarbstoffes, färbt Ethidiumbromid die lysierten Zellen rot und Acridinorange die vitalen Zellen hellgrün. Die Beurteilung der Reaktionsstärke (Verhältnis von vitalen zu toten Lymphozyten) erfolgt unter einem Invert-Fluoreszenzmikroskop und wird in *Score*-Stufen angegeben (s. Tabelle 5). Die *Score*-Werte 6 und 8 weisen auf starke Positivität hin, *Score*-Stufen 4 und 2 auf schwach positive Reaktionen, und die *Score*-Wert 1 bezeichnet die negativen Reaktionen. Aus dem Reaktionsmuster (Antigenmuster) wird so die AK-Spezifität ermittelt. Hier werden IgG und IgM-AK detektiert. Eine IgM-Spezifität kann viele non-HLA-AK aufweisen. Um die Reaktion der Immunoglobulin-Klassen IgG und IgM der reagierenden AK unterscheiden zu können, werden zwei parallele Testansätze ohne bzw. mit Dithiotreitol (DTT) durchgeführt. DTT reduziert primär die Disulfidbrücken des pentameren IgM-Moleküls (auch von einigen IgG-AK) und somit werden im Ansatz mit DTT im Wesentlichen nur IgG-AK nachgewiesen. Mit einem Computerprogramm (Lambda Scan-

2. Materialien und Methoden

Software) lässt sich bei der Auswertung die Summe der positiven zytotoxischen Reaktionen als prozentualer Anteil des Panelumfangs angeben (PRA%- Prozent “*panel reactive antibodies*“). Die Panelreaktivität zeigt die prozentuelle Wahrscheinlichkeit einer positiven serologischen Kreuzprobe mit einem beliebigen Spender an. Folgende Score-Tabelle nach TERASAKI zeigt die Bewertung der Reaktionsstärke im LCT (Tabelle 5).

Tabelle 5: Score-Werte bei der Auswertung vom LCT-Test

Anteil toter Zellen	TERASAKI Score	Bewertung
0-15%	1	negativ
16-35%	2	schwach positiv
36-50%	4	schwach positiv
51-80%	6	positiv
81-100%	8	positiv
	0	nicht auswertbar

Die LCT-Testung wird im Labor mit zwei verschiedenen Lymphozytenpopulationen vorgenommen: ungetrennte Lymphozyten (B- + T-Lymphozyten, Gesamtzellen, G-LCT) und isolierte B- und T-Lymphozyten (B-LCT, T-LCT). Mit ungetrennten Lymphozyten werden HLA-Klasse I-AK nachgewiesen, mit isolierten B-Lymphozyten Klasse I + II HLA-AK. Die T-Zellen exprimieren nur Klasse I-Ag und sind somit als isolierter Ansatz ebenso informativ. Der B-LCT hat sich als sensitiver als G-LCT erwiesen, da sie mehr HLA-Klasse II Proteine an der Oberfläche tragen. Ein Problem bleibt die oft sehr schwierige Auswertung des LCT-Tests.

2.2.2 Luminex-Technologie allgemein

Testprinzip

Die derzeit meist verwendete Festphasen-Methode zur HLA-AK Detektion ist die Luminex-Methode [59]. Diese durchflusszytometrische Technik wird aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Differenzierungskapazität zur HLA-Antikörperanalyse bei allosensibilisierten Patienten

2. Materialien und Methoden

zur Erstellung eines Patientenprofils (Antikörperprofil), bei bekannten oder vermuteten Sensibilisierungsereignissen wie z.B. nach Transplantationen, Transfusionen oder Schwangerschaften eingesetzt. Die Luminex-Technologie basiert auf der Mikropartikeldurchflusszytometrie, bei der anstelle von Zellen, Mikropartikel (Beads mit 2-6 µm Durchmesser) eingesetzt werden. Die Beads sind farbkodiert (haben eigene Fluoreszenzen) und sind mit gereinigten HLA-Antigenen beladen. Zum Nachweis erfolgt die Quantifizierung der Mikropartikelbindung der Anti-HLA-AK des Testserums durch Fluorophor-markierte anti-human-IgG-Sekundärantikörper [72]. Das Luminex Messgerät hat zwei Laser: der erste erkennt die farbkodierten Beads, der zweite: die darauf gebundenen sekundären AK mit Fluorophor-Phycoerythrin.

Dieser Festphasen-Test weist AK aller IgG-Subklassen nach, ohne zu unterscheiden, ob sie zytotoxisch reagieren oder nicht und weist eine höhere Sensitivität auf als der LCT. Für einen einzelnen Test können bis zu 100 verschiedene Beads in einer Suspension (Beadspopulation) kombiniert werden. In dieser Suspension sind außer spezifischen Beads auch zwei Kontrollbeads vorhanden: Ein Negativkontrollbead (NC) sowie ein Positivkontrollbead (PC). Die NCs sind nicht mit HLA-Ag beladen. Der Fluoreszenzwert kann aufgrund der nicht-spezifischen Bindung der Seren schwanken. Die PCs sind mit gereinigtem human-IgG beladen. Sie erzeugen immer ein positives Signal. Die farbkodierten und mit Antigen beladenen Beads werden in einem zwei-Laser-Durchflusszytometer „Luminex“ (One Lambda) mit hohem Partikeldurchsatz analysiert. Nach Inkubation des Testserums mit den Beads und nachfolgenden Waschschritten erfolgt die Zugabe der Antikörper-Fluorochrom-Konjugate. Nach weiteren Waschschritten wird die Detektion im Luminex-Gerät durchgeführt. Die Auswertung orientiert sich an den Kontrollen und erlaubt eine Positiv/Negativ Differenzierung. Es gibt verschiedene Ansatzmöglichkeiten mit unterschiedlichem Auflösungs-niveau. Der Luminex Screening Test (LSM, auch Luminex-Mix genannt) verwendet Beadpopulationen, die mit Ag der Klasse I (A, B und C) oder der Klasse II (DRB1, DQB1, DQA) beschichtet sind und ermöglicht so nur die qualitative Aussage ob HLA-AK positiv oder negativ sind. Im Mix werden 12 Beadpopulationen für Klasse I und 6 für Klasse II verwendet. Jede Bead-Gruppe trägt die Ag von drei verschiedenen Zellen. LSM dient als Screening-Test in der Routine-Diagnostik. Der Einzelantigen-Test (Single Antigen-Test, LS SA I, II) erlaubt die exakte Spezifizierung der

2. Materialien und Methoden

HLA-AK und wird bei hochimmunisierten Patienten eingesetzt. Bei Luminex SA ist jede Beadpopulation mit Ag einer Spezifität beschichtet. Für SA I werden 98 Ag-Spezifitäten verwendet, für SA II- 96 Ag-Spezifitäten. Nach der Messung erfolgt der Transfer der Messdaten von der Luminex-Software zur Software „Fusion“ des Kitherstellers. Damit wird die Analyse der Daten vorgenommen.

Bewertungskriterien

Für jeden *Bead* muss der *Bead Count* über 50 liegen. Der *Bead Count* ist die Anzahl der Beads aus einer Gruppe (gleiche Ag-Beschichtung), die bei der Fluoreszenz-Messung gezählt wurde. Laut Hersteller soll der NC-Bead für Luminex Mix Test < 500 Mittlere Fluoreszenzeinheiten (MFI) liegen. Für Luminex SA soll der NC < 1500 MFI liegen. Der PC soll über 500 MFI und mindestens den doppelten NC-Wert betragen. Der Test ist plausibel, wenn alle eigenen HLA-Ags des Patienten negativ sind, das heißt es sind keine Auto-AK vorhanden. Die Fälle, wo einige Eigenantigene positiv reagieren, sind solche mit gegen bestimmte Allele gerichtete HLA-AK (allelspezifische AK).

Interpretation der Ergebnisse

Außer den Bewertungskriterien gibt es wichtige Software-unterstützte Berechnungen, die bei der Entscheidung Positiv/Negativ mitwirken. Für den LSM ist die NBG-Ratio (Normalisiertes Hintergrundverhältnis zur Ermittlung der Stärke jeder Anti-HLA-Reaktion) wichtig. Dieser Wert bezeichnet die Entscheidungsgrenze zwischen negativen und positiven Reaktionen. Luminex Mix Test Berechnung:

$$\text{NBG-Ratio} = \frac{S\#N - (\text{SNC-Bead})}{BG\#N - (\text{BGNC-Bead})}$$

Die Ratio berechnet sich von der Division des korrigierten Wertes des jeweiligen Beads durch den korrigierten Wert für denselben Bead, inkubiert mit Negativserum.

Legende:

S#N: Probenspezifischer Fluoreszenzwert für den jeweiligen Bead

SNC-Bead: Probenspezifischer Fluoreszenzwert für den Negativkontrollbead

BG#N: Fluoreszenzwert des Negativserums für den jeweiligen Bead

BGNC-Bead: Fluoreszenzwert des Negativserums für den Negativkontrollbead

2. Materialien und Methoden

Eine NBG-Ratio von $> 3,0$ gilt als eindeutig positiv, eine Ratio zwischen 1,2 und 3,0 als nicht sichere "Grauzone" und eine Ratio $< 1,2$ als negatives Signal (Abb.5). Diese Empfehlungen der Firma One Lambda wurden im eigenen Labor validiert.

In Abbildung 5 wird beispielsweise ein Ausschnitt aus der Auswertungssoftware bei Luminex-Mix gezeigt.

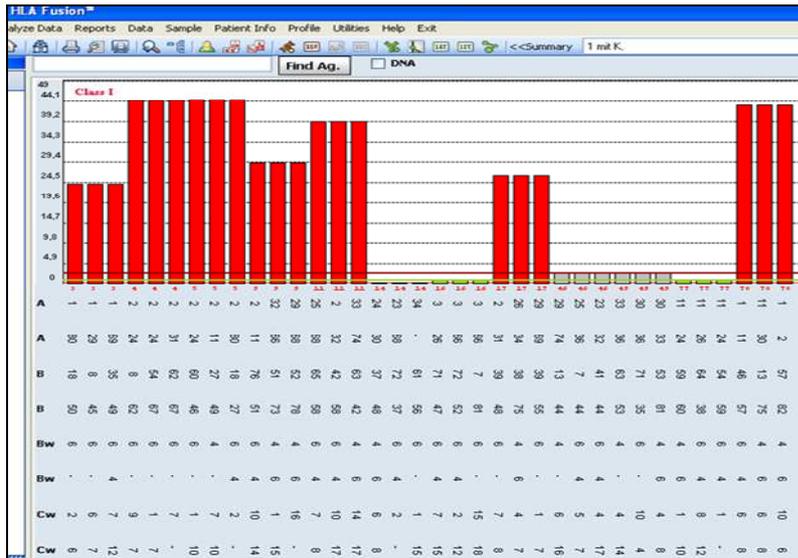


Abbildung 5. „Screenshot“ aus Luminex Mix Fusion Software für HLA Klasse I. Gezeigt sind die Reaktivität der einzelnen Beadpopulationen und die Antigenbeladung der Beads. Die roten Balken bezeichnen die positive Reaktion.

Auf der X-Achse sind die einzelnen Beads einer Beadpopulation nach Nummer (rote Zahlen) eingetragen und gruppiert. Darunter ist die Antigenbeschichtung des einzelnen Bead für HLA-A, B, Bw und Cw gezeigt. Jedes Mikropartikel ist mit zwei HLA-A Ag, zwei B, zwei Cw und Bw Antigenen beschichtet (für Klasse I), was der realen Situation auf der Zelloberfläche entspricht. Insgesamt werden bei dem Mix-Test zwölf verschiedene Beadpopulationen vom Hersteller angeboten. Auf der Y-Achse ist die Reaktionsstärke der Beads gezeigt, wobei nicht die MFI sondern die NB-Ratio als Zahl eingetragen ist. Die rote Linie zeigt die, „Cut off“-Grenze mit der Ratio von 3.

Die Reaktionsstärke für Luminex SAI und SII wurde durch die Score-Wert (Reaktionen (Rxn) X8, X6, X4) bestimmt. Die Bezeichnungen X8, X6 usw. ähneln den Score-Stufen beim

2. Materialien und Methoden

LCT-Test. Es werden X8 und X6 als positiv gewertet, X4 gilt als grenzwertig, wobei hier die MFI Signalstärke wichtig ist. Zur Beurteilung der Antikörperspezifisierung müssen die HLA-Typisierung der Patienten, Angaben zur Grunderkrankung, Transplantationen und andere Sensibilisierungsereignisse, wie Transfusionen, Schwangerschaften, berücksichtigt werden. Als Entscheidungsgrenze (Cut off) von Hersteller gelten die 500 MFI-Grenzen, wobei die immunologische Grenze nach individueller Einschätzung der immunologischen Patientenhistorie variiert. Die Cut off-Problematik beim Luminex-Test ist weit bekannt [65]. Ein Konsensus ist noch nicht erreicht. Für Luminex-SA weiten sich die Cut off-Grenzen von 500 MFI bis zum über 5000 MFI aus in den verschiedenen Laboren.[73].

Bei dem Single Antigen Test wird die Auswertung nach der Reaktionsstärke (X8, X6) durchgeführt (s.Abbildung 6)

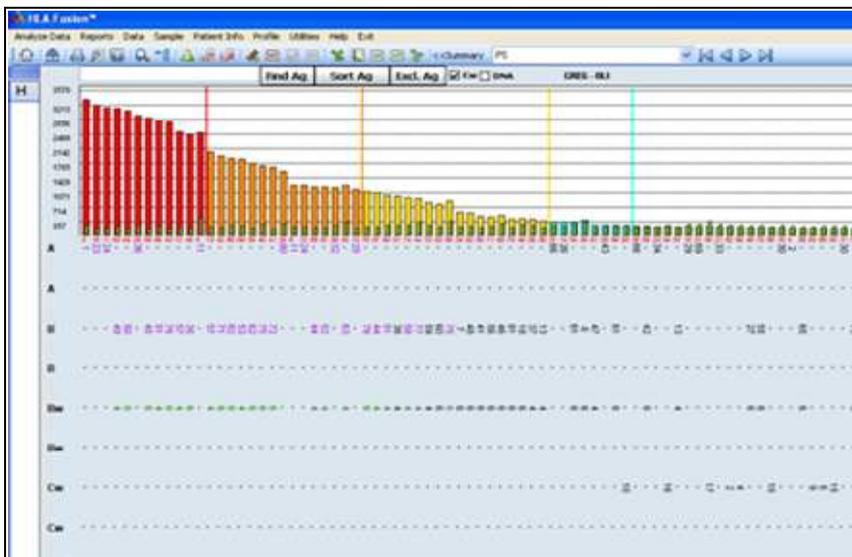


Abbildung 6. „Screenshot“ aus Luminex SA I Fusion Software für HLA Klasse I. Die roten Balken entsprechen die positiven Reaktionen mit X8, die orangenen- X6-, die gelben- X4-Stärke der Reaktion.

Auf der X-Achse sind die einzelnen Beads eingetragen und nach Reaktionsstärke gruppiert. Auf der Y-Achse werden die MFI gezeigt. Jeder Bead aus einer Beadpopulation ist mit einem einzigen HLA-Antigen-Typ beschichtet (z.B mit A2). Die Zahlen unter den farbigen Balken zeigen die Zugehörigkeit zu den jeweiligen HLA-Klassen A, B, Cw, Bw. Die roten Balken bezeichnen die positiven Beads mit der größten MFI und Reaktionsstärke X8. Die orangenen

2. Materialien und Methoden

Balken zeigen positive Reaktionen mit X6 und die gelben Balken die X4-Reaktionen. Richtig negativ sind die Beads, die mit grün bezeichnet sind.

2.2.3 Der Luminex C4d Test

Testprinzip

Die Festphasentechnik Luminex ist die sensitivste und die am häufigsten verwendete Methode zum Nachweis von HLA-AK [59]. Die Technik unterscheidet nicht zwischen komplementaktivierenden und nicht komplementaktivierenden HLA-AK. Tatsache ist, dass die Relevanz der nachgewiesenen IgG-AK im Luminex noch nicht vollständig geklärt ist und dass der Test sehr sensitiv ist. Wir haben uns als Ziel gesetzt, die Luminex Methode zu modifizieren und damit für die bessere Charakterisierung der AK beizutragen.

Als Idee für diesen Test diente das Protokoll der Arbeitsgruppen Wahrmann [70] und Smith [62]. Das Prinzip der Methode basiert auf dem in der Routinediagnostik eingesetzten Standard Luminex-Test und unterscheidet sich durch die im Test eingesetzten Detektionsantikörper und einem zusätzlichen Schritt mit dem Zufügen von Komplement. Bei dieser Methode wird eine Komplementaktivierung wie im Körper ausgelöst und durch den Nachweis der C4d-Komplementkomponente mittels eines anti-C4d-AK diese Aktivierung detektiert. Die Komplementaktivierung erfolgt durch HLA Ag-AK-Komplexe, die sich bei der Inkubation zwischen den mit Ag beladenen Beads und im Serum enthaltenen HLA-AK bilden. Nach der Aktivierung der Komplementkaskade auf dem klassischen Weg und der Bildung von C1q, wird C4 in C4a, C4b und C4d gespalten. C4b bleibt, als Bestandteil der C3-Konvertase, an dem Immunkomplex gebunden. Der C4d-Fragment ist wahrscheinlich in vivo kovalent an den Endothelzellen und an der Basalmembran der Gefäße gebunden, in der Nähe oder direkt zu dem Ag-AK-Immunkomplex. In vitro bindet C4d eher am Immunkomplex oder auf dem Bead [33]. Mittels Maus anti-C4d-AK werden die gebundenen C4d-Komponenten detektiert und weiter durch Peroxidase markierte Ziege-anti-Maus-AK, im Luminex nachgewiesen. Der C4d-Luminex-Test ist sensitiver und bietet eine bessere Differenzierung der zytotoxischen HLA-AK-Spezifitäten als der LCT-Test [66]. Durch die Verwendung von humanem Komplement nähert sich der Test mehr der in vivo ablaufender Reaktion.

Beschreibung der C4d-Methode

Die zu untersuchenden Patientenseren, positive Kontrollseren (PKS) und negatives Kontrollserum (NKS) werden zuerst für 30 min bei 56°C inkubiert (Inaktivierung), um noch vorhandene aktive Komplementkomponenten zu inaktivieren und eventuelle Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Nach Inaktivieren werden die Proben auf Eis abgekühlt und bis zum Ansatz bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Ansatz werden alle Reagenzien und Patientenseren bei Raumtemperatur (RT) mindestens 15 Min temperiert.

Es werden 3 µL Beads (Mix, SAI oder SAI Beads) auf eine leere Mikrotiterplatte pipettiert und 20 µL unverdünntes Patientenserum zugefügt. Bei jedem Testansatz werden zusätzlich NKS und PKS mitgeführt, um die Auswertbarkeit des Ansatzes zu prüfen. Die Platte wird 30 min bei RT auf einem Plattenschütter inkubiert. Bei diesem Schritt findet die Ag-AK-Reaktion zwischen HLA-Ag und HLA-AK statt, die auf der Beadoberfläche abläuft. Um überschüssige AK zu entfernen, werden zu jeder Kavität 200 µL PBS als Waschpuffer pipettiert und die Platte 4 Min zentrifugiert. Der Überstand wird durch Ausschütteln der Platte entfernt. Am Boden der Kavitäten bleiben die Komplexe von Beads und AK haften. In der Zwischenzeit wird die Komplementquelle vorbereitet. Bei der Verwendung von frischem Serum als Komplementquelle (FS) wird das Serum unverdünnt 20 µL/ Kavität pipettiert. Bei der Verwendung von käuflichem Serumkomplement (HC) wird das Komplement aufgetaut (37°C) und 1 µL davon in 20 µL PBS (1:21) verdünnt und in die Kavität pipettiert. Es folgt eine Inkubation für 30 min bei RT auf dem Schüttler. In diesem Schritt werden die komplementaktivierenden HLA AK, (wenn vorhanden), die Komplementkaskade starten. Das gebildete C4d bindet an Ag-AK Komplex. Nach zwei weiteren Waschschrritten werden die Detektionsantikörper vorbereitet. Der Maus-AK gegen humanes anti-C4d wird 1:80 in Waschpuffer (WP) verdünnt und 20 µL/Kavität werden pipettiert. Nach 30 Min Inkubation bei RT und einem Waschschrtritt wird der Zweit-AK Ziege-gegen-Maus anti-IgG-RPE 1:500 verdünnt und pipettiert. Die Inkubation verläuft bei 4°C für 20 Min. Nach zwei weiteren Waschschrritten werden 80 µL/Kavität PBS in die Platte pipettiert und die Ergebnisse im Luminex Gerät gemessen. Alle Inkubationsschritte verlaufen im Dunkeln.

Testprotokoll der C4d-Methode

Schritt	Beschreibung
Antigen- Antikörper Reaktion	20 µl Serum bzw. Kontrolle zu 3 µL Beads pipettieren
Inkubation	30 Min bei RT
Waschen	1 x mit 200µL PBS; Zentrifugieren 4Min in 2500 U/Min mit Bremse
Zugabe von Komplement	20 µL Komplement bzw. Verdünnung pipettieren
Inkubation	30 Min bei RT
Waschen	2 x mit 200 µL PBS; Zentrifugieren 4Min in 2500 U/Min mit Bremse
Zugabe des Detektion-AK	20 µL /Kavität (1:80 in WP) verdünntes anti-C4d pipettieren
Inkubation	30 Min bei RT
Waschen	1 x mit 200µL PBS; Zentrifugieren 4Min in 2500 U/Min mit Bremse
Zugabe des Sekundär-AK	100 µL/Kavität (1:500 in WP) verdünntes anti-IgG-RPE pipettieren
Inkubation	20 Min bei 4°C
Waschen	2 x mit 200 µL PBS; Zentrifugieren 4Min in 2500 U/Min mit Bremse
Messen	80 µL PBS/ Kavität pipettieren und messen

Der Luminex C4d-Test wurde optimiert und validiert, indem Sensitivität, Cut off, Spezifität, die Plausibilität, Präzision und Testbedingungen überprüft wurden.

2.3 Biologische Proben, Patienten, Ethikkommission

2.3.1 Patientenkollektiv und Einschluss in die Studie

Es wurden Seren von insgesamt 261 Patienten aus der Spätphase nach Nierentransplantation untersucht. Die Kriterien für den Einschluss in die Studie waren: 1. Zeit mindestens 6 Monate nach der Transplantation und 2. eine gute Transplantatfunktion zum Zeitpunkt der Serumabnahme. Entsprechend dem HLA-Antikörperstatus zum Zeitpunkt der Abnahme (Austestung im Luminex) resultierten vier verschiedene Patientengruppen:

N/N: HLA-AK Klasse I negativ/ HLA-AK Klasse II negativ, n= 62 Patienten

N/P: HLA-AK Klasse I negativ/ HLA-AK Klasse II positiv, n= 63 Patienten

P/P: HLA-AK Klasse I positiv/ HLA-AK Klasse II positiv, n= 69 Patienten

P/N: HLA-AK Klasse I positiv/ HLA-AK Klasse II negativ, n= 67 Patienten

Die Seren wurden im Rahmen der regelmäßigen Screening-Untersuchungen (Verlaufskontrollen) nach Nieren-Transplantation gewonnen.

Es wurden folgende Patientendaten für die Auswertung gesammelt: HLA-Typisierung vom Spender und Empfänger, HLA-Antikörperstatus, Anzahl der Transplantationen, Transfusionen und Schwangerschaften, Serum-Kreatinin zum Zeitpunkt der Serumabnahme, Alter der Patienten. Diese Patientendaten stammen aus dem Labor-Informationssystem des HLA-Labors, Berlin Charité; der Eurotransplant, ENIS und der Patientendokumentation T-Base der Charité Transplantationszentren. Alle Patienten wurden anonymisiert, indem jedem Patientenserum (jeder Abnahme) eine Nummer zugeordnet wurde.

2.3.2 Testseren zur Optimierung der C4d-Methode

Für die Optimierung der Luminex C4d Methode wurden negatives Serum, positive Poolseren, einzelne Seren von LCT-positiven Patienten als Kontrolle und frisches Serum als Komplementquelle verwendet (s.Tabelle 6).

2. Materialien und Methoden

Tabelle 6. Testseren, die für die Optimierung und die Validierung des C4d-Luminex-Tests verwendet wurden.

Humanes Serum	Bezeichnung	Gewinnung Pool
Negatives Kontrollserum	NKS	Charge 20095844 (gepooltes Serum aus negativen Patienten)
Positives Kontrollserum 1	PKS1	Pool von 10 HLA-LCT positiven Patienten
Positives Kontrollserum 2	PKS 2	Pool von 4 HLA-LCT positiven Patienten
Positives Kontrollserum 3	PKS 3	Pool von 11 HLA-LCT positiven Patienten
Positives Kontrollserum von einem Spender	PKS-E	Serum von einer Person, die starke zytotoxische HLA-AK besitzt

Das negative Kontrollserum wurde als Poolserum von 10 Blutspendern des ITM, Charité Virchow Klinikum, hergestellt. Für den Pool wurden Blutspender, mit der Blutgruppe AB, die HLA-AK negativ sind, ausgewählt. Bei der Herstellung des Pools wurden gleiche Volumina von jedem Spenderserum verwendet. Das Poolserum wird in je 1 mL aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Als positive Kontrollen im Test wurden drei verschiedene Poolseren und ein Serum einer einzelnen Person verwendet (s. Tabelle 6). Die Seren wurden einzeln und als Pool auf HLA-AK mit dem Luminex Screeningtest getestet. Die positiven Seren wurden mit dem Luminex SA-Test weiter spezifiziert.

2.3.3 Ethikkommission

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer retrospektiven Testung und Auswertung von Patientenserum, die für retrospektive Analysen und gegebenenfalls zur Testung bei Vorbereitung auf eine Retransplantation im Labor gelagert wurden. In der Charité werden alle Daten der Transplantationspatienten in einer elektronischen Patientenakte T-Base erfasst. Mit dieser Übermittlung und Speicherung der personenbezogenen Daten auch für die Auswertung der anonymisierten Daten im Rahmen Forschungsprojekte, haben sich die Patienten einverstanden erklärt. Die Datenbanken und Laborergebnisse unterliegen sämtlich der ärztlichen Schweigepflicht und sind gesichert nach den Vorschriften des jeweiligen nationalen Datenschutzgesetzes.

3 Ergebnisse

3.1 Validierungsergebnisse der C4d-Methode

Zunächst sollte der Luminex C4d-Test etabliert, optimiert und anschließend für die Routineanwendung validiert werden. Es wurden verschiedene Bedingungen und Arbeitsschritte überprüft und diese Ergebnisse dann im Luminex-C4d-Test verwendet. Es werden Chargendokumentationen für die verwendeten AK, positive Kontrollseren und negative Kontrollseren geführt und die entsprechenden neuen Chargen, Reagenzien und Kontrollen getestet.

Bei der Optimierung und Validierung wurden folgende Parameter geprüft: Sensitivität und Cut off, Spezifität, Präzision, Detektions-AK von verschiedenen Herstellern, Detektions-AK-Konzentration, Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen, Komplementquellen und -konzentrationen, Stabilität des Komplements sowie Plausibilität der Ergebnisse.

Sensitivität und Cut off im C4d-Luminex-Test

Als Sensitivität eines Tests in der Labormedizin wird die Prozentzahl der richtig positiv erkannten Testproben aus der Gruppe aller positiven Proben [20] berechnet. Für die Validierung wurden zunächst 20 einzelne Patientenseren mit dem C4d-Luminex-Test ausgetestet. Diese Seren waren aus dem LCT als stark positiv bekannt. Sie ergaben auch in der Luminex C4d-Methode eindeutig positive Befunde. Das entspricht einer Sensitivität von 100%. Bei der Untersuchung von weiteren 261 Patientenseren konnte die 100% Sensitivität der Methode in einem größeren Probenumfang bestätigt werden.

Die Nachweisgrenze (*cut off*) richtet sich hier nach dem negativen Kontrollbead (NC). Der NC ist laut des Herstellers (One Lambda) ein „nackter“ Bead ohne HLA-Ag auf der Oberfläche. Das Bead ist mit Albumin geblockt. Das Fluoreszenzsignal vom NC entspricht dem Hintergrundrauschen (unspezifische Bindung) im Serum. Somit wird ein Signal eines mit Ag beladenen Beads als positiv bewertet, wenn er sich deutlich (drei Standardabweichungen) vom Signal des NC-Beads im Ansatz unterscheidet. Für die Berechnung des Cut off kann folgende Gleichung verwendet werden:

3. Ergebnisse

$$\text{Cut off} = \text{NC (Rohwert)} + 3 \times \text{SD von NC}$$

(NC- Negativ Kontrollbead im jeweiligen Testserum; MW-Mittelwert; SD-Standardabweichung)

Der Cut off wurde getrennt für sieben HLA-AK negative Seren und einige HLA-AK positive Seren (elf Seren einzelner Patienten, fünf Ansätze PKS-E, fünf Ansätze PKS3) berechnet (s.Tabelle 7).

Tabelle 7. Mittelwerte, SD und Cut off im C4d-Test für die o.g. Seren, berechnet für HLA-AK negative (NS) und positive Seren (PS). Alle Werte sind in Mittleren Fluoreszenz-Einheiten (MFI) dargestellt.

	MW	3xSD	Cut off
NC NS	149	135	554
NC PS	130	183	679

(NC- negativer Kontrollbead, NS- negatives Serum, PS- positives Serum)

Der niedrigste MFI-Wert lag bei HLA-AK negativen Seren bei 95 MFI und für die HLA-AK positiven Seren bei 380 MFI. Aufgrund des unterschiedlichen Hintergrundsignals zwischen den einzelnen Seren, ist es besser, den Cut off für jedes untersuchte Serum konkret zu berechnen. Während der Validierungsphase wurden Doppelansätze für die Berechnung der Standardabweichung untersucht. Für die weiteren Testungen war nur ein Ansatz pro Probe notwendig, da der Rohwert für jede Beadpopulation als MW von 50 bis 100 Beads dieser Population berechnet wird (für die MFI einer Beadpopulation, wird das Fluoreszenzsignal von mindestens 50 Beads gezählt; der Beadcount muss > 50 sein). Als zusätzliche negative Kontrolle wurden Testansätze ohne Patientenserum durchgeführt, stattdessen wird PBS-Puffer mit den Luminex-Beads inkubiert. Die Rohwerte der Negativbeads (NC) lagen bei 109 MFI, die der Positivbeads (PC) bei 135. Der Cut off, berechnet als NC Rohwerte+ 3xSD lag bei 255 MFI.

3. Ergebnisse

Als Cut off im C4d-Test kann die vorgeschlagene Cut off-Ratio aus dem Standard Luminex Test übernommen werden (s. Kapitel 2.2.2). Im Luminex Single Antigen (SA)-Ansatz liegt der Cut off in der Größenordnung von 500 MFI, wobei diese Grenze bei den einzelnen Patienten nach Berücksichtigung der Immunisierungsereignissen auch plausibel nach unten gesetzt werden kann. Bei der Testung der Patientenserum im C4d-Screening (Mix-Test) hat sich erwiesen, dass bei einem Ergebnis, das im Graubereich liegt, eine weitere Untersuchung mit C4d-SA-Test sinnvoll ist, weil in den meisten Fällen diese grenzwertige Befunde auf schwach positive AK hinweisen und als positiv in C4d-SA getestet wurden. Die Frage des Cut off wird für den Standard Luminex kontrovers diskutiert [74]. Bei dem Nachweis von komplementbindenden HLA-AK sollte überlegt werden, ob nicht alle Resultate mit MFI, die größer als NC sind, als positiv zu bewerten sind. Dafür sind weiteren Studien notwendig.

Um die Sensitivität des Tests zu untersuchen, wurden serielle Verdünnungsreihen von PKS2 mit Faktor 2 bis zu einer Verdünnung von 1:32 angesetzt (Abbildung 7). Für die Auswertung wurde jeweils der Bead von Klasse I und der Bead von Klasse II mit den jeweils höchsten Werten ausgewählt. Für Klasse I ist das die Bead-Population 3. Sie ist mit den folgenden HLA-Ag beladen: A1, 80; B18, B50; A1, 29; B8, 45; A1, 69; B35,49. Für Klasse II ist das die Bead Population 50, beladen mit: DR1,16; DQ5; DR1,11; DQ5,6; DR1,13; DQ5,6; DR7,10; DQ5,2; DR18,10; DQ4,5.

3. Ergebnisse

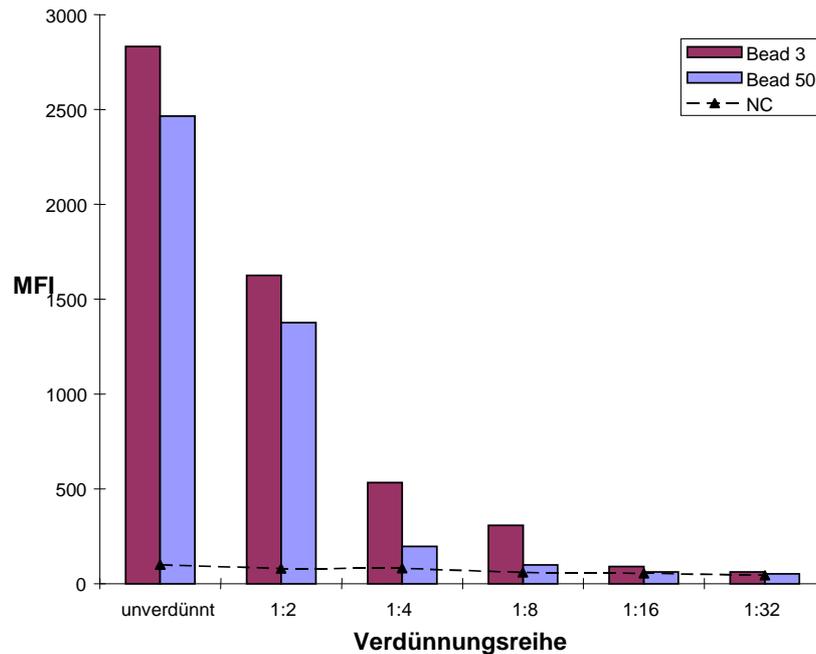


Abbildung 7: Serielle Verdünnungsreihe des positivem Kontrollserums 2 (PKS 2) mit Faktor 2, untersucht im C4d-Luminex SA-Test. Auf der X-Achse ist die Verdünnung gezeigt, auf der Y-Achse sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (MFI) dargestellt. Die Beads Populationen #3, #50 und der negativ Bead (NC) sind als repräsentative Beads für Klasse I und II HLA-Ag und Beads ohne Ag-Beschichtung dargestellt.

Für den negativen Bead in diesem Ansatz wurden Fluoreszenzsignale mit einem MW von 70 MFI gemessen. In der Abbildung 7 ist zu sehen, dass bei einer Verdünnung von 1:32 die Werte des positiven Serums unter denen vom NC liegen.

Bei der Austestung von Verdünnungsreihen wurde beobachtet, dass die Linearität davon abhängig ist, welches Testserum verwendet wird und wie hoch der Titer der HLA-Antikörper ist. Aus den MFI allein kann man keine Aussage zum AK-Titer treffen. Der Titer ist nur mittels einer Verdünnungsreihe zu ermitteln. Das zeigt auch ein weiteres Experiment, in dem die MFI der Positiven Kontrollseren PKS 2, PKS 3 und PKS-E unverdünnt und 1:8 verglichen wurden. Tabelle 8 stellt dies dar und zeigt, dass PKS 3 verglichen mit PKS-E bei ähnlichen Ausgangs-MFI des unverdünnten Serums, eine schwächere Reduktion der Fluoreszenzintensität bei der Verdünnung 1:8 aufweist.

3. Ergebnisse

Tabelle 8: Vergleich der MFI zwischen drei HLA-AK positiven Seren PKS 2, PKS 3 und PKS-E unverdünnt und 1:8 verdünnt, am Beispiel der Beadpopulationen #3 und #50 (HLA Klasse I bzw. II). Die Ratio in der Tabelle ist berechnet, indem die Werte (MW MFI) des unverdünnten Serums dividiert durch diese des 1:8 verdünnten Serums werden.

Verdünnung	MW (MFI)		Ratio unverd./1:8	
	Bead# 3	Bead# 50	Bead# 3	Bead #50
PKS 3	3491	2959	1,1	1,5
PKS 3 (1:8)	3042	1995		
PKS-E	3805	2226	1,9	3,6
PKS-E (1:8)	1978	623		
PKS 2	2832	2466	9,2	25,1
PKS 2 (1:8)	308	98		

Die Ratio MFI des unverdünnten Serums zu MFI des verdünnten Serums bei PKS 3 zeigt eine Abnahme von 1,1 für Bead #3 bis 1,5 für Bead #50. PKS-E weist einen 1,9- bis 3,6- fachen Abfall (Bead #3 bzw. #50) nach der Verdünnung auf. Es wurde beobachtet, dass die Klasse II HLA-AK beim Verdünnen schneller unter die Nachweisgrenze sinken im Vergleich zu Antikörpern der Klasse I. Dieses Phänomen ist vom Titer der angesetzten Seren abhängig.

Spezifität des C4d-Luminex-Tests

Als Spezifität gilt der Anteil der im Test als negativ getesteten Seren, aus einer Gruppe von richtig negativen Proben. Im C4d-Test wurde die Charge 20095844 negatives Kontrollserum als negative Kontrolle verwendet. Um die Spezifität der Methode zu prüfen, wurden fünf negativ getestete Seren von einzelnen Patienten untersucht. Alle im LCT und Standard Luminex negative Seren wurden auch im C4d-Luminex-Test als negativ bewertet. Für diesen Ansatz wurde im C4d-Luminex ein Cut off von 200 MFI (bezogen auf dem NC-Bead des NKS) berechnet. Es war zu sehen, dass alle Ergebnisse unter dem Cut off lagen. Die negativen Werte für alle hier getesteten negativen Seren bestätigen die 100% Spezifität der C4d-Methode.

Um die Reproduzierbarkeit bei einzelnen Patienten-Seren zu untersuchen, wurden weitere Seren geprüft. Zwei zeitlich unabhängige Serumabnahmen von einer Patientin wurden im C4d-Luminex-Test untersucht. Das erste Serum war im LCT positiv (Serum A), das zweite Serum war im LCT negativ (Serum B). Die Fragestellung hier war, ob der C4d-Luminex das gleiche Resultat liefert. Die Ergebnisse im C4d-Luminex entsprechen denen im LCT-Test:

3. Ergebnisse

Serum B war negativ und Serum A positiv. Serum A war im C4d-Luminex deutlich positiv, mit einer Ratio über drei.

Im C4d-Luminex-Test sind keine Kreuzreaktionen zwischen den Detektionsantikörpern und HLA-IgG-AK zu erwarten. Der Detektions-AK, anti-humanes C4d, wurde in der Maus gewonnen. Als sekundärer AK wurde anti-Maus-IgG-AK aus der Ziege gewählt, so dass nur eine Bindung mit dem eingesetzten anti-C4d-AK erfolgen sollte.

Um die Spezifität der Reaktion zu zeigen, wurden zur Testoptimierung einige Ansätze mit PBS anstelle Patientenserum oder PBS anstelle Komplement durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Ansätze getestet. Ansatz A ist der Standardansatz mit einem positiven Patientenserum, im Ansatz B wurde das Patientenserum durch PBS ersetzt, im Ansatz C wurde die Komplementquelle durch PBS ersetzt. Proben B und C sollten entsprechend negative Ergebnisse bringen, da es dort kein Patientenserum bzw. Komplement angesetzt wurde. Im Ansatz A waren die MFI am höchsten, Ansatz B und C hatten negative Werte unter denen der NC (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion spezifisch und abhängig von der Ag-AK Bindung sowie von der Komplementquelle ist. Der Austausch von Patientenserum mit PBS führt zu keiner Ag-AK-Komplex-Bildung, die im zweiten Schritt Komplement aktivieren könnten. In Tabelle 9 sind drei weitere Testansätze mit PKS 2 gezeigt. Der Standard C4d-Luminex-Test (A) wurde einmal ohne anti-C4d-AK (D) und einmal mit anti-human-IgG-AK statt Ziege-anti-Mause-AK (E) verglichen. Der Ansatz ohne anti-C4d-AK (D) führte zu keinen positiven Signalen. Dadurch wird deutlich, dass es keine Kreuzreaktionen zwischen anti-IgG-RPE und den HLA-AK gibt.

Tabelle 9: Vergleich zwischen drei verschiedenen Ansätzen mit PKS 2. A: Standard C4d Luminex; D: C4d-Luminex Ansatz ohne anti-C4d; E: C4d-Luminex Ansatz mit anti-human-IgG Detektions-AK. Die Zahlen sind in MFI dargestellt. Beadpopulationen # 3 und # 50 sind die Beads mit den höchsten Signalen. HLA-Ag-Beladung Bead# 3 Population: A1,80,B18,B50; A1,29,B8,45; A1,69,B35,49. Bead #50 Population: DR1,16,DQ5; DR1,11,DQ5,6; DR1,13,DQ5,6; DR7,10,DQ5,2; DR18,10,DQ4,5.

Ansatz	Bead# 3	Bead# 50
A	3270	2700
D	41	58
E	15170	12625

3. Ergebnisse

Der Beweis, dass in der untersuchten Probe HLA-AK an den mit HLA-Ag beladenen Beads gebunden haben, wird durch den Ansatz E mit anti-human-IgG-RPE erbracht. Dieser Detektions-AK wird im Standard Luminex Test verwendet. Die höheren MFI-Werte (> 15 000) beweisen die Anwesenheit von HLA-IgG-AK. Der Unterschied zwischen Ansatz E und Ansatz A liegt im Nachweis von komplementaktivierenden AK (A).

Präzision des C4d-Luminex-Tests

Die Präzision wird als Interassay- und Intraassay-Varianz bestimmt. Für die Tag-zu-Tag Varianz (Interassay-Varianz) wurden die Ergebnisse der positiven Kontrolle PKS-E an fünf verschiedenen Tagen verglichen. Der Variationskoeffizient (VK) variierte von 2% bis 22 %. Die Intraassay-Varianz wurde durch den Vergleich der Werte von zwei positiven Kontrollseren (PKS2 und PKS-E) und einem negativen Kontrollserum (NKS) in fünffachen Ansätzen am gleichen Tag untersucht. Die VK variierten zwischen 3 und 21%. Die unterschiedlichen VK können damit erklärt werden, dass die Komplementaktivierung durch die Ag-AK-Komplexe nicht gleichmäßig bei verschiedenen Ansätzen von einem Serum verläuft. Eine andere Vermutung ist die mögliche Variation bedingt durch die Unterschiede beim manuellen Ausschlagen der Platte bei den Waschschritten. Dadurch könnte die Verdünnung des Komplements oder der AK variieren. Die Ergebnisse zeigen, dass die Austestungen der Seren an verschiedenen Tagen und seriell am einem Tag untereinander vergleichbar sind und somit eine ausreichende Stabilität für das Einführen der C4d-Methode als Routine-Test besitzen.

Das menschliche Serum beinhaltet eine Fülle von Proteinen, die konzentrationsabhängig Einfluss auf das Meßsystem nehmen können. Daher sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, wie sich die Verdünnung der Seren mit PBS auf das Meßergebnis auswirkt. Dazu wurden die VK bei verdünnten bzw. unverdünnten PKS 3 und PKS-E getestet (Tabelle 10).

3. Ergebnisse

Tabelle 10: Standardabweichung (3xSD) und Variationskoeffizient (VK) vom unverdünnten und 1:8 verdünnten negativen Serum und den positiven Seren PKS3 und PKS-E

	MW (MFI)		3xSD		VK%	
	Bead #3	Bead #50	Bead #3	Bead #50	Bead #3	Bead #50
NS	86	60	4	1	5	2
PS 3	3491	2959	95	62	3	2
PS 3 (1:8)	3042	1995	45	49	1	2
PS-E	3805	2226	218	125	6	6
PS-E (1:8)	1978	623	90	34	5	5

Wie aus der Tabelle 10 zu sehen ist, liegt der VK zwischen 1% und 6%. Dieses Ergebnis zeigt die Stabilität des C4d-Luminex-Tests, unabhängig von dem Serum, das untersucht wird.

Bei der Bestimmung der optimalen Konzentration des anti-C4d Detektions-AK wurden der VK berechnet. Der VK bei der optimalen Verdünnung 1:80 betrug 6%. Zusammenfassend kann man sagen, dass der VK von den positiven Kontrollseren in allen Ansätzen zwischen 2 und 22 % lag, der des negativen Kontrollserums zwischen 0 und 10%.

Auswahl der C4d-AK zur Detektion

Bei der Optimierung des Tests wurden drei verschiedene anti-C4d-AK ausgetestet: jeweils unmarkierte Antikörper von den Herstellern Serotec und Biomedica sowie der direktmarkierte Antikörper DyLight™ 549 von Biozol. Mit dem direktmarkierten AK führte der Test zu keinen positiven Ergebnissen. Nur die C4d-AK von Serotec haben funktioniert und sich als geeignet für unseren Test erwiesen. Die Konzentration der AK wurde durch Titrieren hinsichtlich Signalintensitäten ausgetestet. Hierbei hat die AK-Verdünnung 1:80 das beste Ergebnis mit den höchsten MFI ergeben. Dies entspricht einer finalen Konzentration von 12,5 µg/mL (Abbildung 8).

3. Ergebnisse

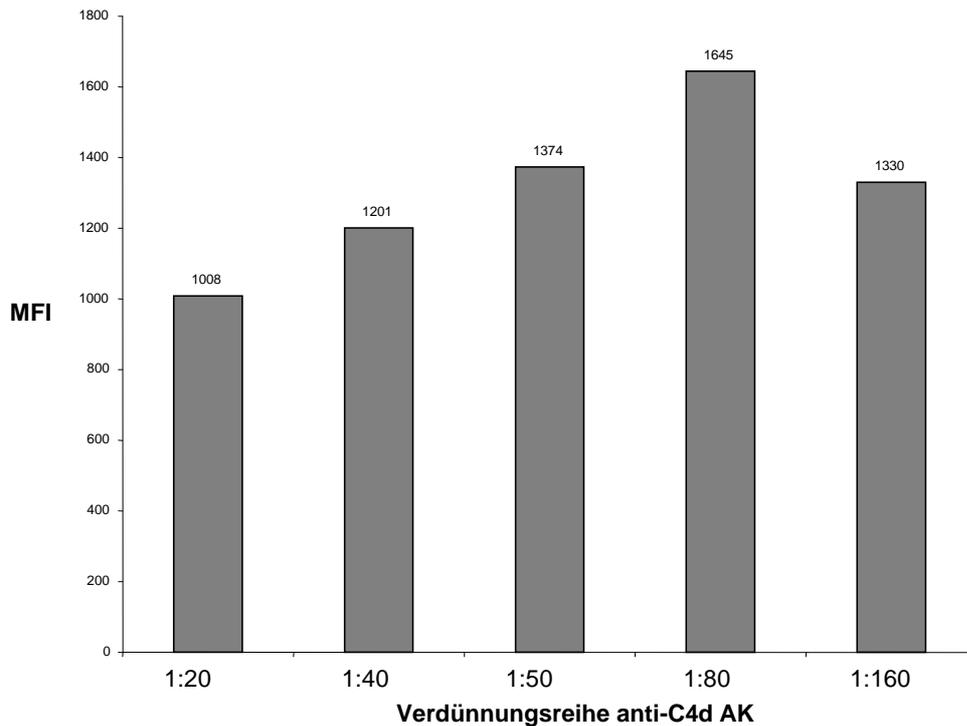


Abbildung 8: Titrationskurve des anti-C4d-AK (Serotec) mit Bezug auf die Fluoreszenz-Werte eines positiven Testserums (PKS3). Die Verdünnung 1:80 hat die höchsten MFI-Werte ergeben.

Optimierung der Inkubationszeit im C4d-Luminex-Test

Nach der Auswahl der Reagenzien für den Test sollten im Folgenden die einzelnen Inkubationszeiten optimiert werden. Dazu wurden die Signalintensitäten nach Zugabe von Komplement, anti-IgG-PE und anti-C4d-AK für verschiedene Inkubationszeiten untersucht. Alle anderen Bedingungen wurden konstant gehalten. Die Inkubationszeit nach Zugabe von Komplement wurde für 30 und 60 Min verglichen und im Weiteren bei 30 Min beibehalten. Die Erwartung war, dass eine längere Inkubationszeit unspezifische Reaktionen während der Komplementaktivierung verstärkt. Die Ergebnisse haben diese Hypothese bestätigt: die Signale waren nach 60 Min Inkubation niedriger. Die Inkubation mit anti-IgG-RPE wurde zunächst für 40 Minuten durchgeführt. Um die Testdauer zu verkürzen, wurden 40 mit 20 Minuten Inkubationszeiten verglichen. Eine Inkubation von 20 Minuten bei 4°C lieferte vergleichbar gute Ergebnisse und mitunter sogar höhere MFI als bei 40 Minuten, welches auch mit der Erhöhung der unspezifischen Bindungen bei längerer Inkubation zu erklären ist [70]. Daher wurde für den Test eine Inkubationszeit auf 20 Minuten festgelegt.

3. Ergebnisse

Optimierung der Inkubationstemperaturen, Ansatzvolumina und Waschschritte

Die Inkubationstemperaturen wurden ebenfalls für jeden Arbeitsschritt optimiert. Mit den von der Arbeitsgruppen Böhlig und Smith [62] erwähnten Inkubationstemperaturen von 4°C hat der C4d-Luminex-Test bei uns nicht funktioniert. Wir haben Raumtemperatur, 4°C und 37°C als Inkubationstemperaturen miteinander verglichen. RT hat sich als die beste Bedingung bei der Inkubation von Beads mit Patientenserum (Ag-AK Reaktion), bei der Komplementaktivierung und bei der Inkubation mit anti-C4d-AK erwiesen. Eine optimale Bindung von anti-IgG-PE an die anti-C4d-AK wurde nur bei 4°C erzielt.

Die Reaktionsvolumina im C4d-Test wurden so angesetzt, wie im Standard Luminex-Test. Die Volumina bei der Inkubation zwischen Ag (Beads) und AK (Serum) wurden optimiert. Es wurden 20 µL Testserum mit 5µL Beads und 8µL Testserum mit 2 µL Beads, 20 µL Testserum mit 3 µL Beads, sowie 40 µL Testserum mit 5 µL Beads verglichen. Zudem wurde auch das Volumen der Komplementquelle untersucht. Eine Zugabe von 40 µL frischem Serum als Komplementquelle statt 20 µL hat die Ergebnisse nicht verbessert. (Daten nicht gezeigt). Es wurde gezeigt, dass 20 µL Patientenserum + 3 µL Beads und 20 µL Komplementquelle optimal sind und die höchsten MFI-Signale ergeben.

In der Anfangsphase wurde zum Waschen zwischen den einzelnen Inkubationsschritten der Luminex-Waschpuffer (WP) verwendet. Nach Angaben aus dem Labor der Forschungsgruppe Böhlig sollte kaltes PBS besser zur Entfernung überschüssiger Reagenzien geeignet sein. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Überlegenheit von PBS als Waschpuffer. Die Berichte, dass der PBS-Puffer kalt zu verwenden ist, konnte allerdings hier nicht bestätigt werden. Nach Waschen mit kaltem PBS waren die MFI niedriger (Daten nicht gezeigt). Das Waschen mit PBS hat sich als optimal in Hinsicht auf den Wert des NC-Beads und den Cut off erwiesen und wurde im Standard Protokoll für C4d-Luminex-Test eingeführt. Eine Reduktion der Anzahl der Waschritte zwischen den Inkubationen auf 1x Waschen führte zu schlechteren, grenzwertigen Ergebnissen. Damit möchten wir auf das genaue Folgen des Standard-Protokolls für den C4d-Luminex hinweisen.

3. Ergebnisse

Auswahl der Komplementquelle und -konzentration im C4d-Luminex-Test

Zunächst wurde als Komplementquelle frisches Serum (FS) von HLA-AK negativen Blutspendern verwendet. Das Serum wurde nach Blutabnahme und Zentrifugation sofort portioniert und bei -70°C eingefroren, weil bekannt ist, dass die Komplementaktivität bei Aufbewahrung bei RT oder zwischen $+4$ und -22°C , nachlässt. Ebenso ist bekannt, dass wiederholtes Auftauen das Komplement zerstört [71]. Da der C4d-Test zunächst nicht zufriedenstellend funktioniert hat, wurde eine alternative Komplementquelle gesucht. Das „Human Complement“ (HC) der Firma Quidel hat sich letztendlich als eine bessere Komplementquelle erwiesen. Die gemessenen Komplement-Konzentrationen sind im Kapitel 2.1.2 aufgelistet. Das HC ist kein rekombinantes Komplement, sondern aus menschlichem Serum hergestellt, lyophilisiert und standardisiert. Diese standardisierte Konzentration ist eine wichtige Voraussetzung für die gute Reproduzierbarkeit zwischen den Experimenten.

Zum Optimieren der Komplementreaktion wurden zunächst Experimente mit Zugabe von verschiedenen Volumina HC ($1\mu\text{L}$, $5\mu\text{L}$ und $10\mu\text{L}$) zum Komplement aus frischem Serum durchgeführt. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob das FS durch HC stabilisiert werden kann. Die Ergebnisse zeigten höhere MFI für die spezifischen Beads und niedrigere Werte für den NC-Bead bei den Proben mit HC im Vergleich zu FS. Die Erklärung dafür ist eventuell die höhere Komplement-Konzentration nach Zugabe von HC. Weiterhin wurde HC in PBS verdünnt und ausgetestet. Die höchsten MFIs wurden mit Verwendung von $1\mu\text{L}$ HC plus $20\mu\text{L}$ PBS erzielt (Verdünnung 1:21). Nach Zugabe von unverdünntem HC oder einer 1:2-Verdünnung waren die Resultate negativ. Das bedeutet, dass eine höhere Konzentration von Komplement nicht unbedingt eine stärkere Aktivierung verursacht, da hier verschiedene Inhibitoren der Komplement-Kaskade (wie C1-Esterase-Inhibitor), ebenfalls höher konzentriert sind. Um das zu überprüfen, wurde das HC in folgenden Schritten titriert: $1\mu\text{L}$, $2\mu\text{L}$, $3\mu\text{L}$, $5\mu\text{L}$ oder $10\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS. Um die optimale HC-Konzentration zusätzlich zu bestätigen und eine bessere Darstellung der Verhältnisse zwischen HC-Konzentration und Komplementaktivierung zu erreichen, wurde in einem Versuch eine systematische Titrationsreihe des HC angesetzt. Dies erfolgte in folgenden Verdünnungen: 1:21 ($1\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS), 1:11 ($2\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS), 1:7,5 ($3\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS), 1:6 ($4\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS), 1:5 ($5\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS), 1:3 ($10\mu\text{L}$ HC zu $20\mu\text{L}$ PBS), 1:2 ($10\mu\text{L}$ HC zu $10\mu\text{L}$ PBS) und unverdünntes HC (s. Abbildung 9).

3. Ergebnisse

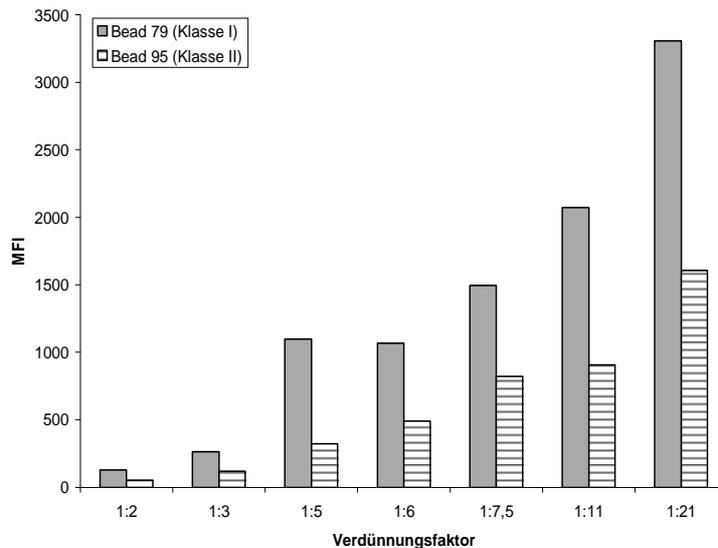


Abbildung 9. Titrieren des HC im C4d-Mix-Test für HLA-Klasse I und II. Es wurden die Werte der Beads mit den höchsten MFI als Beispiel dargestellt, Bead #79 für Klasse I und Bead #95 für Klasse II.

Wie aus der Abbildung zu sehen ist, werden die MFIs niedriger mit Erhöhung der HC-Konzentration. Die beste Verdünnung bleibt 1:21. Weitere Verdünnungen wurden nicht ausgetestet, weil kleinere Volumina als 1µl HC bei Ansätzen, zu größeren Pipettierfehlern führen können.

Als Vergleich zwischen verschiedenen Komplementquellen wurden neben HC und FS einige Ansätze mit Komplement aus Kaninchenserum durchgeführt. Dies wurde ausgewählt, da dieses Serum als Komplementquelle im LCT benutzt wird. Dabei wurde der Einfluss der drei Komplementquellen für das positive Kontrollserum PKS2 untersucht (siehe Abbildung 10). Zu der jeweiligen Probe wurden entweder 20 µL unverdünntes FS, 1:21 in WP verdünntes HC, oder 20µL unverdünntes Kaninchenkomplement pipettiert. Die Konzentrationen der Komplementquellen wurden so ausgewählt, wie sie normalerweise im Test verwendet werden. Die höchste Signalstärke wurde bei HC gemessen. Die Stärke der Komplementaktivierung ist bei den verschiedenen Beads unterschiedlich, was abhängig von

3. Ergebnisse

der Komplementbindungsfähigkeit der im PKS2 reagierenden AK und der Antigendichte auf dem Bead ist.

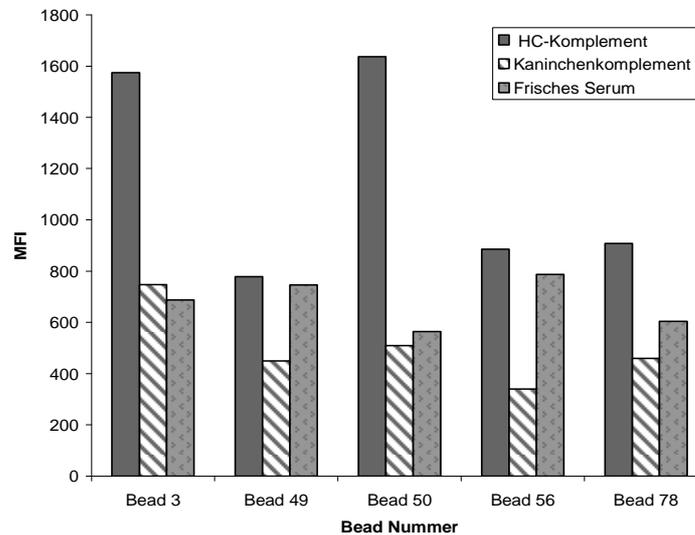


Abbildung 10: Vergleich zwischen drei Komplementquellen: HC 1:21 verdünnt, FS und Kaninchenkomplement unverdünnt. Dargestellt sind die Beads mit den höchsten MFI für Klasse I (#3,# 49,#78) und Klasse II(#50, #56).NC Wert: 260MFI

Um den Vergleich zwischen den drei Komplementquellen bei den gleichen Verhältnissen zu gewährleisten, wurden die Komplementquellen in 1:21-Verdünnung für PKS-E verglichen: es wurde 1 µL HC mit 20 µL PBS verdünnt, 1 µL frisches Serum mit 20 µL PBS und 1 µL Kaninchenserum mit 20 µL PBS. In Tabelle 11 sind die MFIs dargestellt.

Tabelle 11. Vergleich der verschiedenen Komplementquellen (HC, FS und Kaninchen-Komplement) im C4d-Mix-Test. Die Ergebnisse sind als MFI dargestellt. Bead #79 und Bead#95 sind die Beads mit den höchsten MFI.

	Bead #79 (Klasse I)	Bead #95 (Klasse II)
HC 1:21 in PBS verdünnt	3307	1607
Kaninchen-Kompl. 1:21 in PBS verdünnt	314	118
FS 1:21 in PBS verdünnt	3232	2109

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass HC und FS verdünnt 1:21 vergleichbare Ergebnisse liefern und die Wirkung von Kaninchen-Komplement in diesem Reaktions-Modell sehr schwach ist.

Prüfung der Auftautechnik und Stabilität des Komplements im C4d-Luminex-Test

Das Komplement ist ein empfindlich reguliertes System. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen aktivierenden und inhibierenden Komponenten kann massive Auswirkungen haben. Nach Literaturangaben soll das für Laboruntersuchungen benötigte Komplement oder Frischserum bei -70 °C aufbewahrt werden [20,71]. Auftautechnik und Handhabung wurden bei Punkt 2.1.3 beschrieben. Damit eine Stabilität bei der Arbeit mit dem C4d-Luminex-Test gewährleistet wird, sollte die Stabilität der Komplementquelle überprüft werden. Zur Optimierung der Methode wurden zwei verschiedene Auftaumethoden miteinander verglichen: (1) Auftauen des tiefgefrorenen Komplements unter fließendem kaltem Wasser und (2) Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Nach dem Auftauen wurden die Proben bis zum Einsatz auf Eis gelagert. Es gab hierbei keine Unterschiede zwischen den zwei Techniken (Daten nicht gezeigt). Das Auftauen für alle weiteren Experimente wurde nur bei 37° durchgeführt (Methode 2). Durch ein weiteres Experiment sollte die Stabilität des einmal aufgetauten und wieder eingefrorenen Aliquots des HC überprüft werden. Nach Herstellerangaben sollte wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden werden, ist aber auch bis zu dreimal möglich. Um das zu klären, wurde die Qualität eines einmal aufgetauten HC-Aliquots überprüft. In zwei zeitlich getrennten Ansätzen wurde frisch aufgetautes HC (Standard Verdünnung 1:21) mit drei verschiedenen HC-Restaliquots, die zum zweiten bzw. zum dritten Mal aufgetaut wurden, verglichen (Tabelle 12). Mehr als zwei Auftau-Einfrier-Schritte wurden aus Qualitätsgründen nicht vorgesehen.

Tabelle 12: Austestung des PKS-E mit HC-Aliquots, die ein bis drei Mal aufgetaut wurden. Die Ergebnisse im C4d-Luminex sind in MFI vergleichend für Klasse I (Bead #79) und Klasse II (Bead #95) dargestellt.

PKS-E Ansatz	Bead# 79 (Klasse I)	Bead #95 (Klasse II)
HC zum 1.Mal aufgetaut	3307	1607
HC zum 2. Mal aufgetaut	2857	1363
HC zum 3. Mal aufgetaut	2871	1518

3. Ergebnisse

Die Werte zwischen zwei- und dreimal Auftauen unterscheiden sich wenig. Die MFI nach einmaligem Auftauen des HC sind 15% höher als diese bei mehrfachen Auftau-Einfrier Zyklen und liegen damit innerhalb der Variationskoeffizienten im Intra- und Interassay-Vergleich. Um sicher zu stellen, dass diese 15 % Abschwächung des Signals nach mehrmaligem Auftauen nicht zu falsch negativen Ergebnissen bei sehr schwachen zytotoxischen HLA-AK führt, verwenden wir nur einmal aufgetautes HC in unserem C4d-Luminex-Test.

Inaktivieren der Patientenserum

Alle Testseren und Kontrollseren für den C4d-Luminex-Test wurden zunächst bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert. Es wurde untersucht, ob dieses im Labor übliche Vorgehen auch für den C4d-Luminex-Test sinnvoll ist. Dafür wurden zusätzlich Ansätze ohne und mit verlängerten Inaktivierungszeiten verglichen. Abbildung 11 zeigt die Resultate.

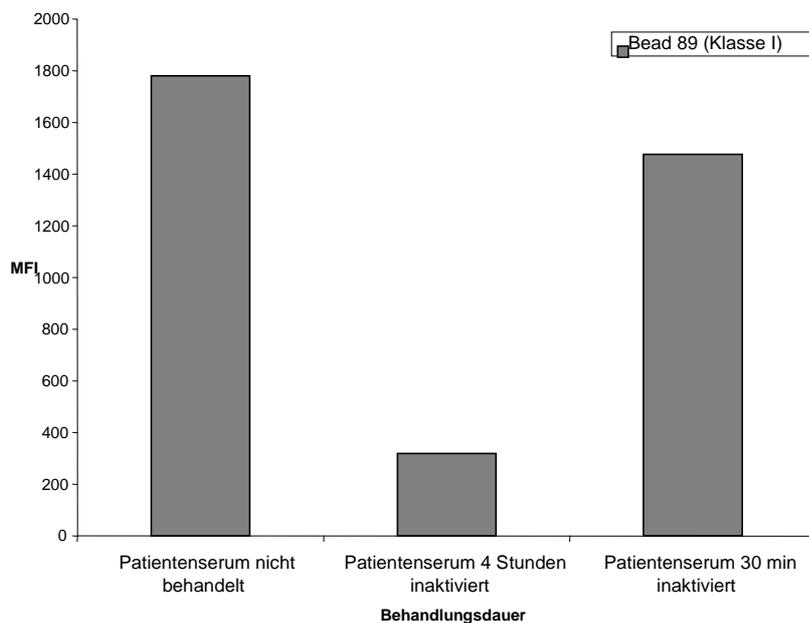


Abbildung 11: Auswirkung der Inaktivierungszeit von Patientenserum auf die Aktivität des C4d-Tests. Die Reaktion wurde am Beispiel des Bead#89 gezeigt.

3. Ergebnisse

Aus der Abbildung wird deutlich, dass bei längerer Inaktivierung (4 Stunden) das Signal um mehr als drei Mal niedriger wird als bei der Standard-Inaktivierung (30 Min). Die Werte beim unbehandelten Serum sind höher als nach 30 Min Inaktivierung. Trotzdem ist diese Behandlung zum Zerstören der Komplement-Restaktivität des Patientenserums notwendig, um die reine Aktivierung der Komplementkaskade durch die HLA-AK zu beurteilen. Im oben gezeigten unbehandelten Serum wurden zusätzliche Spezifitäten A1 und A11 gefunden. Nach Inaktivieren waren diese HLA-AK nicht mehr nachweisbar. Hier stellt sich die Frage, ob durch das Inaktivieren der Patientenserum wichtige HLA-AK übersehen werden könnten und ob eine Inaktivierung überhaupt notwendig ist. In einem weiteren Versuch wurden 4 Seren jeweils mit 30 Min bzw. ohne Inaktivierung angesetzt. Beim Ansatz der Seren (#157, #158) ohne Inaktivierung im C4d-SA-Test waren sie negativ für HLA-AK, mit Inaktivierung schwach positiv. Nach Analysieren des AK-Status der Patienten und der durch die Transplantation gewonnenen Inkompatibilitäten, konnte man DRA (bei #157 HLA-A2) im Serum nach Inaktivieren, mit Intensität zwischen 40 und 100 MFIs, unter dem Cut off erkennen. Das spricht dafür, dass es im unbehandelten Serum eventuell Reaktion-inhibierende Substanzen gibt. Das können non-HLA-AK sein, oder Prozone-Effekt durch Bindung von C1q an IgM-AK sein. Diese Faktoren werden nach Hitzeinaktivierung neutralisiert [75]. Somit konnte unabhängig die Entscheidung für Inaktivieren aller Seren bestätigt werden. Aus diesem Beispiel leitet sich erneut die Überlegung, ab wo sich der Cut off im Test befinden sollte. Unsere Meinung ist, dass der Cut off nicht so einfach gesetzt werden kann, sondern nur nach Analyse der AK-Konstellation der Patienten.

Die inhibitorische Wirkung des humanen Serums in der C4d-Methode

Bereits bei den ersten Experimenten in dieser Studie fiel auf, dass es einige Komponenten im Testsystem gibt, die das vollständige Entfalten der Komplement-Reaktion verhindern. Es ist bekannt, dass das Komplementsystem eine Komposition aus Aktivatoren und Inhibitoren ist [76]. Die Vermutung war, dass C1-Esterase-Inhibitor oder andere Faktoren die Gesamtreaktion abschwächen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass nicht nur im Serum, das als Komplementquelle im Testsystem verwendet wird, Komplementaktivatoren und Inhibitoren enthalten sein können, sondern auch im zu untersuchenden Patientenserum, bzw.

3. Ergebnisse

in den negativen und positiven Kontrollseren. Um dieses Problem abzuklären, haben wir einige Versuche mit PKS2, PKS3, einzelnen HLA-positive Patientenseren, mit Zusatz von unbehandeltes FS, inaktiviertes FS, bzw. HC durchgeführt.

Der erste Versuch, bei dem es auffiel, dass es ein Problem bei der Komplementaktivierung gibt, ist in Tabelle 13 exemplarisch gezeigt. Es wurden PKS2 mit Zugabe von unverdünntem unbehandeltem FS(b), PKS2 ohne Zugabe von FS (c), PKS2 mit Zugabe von inaktiviertem FS(d) und WP Ansatz statt PKS2 mit Zugabe von FS (e) verglichen.

Tabelle 13: MFI-Werte des PKS2 mit und ohne Komplement im C4d-Luminex Mix.

Ergebnisse sind als MFI dargestellt. PKS2-positives Kontrollserum 2, NKS- negatives Kontrollserum, Bead# 3(HLA-Klasse I-Mix) mit den höchsten MFI. Der Cut off lag bei 120 MFI.

Testansatz	Bead# 3
NKS mit unbehandeltem FS (a)	61
PKS2 mit unbehandeltem FS (b)	569
PKS2 ohne FS (c)	3845
PKS2 mit inaktiviertem FS (d)	3227
WP mit unbehandeltem FS (e)	23

Aus der Tabelle 13 ist folgendes zu sehen: 1. Nach Zugabe von FS zum Patientenserum wird Komplement aktiviert, was zu einer Fixation von C4d am Immunkomplex führt (Vergleich Ansatz b, a, e) 2. Nicht erwartet hingegen war die starke, fast siebenfach höhere Komplementaktivierung im Ansatz c) ohne Zugabe von Komplement im Vergleich zu b). Folgendes wird vermutet: Es handelt sich um unspezifische Reaktion oder es gibt eine Komplement-Restaktivität im PKS2, was nach den vielen Auftau-Einfrier Cyclen nicht zu erwarten ist. 3. Das frische Serum als Komplementquelle zeigt eine inhibierende Wirkung, welches nach Hitzeinaktivierung beseitigt wird (Ansatz d und b). Diese Probleme haben die Etablierung des C4d-Luminex-Tests erschwert und zur Abklärung mittels weiterer Optimierungsexperimente geführt.

In einem zweiten Experiment wurden die o.g. Resultate bestätigt und erweitert. Es wurden unbehandeltes positives Kontrollserum (PKS 2) mit FS (verdünnt und unverdünnt) inkubiert und mit verdünntem HC verglichen. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse.

3. Ergebnisse

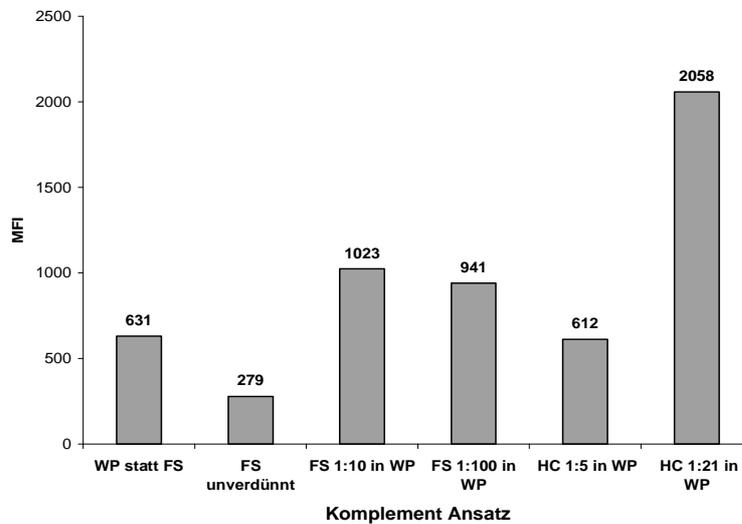


Abbildung 12: PKS2 mit unterschiedlichen Komplementansätzen im C4d-Luminex-Mix: als Komplement-Quelle wird frisches Serum (FS) oder HC verwendet. Die Ergebnisse sind als MFI für den Bead#4 dargestellt.

Die inhibierende Komponente aus FS ist bei dem Vergleich zwischen unverdünntem FS und einer 1:10-Verdünnung zu erkennen. Die höhere MFI (stärkere Komplementaktivierung) mit verdünntem FS weist daraufhin, dass Komplementinhibitoren in FS vorhanden sind, die mit Verdünnung abgeschwächt werden. Das höchste Signal hat der HC in 1:21 Verdünnung geliefert. Eine höhere Konzentration HC (1:5-Verdünnung) ist mit niedrigeren Signalen im C4d-Luminex-Test verbunden. Für die weiteren Tests ergibt sich somit, dass HC als Komplementquelle in einer Verdünnung von 1:21 eingesetzt wird.

Ein drittes Experiment sollte die obigen Fragen über vorhandene Komplement-Inhibitoren weiter klären. Das PKS2 wurde durch Hitze-Inaktivierung als mögliche zusätzliche Komplementquelle ausgeschaltet. Dazu wurde HC in Verdünnung 1:21 als Komplementquelle zugegeben. Zum Reaktionsgemisch wurden FS und NS in verschiedenen Volumina pipettiert und verglichen. Das Negativserum sollte aufgrund der Lagerungsbedingungen kein aktives Komplement mehr, im Vergleich zu FS, beinhalten. Abbildung 13 zeigt die Resultate dieses Experiments. Nach Zusatz vom frischen Serum zum

3. Ergebnisse

Standard-Ansatz, wurde die Aktivierung des Komplements stark unterdrückt, was darauf hinweist, dass im FS die vorhandenen Inhibitoren eine große Rolle für den C4d-Luminex-Test spielen. Die Ansätze mit NS haben höhere Signale gezeigt, im Vergleich zu jenen mit frischem Serum. Die Erklärung dafür ist das Fehlen von aktivem Komplement und somit auch Komplement-Inhibitoren.

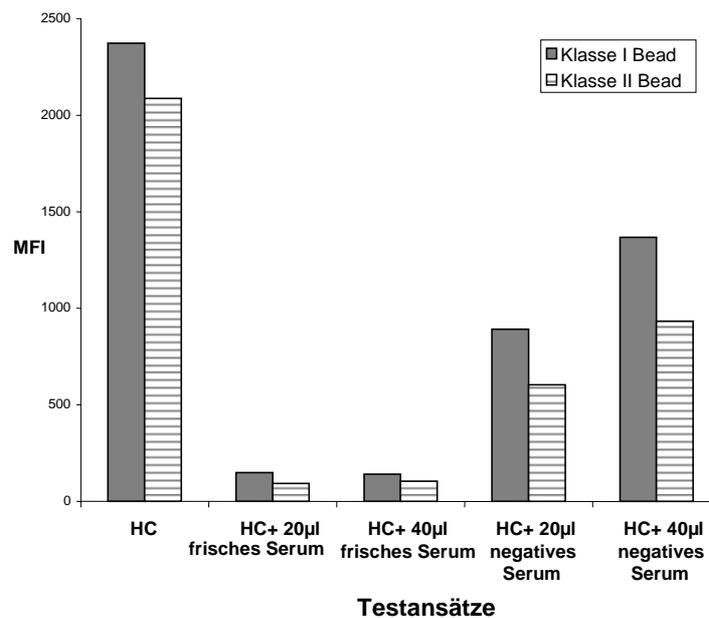


Abbildung 13: Vergleich zwischen der inhibierenden Wirkung von frischem(FS) und gelagertem Serum (NS), zugefügt zum C4d-Luminex-Mix Standard-Ansatz (PKS2+HC).

In einem vierten Experiment wurde das Vorhandensein von Komplement-Restaktivität nach Hitze-Inaktivierung geprüft. Es wurden zwei verschiedene positive Kontrollseren (PKS 2 und PKS 3) ohne Zugabe von Komplement verglichen. Die Resultate zeigen, dass diese Seren verschiedene Restaktivitäten aufweisen: PKS 2 mit höchstem MFI von 182 für eine Beadpopulation der Klasse I, PKS3 mit einem MFI von 670. Der Cut off für diesen Ansatz wurde bei 440 berechnet. Das zeigt eine schwache Aktivität bei PKS3 und keine bei PKS2 ohne Zugabe von Komplement. Zusätzlich wurde die Restkomplementaktivität bei frischem und gelagertem Serum von einem Patienten mit bekannten HLA-AK, ohne Zugabe von

3. Ergebnisse

zusätzlicher Komplementquelle überprüft. Die Idee war, ob das FS die unklaren Reaktionen aufgrund von vorhandenem aktivierungsfähigem Komplement verursacht wird und es einen Unterschied im Komplementrest zwischen frischem und gelagertem Serum gibt. Es gab keinen Unterschied zwischen frischem Serum und gelagertem Serum, beide Seren waren ohne Zugabe von Komplement negativ, ohne die Fähigkeit eine Komplementaktivierung mit Bindung von C4d auf die HLA Ag-AK-Komplexe zu haben.

In einem fünften Experiment (siehe Tabelle 14) konnte gezeigt werden, dass Proteine, die im WP beinhaltet sind, z.B. Albumin, die Reaktion stören. In dem Testansatz wurde die Wirkung von HC verglichen, indem HC einmal in PBS und einmal in WP verdünnt wurde. Als Referenz dient der Standard C4d-Luminex Ansatz. In diesem Versuch wurde PKS-E Kontrollserum als Testserum verwendet. Bei dem Vergleich waren die Signale von HC in WP deutlich schwächer als diese von HC in PBS: 1,7-fach für Klasse I (Bead#3) und 1,6-fach für Klasse II Bead#78 (Tabelle 14). Um den Einfluss des Verdünnungsmediums für HC besser zu untersuchen, wurden zusätzlich HC in inaktiviertem NKS, HC in nicht behandeltem NKS und HC in frischem Serum verdünnt und mit den oben genannten Testansätzen verglichen.

Tabelle 14. Nachweis von Komplementinhibitoren durch Variation des Mediums für die Komplementverdünnung. Die Ergebnisse sind als MFI für repräsentative Beadpopulationen (Bead #3- Klasse I, Bead# 78-Klasse II), mit den höchsten MFI dargestellt. PKS-E ist ein positives Patientenserum, NKS-negatives Kontrollserum, Ratio: Vergleich des Signals des Standardansatzes (HC in PBS) mit jenen von HC in WP, NKS oder in FS.

Testansatz (Verdünnung des HC in untersch. Medium)	Bead# 3	Bead #78	Ratio für Bead# 3	Ratio für Bead #78	
NKS Standard Ansatz	86	110			
PKS-E	HC in PBS	3897	3779	1	1
	HC in WP	2267	2437	1,7	1,6
	HC im nicht behandelten NKS	1072	875	3,6	4,3
	HC im inaktivierten NKS	2125	2228	1,8	1,7
	HC im nicht behandelten FS	66	71	59,0	53,2

Wie aus der Tabelle zu erkennen ist, hat das frische Serum starke inhibierende Wirkung auf die Komplementreaktion. Die Signale nach Zugabe von FS sind zwischen 53 und 59-mal

3. Ergebnisse

niedriger im Vergleich zum Ansatz mit HC in PBS verdünnt. Interessanterweise wurde eine Reduktion der Signale auch nach Zugabe von NKS beobachtet. Diese Reduktion ist schwächer nach Inaktivierung des NKS.

Die Konzentration der C3- und C4c Komplement-Komponenten im positiven Kontrollserum wurde im Zentrallabor der Charité untersucht. Die C3-Messung ergab folgende Werte: für PKS2 1,19 g/L, für frisches Serum 1,21 g/L, für negatives Kontrollserum 1,53 g/L. (Referenzbereich im Serum zwischen 0,9 und 1,8 g/L). Eine C4c-Messung ergab Werte auch im normalen Bereich (0,1- 0,4 g/L): PKS2 0,30g/L; frisches Serum 0,25g/L; Negativserum 0,29g/L. Nach den hier beschriebenen Experimenten zum Einfluss der Komplement-Komponenten auf den C4d-Luminex-Test, wurden alle Testseren (Patientenseren, positive und negative Kontrollseren) vor der Verwendung bei 56°C für 30 Min inaktiviert. Somit werden primär die Restaktivitäten von Aktivatoren und Inhibitoren des Komplements im Testserum blockiert und die reine Aktivierung der Komplementkaskade durch zytotoxische HLA-AK untersucht.

Plausibilität der Ergebnisse im C4d-Test

Um die Plausibilität der C4d-Luminex Ergebnisse zu prüfen, wurden 20 positive Seren von einzelnen Patienten mit bekannten HLA-AK getestet und die Resultate mit denen aus LCT und Standard-Luminex verglichen. Alle untersuchten Seren haben plausible Ergebnisse geliefert. In Tabelle 15 sind drei representative Seren als Beispiel gezeigt.

3. Ergebnisse

Tabelle 15: Vergleich der Resultate in C4d-Luminex SAI/2 mit LCT und Standard-Luminex SAI/2. Die blau markierten HLA-AK Spezifitäten sind in allen drei Methoden nachweisbar.

Serum Nr.	C4d Luminex SA I/II HLA-AK Spezifitäten	LCT HLA-AK Spezifitäten	LUMINEX SA I/II Standard Test HLA-AK Spezifitäten
#1	A11, B73, A25, B61 A34, A43, A1, A80 A36, B60, B7 A26 B81, B48, B27 DR53, DR4	A11,A26,B48	A1,A11,A23,A24,A25,A26,A29,A32,A33,A34,A36,A43,A66,A68,A69,A80,B13,B27,B37,B38,B39,B41,B42,B44,B45,B47,B48,B53,B55,B57,B59,B60,B61,B67,B7,B73,B76,B81,B82,CW17,CW18,CW2,CW5,CW6,CW7,CW8 DP1,DP10,DP11,DP13,DP14,DP17,DP19,DP20,DP3,DP5,DP9,DQ5,DQ8,DQ9,DR1,DR10,DR14,DR15,DR4,DR53,DR7,DR9
#113	A24, A23, A2 ,A32, A68, B49, B57 B38,B37, A25, B51 B58, B52, B63, B53 B59, B44	A2,A23, A24	A2,A23,A24,A25,A29,A32,A68,A69,B13,B27,B37,B38,B44,B45,B47,B49,B50,B51,B52,B53,B57,B58,B59,B62,B63,B72,B76,B77,B82,allelspezif. B*27:05
#175	B37,B49,B63,B38,A32B53, Cw15, B52,B59,B51,B44, B57,B13,B77,B45,B27,B7 ,B76,B82, B18,A24,B75,B46,B62B47,B58,B55,Cw6,A23Cw2, B72, B71,B39,B48,B81,B54,B60,B67B50,A25,B42 DR7, DR53, DR8, DQ7 DQ9, DQ8 , DQ*04:01	B44,B45,B13, B27,B37,B42, B48,B54,B55, B57,B7	A23,A24,A25,A32,B13,B18,B27,B35,B37,B38,B39,B41,B42,B44,B45,B46,B47,B48,B49,B50,B51,B52,B53,B54,B55,B56,B57,B58,B59B60,B61,B62,B63,B64,B65,B67,B7,B71,B72,B73,B75,B76,B77,B78B81,B82,CW1,CW10,CW12,CW14, DQ2,DQ4,DQ5,DQ6,DQ7,DQ8,DQ9,DR1,DR10,DR103,DR11, DR12,DR13,DR14,DR15,DR16,DR4,DR51,DR53,DR7,DR8, DR9

In der Tabelle ist zu sehen, dass im C4d-Luminex-Test HLA-AK nachweisbar sind, die auch mit den Standard-Methoden (LCT, Luminex) detektiert werden. Der Vorteil ist, dass im C4d-Luminex nur jene der HLA-AK detektiert werden, die Komplement aktivieren. In Vergleich mit dem LCT hat sich der C4d-Luminex als sensitiver erwiesen.

Unabhängig vom C4d-Luminex-Test wurde in unserem Labor ein Testsystem geprüft, dass anstatt der Komplementkomponente C4d das Spaltprodukt C1q nachweist. Der Unterschied im Testablauf des C1q-Luminex-Tests ist das Fehlen der Aktivierung der Komplementkaskade. Die komplementbindende Fähigkeit der HLA-AK wird durch das Binden von C1q-Protein beurteilt. Die Ergebnisse der HLA C4d- und C1q- SAI/II-Tests,

3. Ergebnisse

verglichen für 60 Patienten zeigten eine sehr große (> 90%) Übereinstimmung der HLA-AK-Spezifitäten. Dies beweist die Plausibilität der C4d-Methode und wir beurteilen diese Methode als eine Chance hochimmunisierten Patienten besser zu charakterisieren.

3.2 Patientenseren im C4d

3.2.1 Immunglobulin-Klassen der HLA-AK im C4d-Luminex-Test

Für den C4d-Luminex-Test hat sich die Frage gestellt, zu welcher Ig-Klasse (IgG oder IgM) die nachgewiesenen HLA-Antikörper gehören. Grundsätzlich kann man feststellen, dass die HLA-AK, die im C4d- und im Standard-Luminex-Test übereinstimmend gefunden werden, zur IgG-Klasse gehören. Der Standard Luminex Test weist nur IgG-AK nach, da als Detektionsantikörper ein anti-humanes IgG verwendet wird. Es ist bekannt, dass mit DTT IgM- und non HLA-AK zerstört werden können [77]. Das Procedere wird im LCT benutzt, um zwischen IgG und IgM-AK bzw. non HLA zu unterscheiden. Zur Klärung der Frage IgG oder IgM haben wir ein Serum mit und ohne Zusatz von DTT untersucht (Serum #14), das zu der Patienten-Gruppe N/N gehört (Klasse I und II AK-negativ, Zugehörigkeit laut Standard Luminex). Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 16. Testansatz C4d-Luminex für ein Serum (#14) aus der Patientengruppe N/N mit und ohne DTT-Behandlung, verglichen mit LCT und B-LCT. Die Ergebnisse im LCT/B-LCT sind in Prozent Panel-Reaktivität dargestellt.

Test	ohne DTT	mit DTT
LCT	0%	0%
B-LCT	29%	0%
Standard Luminex Mix	negativ	negativ
Standard Luminex SAI/II	negativ	negativ
C4d SAI	50%	0%
C4d-SAI	negativ	negativ

Serum #14 ist ein im Standard Luminex negatives Serum nach NTX. Aus dem Routineansatz konnten keine HLA-AK im LCT und im Standard Luminex-Mix detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte der C4d-Luminex-Mix Klasse I (Daten nicht in der Tabelle gezeigt) deutliche positive Reaktionen, d.h. komplementaktivierende HLA-AK Klasse I (AK C4d-Mix

3. Ergebnisse

Klasse I positiv, Klasse II negativ). Die Analyse der Spezifitäten im C4d-Luminex-SAI ergab einem PRA-Wert von 50% mit plausiblen DRA gegen HLA-B62 (Inkompatibilität aus der NTX), starke kreuzreagierende AK gegen HLA-A11 (kreuzreagierend zu A3, auch Inkompatibilität der TX) und gegen weitere Ag wie B63, B75, B76, B77 (kreuzreagierend zu B62). Nach diesem zum LCT diskrepanten Befund wurde ein B-LCT angesetzt mit dem Ergebnis ohne DTT 19% positiv, mit DTT negativ. Diese Reaktion bestätigt die positiven Reaktionen in C4d-Luminex-Test. Die Zerstörung der AK im C4d-Luminex nach DTT-Behandlung zeigt, dass diese HLA-AK zu der IgM-Klasse gehören, oder sehr schwache IgG-AK sind, die im Standard-Luminex nicht detektiert werden. Eine DTT-Behandlung kann ebenso schwache IgG-AK zerstören. Hier sollte die Frage gestellt werden, ob die donorreaktiven IgM-AK relevant sind. Eine Idee zur Weiterentwicklung der C4d-Methode ist das gleichzeitige Verwenden von Detektions-AK gegen C4d-Komplement-Komponenten und IgG-Klasse HLA-AK. Hier sollte auch diskutiert werden, ob die HLA-AK, die in der Gruppe N/N mittels C4d-Test detektiert wurden, nicht nur zur IgM-Klasse gehören.

In einem zweiten Versuch wurde Serum #219 untersucht, das zu der Gruppe P/P gehört (Standard Luminex Mix Klasse I und II positiv). Der LCT war positiv, ebenfalls der C4d-Luminex-Mix und C4d-Luminex-SAI/II. Also es gab keine Diskrepanzen. Die AK-Spezifitäten, die im C4d zu finden waren, wurden im Standard Luminex ebenfalls detektiert. Das spricht dafür, dass diese AK zu der IgG-Klasse gehören. Nach Behandlung des Serums mit DTT war der C4d-Test (SAI und II) weiter positiv, die Intensität etwas schwächer im Vergleich zu unbehandeltem Serum. Einige Spezifitäten konnten nach DTT-Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden, wobei die DRA Klasse II (DR1 und DQ5) geblieben sind. Das deutet darauf hin, dass diese DRA-AK zu der IgG-Klasse gehören. Das Reduzieren der Spezifitäten kann durch die Zugehörigkeit zur IgM-Klasse erklärt werden, aber da diese auch im Standard-Luminex-Test zu finden sind, müssen sie zu IgG-Klasse gehören. Es ist bekannt, dass DTT auch einige IgG-AK zerstören kann. Ein Vergleich der Spezifitäten der AK, die gefunden worden sind, zeigt Tabelle 17.

3. Ergebnisse

Tabelle 17: Vergleich der AK-Spezifitäten Klasse I (a) und Klasse II (b) in den verschiedenen Methoden. Rot gezeichnet sind alle Spezifitäten, die in allen drei Ansätze zu finden sind; blau gezeichnet sind die neuen, zusätzlich detektierten Spezifitäten im C4d-Luminex-SA mit DTT (V.a. = Verdacht auf)

a)

	Standard Luminex SA I	C4d-Luminex-SA I	C4d-Luminex-SA I+ DTT
AK Spezifitäten	A1,A11, A26,A29,A30,A31 A34,A36,A43,A66,A68 B18 B37 B38,B39 B44 B45,B47,B49,B50,B52, B53,B57,B58,B59,B62,B63,B64,B65, B71,B72,B73,B76, A23,A24,A25,A32,A80,B13, B27, B41,B42,B48,B54,B55,B56,B60,B61, B67,B7	A1,A*11:02, B38, B39,B57,B73 , B76, A23, A24, A25, A32 ,A80 Cw15, B7,B8, B13, B27 B41,B42 ,B48,B54 ,B55, B56 , B60, B61, B67, B81 ,B82	A23 ,A24 ,A25 ,A32 A80, B7 ,B13 ,B27 B41, B42,B48 ,B54 B55, B56 ,B60, B61, B67, B81 B82, Cw15 ,B8

b)

	Standard Luminex SAII	C4d-Luminex-SA II	C4d-Luminex-SA2+DTT
AK Spezifitäten	DQ2,DR103,DR11,DR13,DR14, DR17,DR18,DR4,DR53 ,DR8,DR9, DRB1* 04:01/04:04/04:05 + V.a. DQA + DPB DQ5,DR1,DR10,	DR103, DP9, DP3 ,DP14, DP17,DP6,DP18, DR11, DR1 DR10 DQ*05:01	DR1, DR10, DQ05:01

Aus der Tabelle 17a ist zu erkennen, dass mit dem Standard Luminex Test 28 mehr IgG-AK Spezifitäten (11%) detektiert werden als im C4d-Test. Diese AK sind nicht komplementbindend und daher von unklarer Relevanz. Der Ansatz C4d-Luminex + DTT unterscheidet sich vom C4d-Standard-Ansatz ohne DTT einerseits durch das Fehlen von sieben AK-Spezifitäten der Klasse I und andererseits in dem Nachweis von zwei zusätzlichen HLA-Spezifitäten nach DTT-Behandlung. Im C4d-Luminex-Test werden nur die komplementaktivierenden AK nachgewiesen. Die sieben AK-Spezifitäten, die nach Zusatz von DTT im C4d-SAI fehlen, können schwache IgG-AK oder auch IgM-AK sein. In diesem Fall kann vermutet werden, dass die AK im Serum ein Gemisch von IgG und IgM AK sind. Genauso wie bei HLA Klasse I, ist auch bei Klasse II AK (s. Tabelle 17b) ein Unterschied zu beobachten. Im C4d-Luminex SAII wurden 11 AK weniger detektiert als im Luminex-Standard Test: diese AK sind nicht komplementaktivierend.

3. Ergebnisse

Die Wirkung von DTT im C4d-Test wurde bei noch einem weiteren positiven Serum (#1) aus der Patienten-Gruppe P/P getestet. Nach Behandlung mit DTT blieben bei HLA Klasse I und II nur die DRA-AK gegen Inkompatibilitäten der TX A11 und DR53. Ohne DTT waren noch ein DRA von Klasse I sowie ein von Klasse II detektierbar, die eventuell schwächer sind und durch DTT zerstört wurden oder ein Gemisch aus IgG und IgM-AK darstellen. Es bleibt die Frage, ob alle zytotoxische AK, unabhängig von der Ig-Klasse, bei der Auswahl von Spendern zu berücksichtigen sind.

3.2.2 Background und grenzwertige Ergebnisse im C4d-Luminex-Test

Background

Bei dem Standard Luminex-Test werden oft Patientenserum mit hohem Background beobachtet. Als erhöhter Background wird ein MFI-Wert des NC > 500 MFI bezeichnet. In diesem Fall ist der Ansatz nicht auswertbar. Um die Background-Problematik auch im C4d-Luminex zu untersuchen, wurden 10 Patientenserum ausgewählt, die im Standard-Luminex-Screeningtest (Mix) ein sehr hohes Hintergrundsignal zwischen 1145 und 6984 MFI zeigten. Im C4d-Luminex-Mix wurde kein erhöhter Background gefunden (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Background-Seren im C4dLuminex-Mix-Test angesetzt. NC-Bead Werte in MFI dargestellt.

Patienten Serum	NC-Bead Standard Luminex Mix(MFI)	NC-Bead C4d Mix (MFI)
X1	1500	79
X2	2300	455
X3	6984	27
X4	3148	51
X5	4311	121
X6	2345	33
X7	4138	404
X8	2460	21
X9	4157	22
X10	1605	77

3. Ergebnisse

Einfluss von Therapien

Im LCT-Test stellt die Therapie mit Medikamenten wie Rituximab oder OKT3, die gegen B- oder T-Zellen gerichtet sind, ein Problem dar. Nach solchen Therapien ist es nicht möglich, den LCT auszuwerten, weil alle Reaktionen unspezifisch stark positiv sind. Für den C4d-Luminex-Test wurde vermutet, dass diese Therapien die Testergebnisse nicht beeinflussen werden. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden zwei Seren von Patienten nach Rituximab-Therapie im C4d-Luminex untersucht. Im ersten Serum konnten HLA-Spezifitäten, die komplementaktivierend sind, erkannt werden. Die Ergebnisse waren plausibel. Im zweiten Serum war der C4d-Test komplett negativ, ohne Nachweis komplementaktivierender HLA-AK. Eine Bewertung des LCT oder des Kreuztestes war nicht möglich, da alle Reaktionen unspezifisch positiv waren. Die Ergebnisse zeigen, dass im Luminex-C4d-Test kein Background durch Rituximab oder OKT3 zu erwarten ist und keine bekannten Proteine oder Therapien, die das hohe Hintergrundsignal im Standard Test verursachen, hier den Ablauf der Reaktionen stören.

Grenzwertige Ergebnisse

Beim Durchführen des C4d-Luminex Mix lagen einige Messergebnisse im Grenzbereich. Als solche werden Resultate bezeichnet, die in der „Grauzone“ mit einer Ratio zwischen 1,2 und 3 liegen. Im C4d-SAI/II gab es keine Resultate in der Grauzone. Insgesamt 26 Seren waren in C4d-Mix Klasse I grenzwertig. Davon wurden 20 Seren in C4d-SA I plausibel positiv getestet, 12 Seren davon mit donorreaktiven oder kreuzreagierenden HLA-AK zu Inkompatibilitäten der TX. Sechs von den Seren in der Grauzone im C4d-Luminex-Mix wurden als negativ im C4d-SAI getestet. Beim Klasse II C4d-Mix wurden 12 Seren mit grenzwertigen Ergebnisse gefunden, davon 11 Seren im C4d-SAII als positiv getestet, ein Serum als negativ. Von diesen 11 positiven Seren wurden in 10 davon DRA gefunden, in einem Serum nur DQA-AK. Die Plausibilität dieser konnte nicht geklärt werden, da vom Patienten keine DQA-Typisierung vorlag. Insgesamt können wir empfehlen, dass alle im C4d-Mix grenzwertige Befunde mit C4d-SA spezifiziert werden, um ein eventuelles Übersehen relevanter HLA-AK zu vermeiden. Diese Resultate zeigen uns, dass der C4d-Mix Test weniger sensitiv ist, als der C4d-SA Test, was auch bei dem Standard Luminex Mix-Test beobachtet wurde.

3. Ergebnisse

3.2.3 Vergleich der Resultate im LCT und im C4d-Luminex-Test

In dieser Studie wurden insgesamt 199 positive und 62 negative Patientenseren nach NTX untersucht. Bei den meisten Patienten lagen die Befunde vom Luminex Routine-Test und G-LCT vor. Die fehlenden wurden zusätzlich angesetzt. Bei Diskrepanzen zwischen den beiden Methoden, die komplementaktivierende HLA-AK detektieren, C4d-Test und G-LCT, wurde ein B-LCT durchgeführt. Alle 261 wurden erstmals mit dem C4d-Mix-Test untersucht. Bei den Seren, die im C4d-Mix positiv waren, wurden C4d-SAI oder SAII zur Bestätigung und Spezifizierung der HLA-AK angesetzt. Nachfolgend werden die Ergebnisse im LCT und C4d-Luminex verglichen, um die Vorteile der neuen Methode zu beweisen.

Von 199 positive Seren im Standard Luminex Test waren 77 Seren im C4d (SA) und 36 im LCT (G-LCT und B-LCT nach DTT-Behandlung) als positiv getestet (Zahlen pro Serum berechnet, nicht pro Klasse I bzw. II Reaktion). Diese Ergebnisse zeigen, dass 39% der Patienten, die als positiv im Standard Luminex getestet wurden, komplementaktivierende HLA-AK haben, detektiert mittels C4d-Luminex-Test, im Vergleich zu 18% Patienten mit zytotoxischen AK, nachgewiesen mittels der Standardmethode LCT. Das bedeutet, dass in 21% der Fälle komplementaktivierende sicher relevante HLA-AK nicht erkannt geblieben sind.

Nachfolgend werden die einzelnen Patientengruppen getrennt angeschaut und analysiert.

N/N-Gruppe

Die N/N-Gruppe beinhaltet 62 Seren von Patienten, die im Standard Luminex Mix I und II und in G-LCT routinemäßig als negativ getestet wurden. Im C4d-Mix wurden überraschenderweise 9 Seren für Klasse I positiv getestet. Klasse II waren alle Proben C4d negativ, bis auf ein Serum, wo DQA1 und DP HLA-AK nachgewiesen wurden. Aus diesen 9 positiven Seren wurde ein Serum als negativ getestet. Die Erklärung für die Diskrepanz, sind die sehr schwachen Signale in Mix, die in der Grauzone mit Ratio 1,2 bei dieser Probe getestet wurden. Ein Serum war im C4d-Mix negativ, im C4d-SAI aber positiv. Der Ansatz in Mix wurde daher wiederholt. Es gab erneut ein negatives Ergebnis in C4d-Mix. Der Grund für das Ansetzen dieses Serums im C4d-SAI war ein in Vorfeld positives Ergebnis im LCT, welches nach DTT 3,5% PRA ergab. Diese anscheinend niedrig-titrigen AK lassen sich mit den Mix-Beads, die mit verschiedenen Ag-Spezifitäten beladen sind, nicht nachweisen. Die

3. Ergebnisse

AK in C4d-Luminex waren nicht donorspezifisch oder kreuzreagierend. Sie können durch Transfusionen oder durch Konfrontation mit natürlichen Ag entstanden sein. Mit demselben Serum wurde auch den C4d-SAII angesetzt und es wurden zytotoxische DQA und DP AK nachgewiesen. Die Plausibilität konnte allerdings nicht geprüft werden, da die Typisierung des Patienten für Locus DQA und DP fehlte. Die AK-Spezifitäten bei fünf von den C4d-positiven Seren waren nicht donorspezifisch und kreuzreagierend zur Inkompatibilitäten der TX. Im AK-Muster wurden bekannte „natürliche AK“, gegen B37, B63 und A*11:02, gefunden. In zwei der C4d-SA positiven Proben wurden schwache DRA (MFI zwischen 200 und 950) nachgewiesen, die sich gegen das aktuelle Transplantat richten. Beide Patienten hatten AK gegen die Inkompatibilität der TX B62 und gegen weitere kreuzreagierende AK. Es gab keine Information über Rejektionsverdacht oder Organfunktionsverschlechterung. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem Standard Screening Test Luminex-Mix relevante DRA unentdeckt bleiben können, die mit dem C4d-Test detektierbar sind und eventuell mit der Zeit eine Rejektion hervorrufen können. Mit C4d-Luminex wurden insgesamt 2 Seren gefunden, bei denen de novo DRA im Vergleich zum LCT nachgewiesen wurden. Verglichen mit Standard Luminex bleibt die Zahl der neu detektierten Seren mit DRA bei 2. Diese DRAs gehören zu Klasse I HLA-AK. Die folgende Tabelle 19 zeigt den Vergleich zwischen LCT und C4d-Luminex für die N/N Gruppe:

3. Ergebnisse

Tabelle 19: Anzahl Seren mit DRA (A) und Gesamtanzahl der Seren mit komplementaktivierenden HLA-AK im LCT und C4d-Luminex (SA) (B) für die Gruppen N/N, N/P, P/N und P/P.

A)

<i>Anzahl Seren mit DRA</i>	<i>C4d-Luminex</i>	<i>LCT (G-LCT+B-LCT)</i>	<i>neue DRA im C4d-Luminex</i>
DRA Klasse I			
N/N	2	0	2
N/P	3	0	3
P/N	9	6	3
P/P	8	3	5
DRA Klasse II			
N/N	0	0	0
N/P	5	0	5
P/N	2	0	2
P/P	18	1	17
DRA Klasse I+II			
N/N	2	0	2
N/P	8	0	8
P/N	11	6	5
P/P	24	4	20

B)

<i>Anzahl Seren mit komplementaktivierenden HLA-AK</i>	<i>C4d-Luminex</i>	<i>LCT (G-LCT+B-LCT)</i>
Klasse I		
N/N	8	2
N/P	8	1
P/N	19	11
P/P	27	21
Klasse II		
N/N	1	0
N/P	7	0
P/N	2	0
P/P	22	1
Klasse I+II		
N/N	8	2
N/P	14	1
P/N	21	11
P/P	34	22

Wie aus der Tabelle zu sehen ist, detektiert der C4d-Test komplementaktivierende und donorreaktive AK, die im LCT nicht nachweisbar sind. Das ist wahrscheinlich auf die

3. Ergebnisse

Sensitivität der Methoden zurückzuführen. Mit dem C4d-Luminex wurden insgesamt 8 Seren mit komplementaktivierenden HLA-AK gefunden, davon 2 waren mit DRA, die zum ersten Mal mittels C4d-Luminex nachgewiesen wurden. Erstaunlich und unerwartet war die Tatsache, dass in dieser Gruppe mit Patienten, die für HLA Klasse I und II im LCT und Standard-Luminex negativ sind, relevante komplementaktivierende HLA-AK gefunden wurden.

N/P-Gruppe

In die N/P-Gruppe (im Standard Luminex Mix I/ II und in G-LCT für Klasse I negativ getestete und für Klasse II positiv getestete Seren) wurden 63 Patienten eingeschlossen. Davon war nur ein Serum mit nachgewiesenen zytotoxischen AK im G-LCT und zwar mit 3,7% Panelreaktivität, welches als negativ im LCT gilt (als positiv gelten Seren, die Panelreaktivität >5% haben). Beim Nachsatz der im C4d-Luminex und LCT diskrepanten Seren im B-LCT, war ein Serum positiv, mit zytotoxischen HLA-AK. Unter den Klasse I negativen Seren gab es zwei, die aktuell im Standard-Luminex-Test negativ sind, aber historisch positiv waren, und ein Serum mit starken MICA AK ohne Nachweis von Klasse I AK. Zusätzlich war ein Serum ohne DTT mit PRA 15,4% positiv, das nach der Behandlung mit DTT als negativ getestet wurde. In diesem Serum wurden mit unserem C4d-Test donorspezifische komplementaktivierende AK Klasse II gegen DR53 detektiert.

Von den untersuchten Patienten waren erstaunlicherweise 13 Seren im C4d-Mix Test positiv, 7 davon Klasse I und 6 Klasse II. Im C4d-SAI wurden 8 positive Seren detektiert, in C4d-SA2 7 positive, insgesamt 14 Seren mit komplementaktivierenden AK. Die Standardmethode LCT hat nur ein Serum mit schwachen zytotoxischen HLA-AK detektiert. Falsch negativ war der C4d-Mix-Test in einem Fall für Klasse I und in einem Fall für Klasse II, falsch positiven C4d-Mix-Test für Klasse I in 2 Fälle, verglichen mit C4d-Luminex-SA. Für die diskrepanten Seren wurde C4d-Luminex-Mix wiederholt und die Ergebnisse sind unverändert geblieben.

Zusammenfassend wurden bei insgesamt 22% der Patienten der N/P-Gruppe zytotoxische HLA-AK nachgewiesen und nur bei 1,6% mittels LCT. Zwischen den 8 C4d-positiven Seren Klasse I aus dieser N/P-Gruppe wurden 3 Seren entdeckt, die donorspezifische und deren kreuzreagierende HLA-AK gegen das aktuelle Transplantat besitzen. 4 der Seren weisen keine durch TX erklärbaren HLA-AK auf. Sie sind möglicherweise durch andere

3. Ergebnisse

Immunisierungsereignisse entstanden. Bei der Analyse der Klasse II AK, wurden 5 Seren mit DRA gegen das aktuelle Transplantat und 2 Seren mit donorspezifischen AK identifiziert, die gegen die schon ektomierte Niere aus vorherigen TX gerichtet sind. Die 3 HLA-Klasse I und 5 Klasse II komplementaktivierenden AK waren mittels C4d-Test neu detektiert. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der N/P Gruppe zusammengestellt. Die Daten zeigen, dass alle DRA in dieser Gruppe ausschliesslich neu detektiert worden sind. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass in 5 Fällen mit Klasse II DRA und in 3 Fällen mit Klasse I DRA, komplementaktivierende HLA-AK gefunden wurden, die ein erhöhtes immunologisches Risiko darstellen, eventuell eine Therapieanpassung benötigen und bei allen Standard Screening-Tests (Luminex und LCT) unentdeckt geblieben sind. Die geringe Sensitivität der LCT-Methode im Vergleich zu unserem *in house* modifizierten C4d-Test ist ein sehr wichtiges Ergebnis in dieser Arbeit.

P/N-Gruppe

Die P/N-Gruppe umfasst 67 Patienten, die im Standard Luminex-Test für HLA Klasse I AK positiv und für Klasse II AK negativ getestet wurden. 11 Seren davon waren LCT positiv, 21 Seren positiv in C4d-Test (Mix mit SA-Bestätigung). Beim C4d-Mix Klasse I wurden bei 19 Seren zytotoxische AK nachgewiesen, in C4d Mix Klasse II bei zwei Seren. Alle C4d positive Seren wurden bestätigend ebenso in C4d-SAI und II als positiv getestet. Von den HLA-Klasse I C4d positiven Seren gab es 9 mit DRA gegen das aktuelle Transplantat (3 davon neu im C4d-Luminex detektiert im Vergleich zum LCT), 2 mit DRA gegen ein vorheriges Transplantat und 5 Seren, die kreuzreagierende HLA-AK zu DRA aufweisen. Im Vergleich zum Luminex Standard-Test waren davon 2 Seren mit neuen DRA HLA-AK. Die restlichen Seren hatten keine HLA-AK, die durch die Transplantation erklärbar sind. Die zytotoxischen Klasse II AK waren in beiden Fällen donorspezifisch gegen das aktuelle Organ und zum ersten Mal durch unseren C4d-Test als zytotoxisch detektiert, im Vergleich zum LCT wie auch zum Standard-Luminex. Das bestätigt eine Beobachtung in dieser Arbeit, dass die Klasse II zytotoxische HLA-AK meistens donorreaktiv sind. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse vom Vergleich zwischen LCT und C4d-Luminex, bezüglich DRA AK, für diese Gruppe.

3. Ergebnisse

P/P-Gruppe

In der P/P-Gruppe wurden 69 HLA positive (Klasse I +Klasse II) Seren aufgenommen. 32% der Patientenserum waren im LCT (Gesamtzell-LCT) positiv. Im C4d-Test wurden 34 Seren als positiv getestet (49%), 27 davon waren für Klasse I positiv, 22 Seren für Klasse II. Von den 22 HLA-Klasse II positiven Seren war ein Serum im C4d-Mix falsch negativ, und ein Serum hatte AK gegen DQA1. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse beim Vergleich zwischen LCT und C4d-Luminex für die P/P Gruppe. Die komplementaktivierenden HLA-AK, detektiert mittels C4d-SA1 waren in 8 der Seren donorspezifisch gegen das aktuelle Transplantat, in 10 Proben waren es DRA gegen vorherige Transplantationen. Die Klasse II AK, nachgewiesen mittels C4d-SA2, waren in 18 Seren donorspezifisch gegen das aktuelle Transplantat, in 3 der Fälle waren die AK gegen Ag der vorherigen Transplantationen gerichtet. Wichtig für den Vergleich der Methoden ist die Tatsache, dass mit C4d-SA-Luminex, 5 neue DRA für Klasse I detektiert wurden, 17 für Klasse II. Insgesamt wurden im C4d-Luminex-Test 20 Seren mit DRA entdeckt, die gegen das aktuelle Transplantat gerichtet sind. Zusammenfassend kann man sagen, dass durch C4d-Luminex in jeder Gruppe mehr und neue DRA HLA-AK gefunden wurden, im Vergleich zum LCT. Solche AK sind relevant und müssen berücksichtigt werden (s.Tabelle 20).

Tabelle 20: Von allen untersuchten Seren ist die Anzahl der Seren mit komplementaktivierenden AK, nachgewiesen mittels LCT bzw. C4d-Luminex, als % dargestellt.

Gruppe	Anzahl untersuchten Seren	C4d pos	C4d pos mit DRA	LCT pos	LCT pos mit DRA
N/N	62	13%	3%	3%	0%
N/P	63	22%	13%	2%	0%
P/N	67	31%	16%	16%	9%
P/P	69	49%	35%	32%	6%

In der N/N-Gruppe konnten wir 10 % mehr komplementaktivierende HLA-AK mittels C4d nachweisen im Vergleich zum LCT. 3% von diesen HLA-AK sind donorspezifisch und mit dem Standard-Test LCT nicht detektierbar. Komplementaktivierende HLA-AK wurden am meisten in der Gruppe P/P gefunden, wobei im C4d-Test 17% mehr HLA-AK im Vergleich

3. Ergebnisse

zum LCT Komplement aktivieren. Gravierend ist der prozentuelle Unterschied von 19% bei den DRA HLA-AK in dieser Gruppe. Das bedeutet, dass 19% der Seren in der P/P Gruppe mit DRA sind, die im LCT nicht detektiert wurden. Ähnlich groß ist der Unterschied in der Gruppe N/P: 13% der Seren besitzen DRA, die mittels LCT nicht erkannt wurden. Auffallend ist, dass der Unterschied bei der HLA-Klasse II größer ist. Das bestätigt die Meinung in der Praxis, dass die LCT-Methode weniger gut geeignet ist, um HLA Klasse II-AK zu detektieren [78]. Abbildung 14A und 14B zeigt die Anzahl C4d positive Seren in jeder Gruppe für Klasse I-AK (14A) und Klasse II-AK (14B).

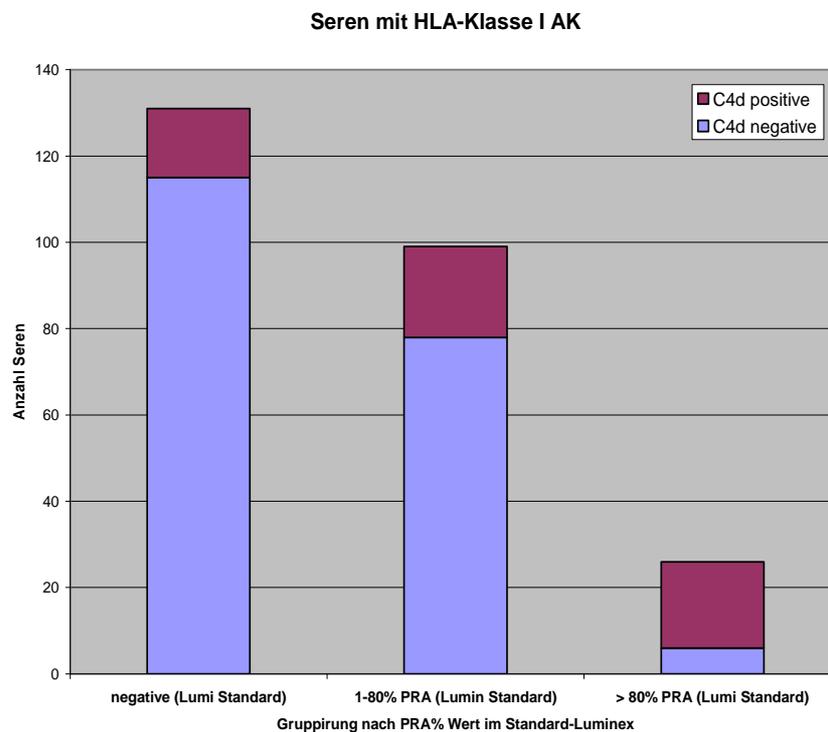


Abbildung 14A: HLA-Klasse I-AK detektiert mittels Luminex Standard-Test und C4d-Test.

3. Ergebnisse

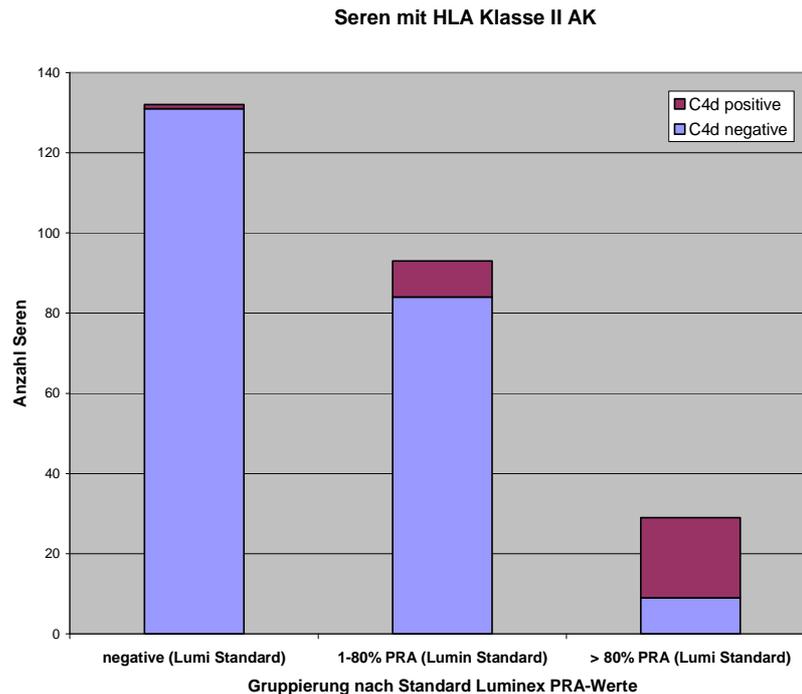


Abbildung 14B: HLA-Klasse II Ak, detektiert mittels C4d- und Standard-Luminex.

Sowohl bei Klasse I auch bei Klasse II HLA-AK ist es zu beobachten, dass die Seren mit HLA-AK >80 % PRA deutlich mehr komplementaktivierende AK besitzen. Das unterstützt unsere Hypothese, dass mit der Titererhöhung der AK mehr HLA-AK komplementaktivierend werden. In Prozente berechnet sind unter den in Luminex Standard Test negativen Seren 12% mit C4d positiven HLA-AK Klasse I und 1% Klasse II. In der Gruppe von Seren, die ein PRA zwischen 1 und 80% im Luminex haben, haben wir 21% Klasse I AK, die C4d positiv sind und 10 % Klasse II AK. Für die Gruppe Seren, die im Luminex ein PRA > 80 % aufweisen wurden 77% C4d positiven AK Klasse I und 69% Klasse II AK gefunden. Wir fanden, dass die Seren mit PRA >80% im Standard Luminex Test, in 73% (MW Klasse I+II) der Fälle komplementaktivierende HLA-AK besitzen, was eine Gefahr für das langfristiges Transplantatüberleben darstellt. Diese Erkenntnis kann ein Hinweis für die Kliniker sein, dass mit Erhöhung der PRA im Luminex eine eventuelle Organschädigung mit Funktionsverlust bevorsteht.

3. Ergebnisse

3.2.4 Statistische Auswertungen

Statistische Auswertung der Daten (Patientendaten, TX-Anzahl, Nachweis HLA-AK) wurde mittels Korrelation nach Pearson, Spearman-Rho und Kreuztabellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wurde keine oder sehr geringe Korrelation zwischen nachfolgend erwähnten Daten gefunden. Eine sehr geringe Korrelation (0,298 nach Pearson) wurde zwischen positiven C4d-Mix Ergebnissen und TX-Anzahl gefunden. Es gab eine ebenso geringe Korrelation von 0,271 zwischen den aktuellen Kreatininwert (bei Serumentnahme) und C4d-positiven HLA-AK Klasse II. Von allen 162 Seren von männlichen Patienten waren 63,6% C4d negativ und 36,4% C4d positiv. Von den 105 Seren aus weiblichen Personen waren 80% negativ und 20% C4d positiv. Allerdings sollten Studien und statistische Auswertungen bei einer größeren Zahl (hier 267 Seren in 4 Gruppen aufgeteilt) der Grundgesamtheit durchgeführt werden, um relevante Aussagen zu treffen.

3.2.5 Fallbeschreibungen

Im Folgenden werden einige wichtige Beispiele aus den oben aufgeführten Resultaten beschrieben. Diese Beispiele haben das Ziel, die Bedeutung des neuen Routine C4d-Tests zu betonen und die Relevanz der im C4d-Luminex detektierten HLA-AK zu klären.

Beispiel 1

Wie bei Punkt 3.2.3 beschrieben, wurden zusätzliche DRA durch C4d-Luminex detektiert, die im LCT und miunter sogar im Standard-Luminex nicht nachweisbar waren. Diese DRA wurden im C4d-Mix nachgewiesen und mit C4d-SA spezifiziert und damit bestätigt. Da der Standard LCT offensichtlich nicht sensitiv genug ist, um diese HLA-AK zu erfassen, ergab sich die Überlegung alle Seren, die im C4d und Standard LCT diskrepant waren, noch ein Mal im LCT mit B-Lymphozyten zu untersuchen (B-LCT). Der B-LCT ist sensitiver als der LCT mit Gesamtzellen und erfasst Klasse I und Klasse II HLA-AK mit höherer Sensitivität. Die erste Vermutung hier war, dass alle C4d-positiven und LCT-negativen Seren einen positiven B-LCT haben würden. Die Vermutung hat sich nicht bestätigt. Ein Beispiel dafür ist Serum # 131 aus der Gruppe P/N. Das Serum wurde im LCT und B-LCT negativ getestet. Der Standard Luminex war bekannt positiv, ohne Nachweis von DRA. Im C4d-Mix wurden

3. Ergebnisse

schwach positive zytotoxische AK nachgewiesen, die weiterhin mit dem C4d-SA1 bestätigt wurden. Der C4d-Luminex-Test hat AK gegen HLA A11 detektiert, die donorspezifisch sind. Es sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die klinische Relevanz und die Möglichkeit einer Rejektion durch solche Ergebnisse hervorsagen zu können. Eine weit verbreitete Meinung ist, dass im Standard Luminex zu viel HLA-AK detektiert werden [55,63,64,79]. Unsere Erwartungen waren, dass der neu modifizierte C4d-Luminex-Test uns nur zeigen würde, welche von den bereits in Standard Luminex detektierten AK zytotoxisch reagieren. Nicht erwartet war in diesem Beispiel, die Abwesenheit des DRA HLA A11 beim Nachweis im Standard-Luminex. Dieses Beispiel lässt vermuten, dass die Reaktion beim Nachweis von C4d-bindenden HLA-AK und Nachweis von IgG-HLA-AK unterschiedlich im Luminex Test abläuft oder diese DRA keine IgG-AK sind. In weiteren Seren (Serum #2 und #13) mit negativen Ergebnisse im LCT und B-LCT, wurden auch DRA (gegen A1 und Cw9 bei Serum #2, gegen A2 bei Serum # 13) nachgewiesen, die nicht im Standard Luminex detektierbar sind. Mit diesem Versuch zeigen wir, dass auch Cw-AK gebildet werden: komplementaktivierend und donorspezifisch. Die AK wurden weder im Standard-Luminex erfasst, noch im LCT.

Beispiel 2

In einem anderen Fall (Serum #24, #35 der Gruppe P/P, zwei Seren von demselben Patienten) wurde der B-LCT als positiv getestet bei einem negativen LCT. Aus dem Standard-Luminex waren Klasse I und II HLA-AK bekannt. Unter der Klasse II AK wurde der donorspezifische DR53 drei Monate nach TX zum ersten Mal detektiert. Sechs Jahre nach NTX wurden de novo DRA gegen DQ7 detektiert. Zwei Wochen später wurde der Verdacht einer Rejektion geäußert. Diese zeitliche Beobachtung lässt uns schließen, dass in diesem Fall AK gegen DR53 keine Relevanz für das Transplantat-Überleben haben, im Gegensatz zu den HLA-AK gegen DQ7, die wahrscheinlich zur Funktionsverschlechterung beigetragen haben. Diese Vermutung wurde aber durch den C4d-Test nicht bestätigt. Es wurden vier Seren von diesem Patienten untersucht, zwei nach und zwei vor Rejektionsverdacht. In den Seren nach Rejektion waren die komplementaktivierende DRA gegen DR53 und DQ7 eindeutig nachweisbar. Erstaunlicherweise waren diese AK auch in den Seren vor Rejektion detektierbar, und zwar 3 Monate vor dem ersten Nachweis im Standard-Luminex. Es kann sein, dass die DRAs gegen DQ7 noch viel früher gebildet wurden, aber es wurden keine

3. Ergebnisse

weiteren Seren dieses Patienten im C4d-Test untersucht. Dieser Fall zeigt, dass die C4d-Methode mit höherer Sensitivität und viel früher als der Standard Luminex und LCT einen Hinweis auf klinisch relevante zytotoxische DRA liefert. Die zeitliche Überlegenheit der Methode sollte dazu führen, sie in der Routine zu verwenden und damit sicherer auf mögliche Rejektionen hinzuweisen.

Beispiel 3

In einem Serum (# 197) aus der Gruppe N/P, das im B-LCT positiv getestet wurde, war der Standard-Luminex für Klasse I und II negativ, es wurden nur MICA-AK detektiert, deren Relevanz derzeit noch wissenschaftlich diskutiert wird [15,80]. Der B-LCT Test wurde nachträglich nach den positiven C4d-Luminex-Resultaten angesetzt. Im C4d-SAI wurden 35 komplementaktivierende HLA-AK gegen Ag aus dem B-Locus detektiert, die im Standard Luminex (IgG-) AK-Test nicht nachweisbar waren. Vier von den AK sind kreuzreagierend zu donorspezifischen Antigenen. Eine Recherche im Standard-Luminex-Test hat ergeben, dass Klasse I AK immer nur im Luminex-Mix Test untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigten eine grenzwertige Ratio von 1,5 für Klasse I AK. Die Regelung im unseren Labor ist, dass Spezifizierungen nur bei stärker positiven Ergebnissen (Ratio mehr als 1,5-2,0) angesetzt werden. Aufgrund dessen wurde damals in diesem Fall die Entscheidung getroffen, keine weitere Spezifizierung in SAI durchzuführen. Mit dem C4d-Luminex-Test konnten die zytotoxischen AK eindeutig definiert werden. Die Frage war, ob diese AK im SAI nachweisbar sind. Ein SAI konnte nicht weiter angesetzt werden, weil es nicht genügend Material gab. Die Relevanz der detektierten AK ist nicht klar, aber auf die Möglichkeit, komplementaktivierende AK zu detektieren, sollte möglichst nicht verzichtet werden.

Beispiel 4

In Kapitel 3.2.3 wurde erwähnt, dass in zwei Fällen, bei denen der C4d-Mix negativ ausgefallen war, obwohl im C4d-SAI/SAII zytotoxische AK detektierbar waren. In diesen zwei Fällen (Serum #4 und #20 der Gruppe P/P) wurden zusätzlich C4d-SAI-Tests angesetzt. Fragestellung hier war, ob der C4d-Mix-Test für Klasse II wirklich negativ ist, weil die Patienten starke zytotoxische Klasse I Ak und über 90 % Klasse II Ak im Standard Luminex nachweisbar hatten. C4d SAI war ebenfalls positiv. Serum #4 ist ein im G-LCT und B-LCT negatives Serum, Klasse I IgG-AK (nicht donorspezifisch) und Klasse II sind aus dem

3. Ergebnisse

Standard-Luminex bekannt. Im C4d SAI wurden zum ersten Mal zytotoxische DRA nachgewiesen. Im C4d SAII wurden starke DRA gegen DQ3 detektiert. Im Serum #20 wurden genauso de novo zytotoxische Klasse II AK gegen DQ9 gefunden. Hiermit muss die Frage gestellt werden, ob der weit verwendete Luminex Mix als Screening-Test geeignet ist.

Noch zwei Beispiele für das Versagen des Luminex-Mix Test sind die Seren #59 und #78. Bei Serum #59 wurden in Standard Mix bisher keine HLA-Klasse I AK nachgewiesen. Der C4d-Test mit zwei Seren von diesem Patienten, angesetzt mit der Luminex Mix Beadpopulation, ergab ein Mal ein positives und ein Mal ein negatives Ergebnis. Diese Seren wurden im C4d-SA1 angesetzt und es wurden starke zytotoxische DRA AK gegen B15 nachgewiesen. Daraufhin wurde auch Standard Luminex SA1 nachgesetzt mit positivem Ergebnis für DRA gegen B15. Hier ist der Luminex Mix ein Mal im C4d und ein Mal im Standard Luminex falsch negativ ausgefallen. Serum #78 ist noch ein Hinweis für das Versagen des Mix-Tests. Im Standard Luminex Mix wurden in Rahmen der 8 Jahre AK-Screening nie HLA-Klasse I AK nachgewiesen. Es gab nur einmal ein grenzwertiges Ergebnis, welches aber weiterhin nicht bestätigt wurde. Im C4d-Tets wurden vier Seren verschiedener Abnahmen und mit zeitlichen Abständen von diesem Patienten untersucht (s. Tabelle 21). Im C4d Mix waren alle Seren für Klasse I AK positiv, im C4d SAI wurden DRA gegen A25 und B44 nachgewiesen. Ein Nachsatz des Standard SA1 Tests hat auch DRA nachgewiesen. Damit wurde noch mal die niedrige Sensitivität der Mix Beadpopulation gezeigt.

3. Ergebnisse

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse aus allen HLA-AK-Austestungen zu verschiedenen Zeitpunkten und mit verschiedenen Methoden.

Abnahmedatum	Standard Luminex Mix		LCT		C4d-Mix		C4d SA		Standard SA	
	LS1Mix	LS2Mix	G-LCT +DTT%	B-LCT +DTT	C4d-Mix Kl.1	C4d-Mix Kl.2	C4d-S1,Spez.	C4d-S2 %	SA1-Spezif.	SA2-Spez.
19.04.2010	N	P	0	0	pos	neg	B37 B63 B46 B38 B59 B75 B77 A34 B18 B52 B62 B51 B48 B65 B49 B82 B39 B53 B60 B47 B76 A66 B41 B54 B71 B72 B50 B44 A25 B13 B8 B27	0	keine Spezifizierung, da Standard Mix negativ	DQ5,DQ6
14.06.2010	N	P	0	0	pos	neg	B37 B63 B46 B38 B59 B75 B77 A34 B18 B52 B62 B51 B48 B65 B49 B82 B39 B53 B60 B47 B76 A66 B41 B54 B71 B72 B50 B44 A25 B13 B8 B27	0	Spezifizierung Routinemäßig nicht erfolgt Nachgesetzt SA1-- > stark positiv Cw5 Cw17 Cw10 Cw9 Cw6 Cw18 Cw14 Cw16 Cw2 Cw8 Cw4	DQ5,DQ6
22.09.2010	P	P	0	0	pos	neg	Ohne Änderung zum Vorbefund	0	Grenzwertig, eher in der Grau Zone B44,B45,B76	DQ5,DQ6
14.04.2011	N	P	0	0	pos	neg	Ohne Änderung zum Vorbefund	0	keine Spezifizierung, da Standard Mix negativ	DQ5,DQ6

Die rot markierten HLA-AK sind die donorspezifischen AK zum aktuellen Transplantat. Wie zu sehen ist, ist das Resultat des Luminex Standard Mix I falsch negativ, im Vergleich zum C4d-Mix I, LCT und Standard Luminex SAI. Außerdem im Standard Luminex SAI werden andere Spezifitäten detektiert, welches für die unterschiedliche Zugehörigkeit der AK zu einer Ig-Klasse spricht. Diese Beispiele weisen daraufhin, dass der weit verbreitete als Screening-Test Luminex Mix nicht sensitiv genug ist, wichtige transplantationsrelevante IgG oder C4d-positive AK nachzuweisen.

Beispiel 5

Bei der Testung der Patientenseren wurde eine sehr wichtige Beobachtung gemacht: Es ist sehr wahrscheinlich, dass zytotoxische AK kurz vor einer Rejektion nicht mehr frei im Serum nachweisbar sind. Wenn sich diese Vermutung bestätigt, könnte durch den C4d-Luminex-Test gezeigt werden, wann eine Rejektion bevorsteht. Um das zu zeigen, wurden einige Patientenseren retrospektiv im Verlauf getestet. Die erste Reihe von Seren stammt von einem Patienten, der zum zweiten Mal transplantiert wurde. In der Tabelle 22 sind die Ergebnisse

3. Ergebnisse

der Untersuchung von acht Seren dieses Patienten gezeigt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen wurden.

Tabelle 22. Austestung von acht Seren, im Zeitrahmen von 4 ½ Jahren, von einem Patienten im Vergleich zwischen LCT, C4d- und Standard-Luminex.

Codierung Serum	Abnahmedatum	G-LCT +DTT PRA %	G-LCT Spezifitäten	C4d-Mix Klasse I	C4d-Mix Klasse II	C4d-SA1, Spezifitäten	C4d-SA2, Spezifitäten	Standard Luminex SA1-Spezifitäten	Standard Luminex SA2-Spezifitäten
218	05.04.2006	39	A2,A28	pos	neg	A11 A2 A24 A68 A69 B42 B49 B50 B55 B56 B62 B67 B72 B82	negativ	A2,28,24,B5, 35, fraglich A3,A11	negativ
202	03.01.2007	30	A2	pos	neg	A11 A2 A24 A68 A69 B42 B49 B50 B55 B56 B62 B67 B72 B82	negativ	positiv, nicht spezifiziert	negativ
201	04.04.2007	30	A2	pos	neg	A2,A68,A24,B49,B50,A11 A69,B55,B42,B72,B62,B82,B56	negativ	positiv, nicht spezifiziert	negativ
200	04.07.2007	33	A2	pos	neg	A2,A68,B49,A24,B50,A69 A11,A25,A32,B62,B72,B55,B42	negativ	A1,2,3,9,11,28, 80, A10, B5,7,15,17,21,22,35,42, 53,67,,70,75,77,78,81,82 01	negativ
216	29.08.2007	7		pos	neg	A2 B49 B50	negativ	A2,28, B54,55,56, fragl. B21	negativ
214	28.12.2007	37	A2	pos	neg	A2 B49 B50	negativ	A2,28, B54,55,56, fragl. B21	negativ
204	07.07.2010			neg	pos	negativ	DQ8.DQ9.DQ7.DQ4.DR13	A11,A2,A24,A68,A69,B38,B42,B49,B50,B52,B54,B55,B56,B57,B58,B62,B63,B67,B71,B72,B82,CW4	DP14,DP17,DP3,DP9,DQ4,DQ6,DQ7,DQ8,DQ9,DR103,DR11,DR12,DR13,DR14,DR15,DR16,DR17,DR18,DR4,DR8, DRB1*1501, DRB1* 0402, V.a. DQA-Ak
187	10.07.2010			neg	pos	negativ	DQ8.DQ9.DQ7.DQ4.DR13	A11,A2,A24,A68,A69,B38,B42,B49,B50,B52,B54,B55,B56,B57,B58,B62,B63,B67,B71,B72,B82,CW4	DP14,DP17,DP3,DP9,DQ4,DQ6,DQ7,DQ8,DQ9,DR103,DR11,DR12,DR13,DR14,DR15,DR16,DR17,DR18,DR4,DR8, DRB1*1501, DRB1* 0402, V.a. DQA-Ak

Der Patient war im LCT bekannt positiv für Klasse I, auch mit zytotoxischen AK. Klasse II AK waren bis zum 28.12.2007 (Serum #214) negativ. Ein Rejektionsverdacht wurde am 07.07.2010 (Serum #204) gemeldet. Genau in diesem Serum sind zum ersten Mal HLA Klasse II IgG AK nachweisbar und viel mehr Klasse I AK (A24, B38, B42, B52, B57, B58, B62, B63, B67, B71, B72, B82, CW4) im Vergleich zum Vorbefund (#214). Die de novo Klasse II IgG AK könnten die Rejektion erklären. Im Cd4-Luminex wurden genauso wie im Standard-Luminex Klasse I DRA bis Serum# 204 gefunden. In diesem und im darauffolgenden Serum#187 wurden keine zytotoxischen DRA Klasse I nachgewiesen. Der Befund hat sich bei den C4d-Mix- und C4d-SAI-Test bestätigt. Gleichzeitig wurden damit *de novo* zytotoxische DRA Klasse II nachgewiesen. Dieses Phänomen können wir mit dem Adsorbieren der DRA zytotoxischen Klasse I AK auf der Niere erklären. Das Fehlen von frei nachweisbaren zytotoxischen AK im Serum kann auf ein akutes und großflächiges Attackieren des Organs durch donorspezifisch komplementaktivierende AK hinweisen.

3. Ergebnisse

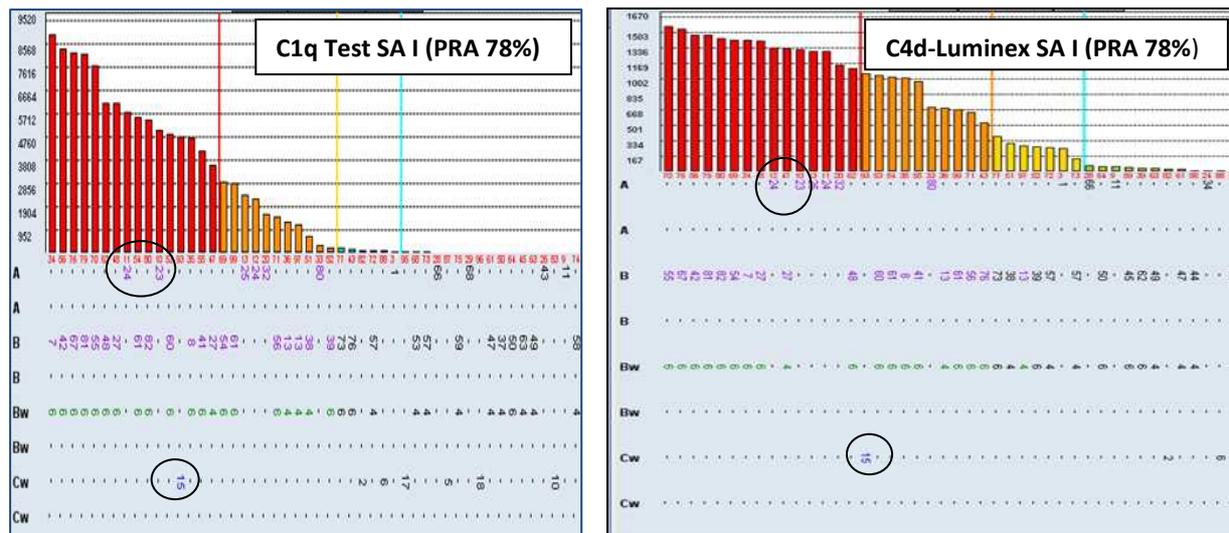


Abbildung 15: Vergleich zwischen Standard- Luminex-, C4d-Luminex- und C1q-Test für HLA-Klasse I. Die mit dem Kreis markierten Spezifitäten erleichtern den Vergleich für diese zufällig ausgewählten HLA-AK

Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass nur wenige HLA-AK, die im Standard-Luminex detektiert wurden, komplementaktivierend sind. Interessant ist die Tatsache, dass auch ein Cw-AK (Cw15) komplementaktivierend ist. Es gibt Diskussionen darüber, ob die HLA-Cw-AK überhaupt relevant sind. C4d- und C1q-Test zeigen eine große Übereinstimmung. Beim C4d-Luminex-Test wird in vitro das Komplementsystem aktiviert, beim C1q-Luminex hingegen nicht, sondern nur exogenes C1q-Protein zur Reaktion zugefügt. Mithilfe des C4d-Luminex-Tests wurde die Donor-Frequenz für diesen Patienten von 0% auf 5% erhöht, HLA-Klasse I hat PRA 78% ergeben, und für Klasse II 43%. Es wurden auch zusätzliche HLA-AK (z.B. AK gegen A32, A80, B54, Cw15 und andere) nachgewiesen, die im LCT nicht detektiert wurden. Der C4d-Luminex-Test ist somit eine Lösung für den Nachweis von HLA-Klasse II AK nachzuweisen, bei vorhandenen Klasse I AK. Zusammenfassend ergibt sich aus diesem Beispiel: mit dem C4d-Luminex-Test können wir aus den Luminex AK die relevanten herausfiltern, die Methode ist leichter auswertbar als ein LCT, zudem sensitiver und erfasst schwächere HLA-AK. Er ist unabhängig von vitalen Zellen im Gegensatz zum LCT. Die Vorteile machen den C4d-Test ein sehr hilfreiches und dringend benötigtes diagnostisches Hilfsmittel für den Routine HLA-AK Nachweis.

4 Diskussion

Der SPA Luminex-Test ist zurzeit die sensitivste und die am häufigsten verwendete Methode zum Nachweis von HLA-AK [59]. Die Technik detektiert HLA IgG-AK, aber erlaubt es nicht, zwischen komplementaktivierenden und nicht komplementaktivierenden HLA-AK zu unterscheiden. Die Tatsache, dass die klinische Relevanz der nachgewiesenen IgG AK im Luminex noch nicht vollständig geklärt ist und dass der Test sehr sensitiv ist, hat uns zu der Idee gebracht, die Luminex Methode zu modifizieren. Diese „in-house“-Modifikation erlaubt es, aus den HLA-AK nur die sicher relevanten komplementbindenden HLA-AK herauszufiltern. Dies würde in der Routine besonders für hochimmunisierte Patienten vor und nach Organtransplantationen sehr hilfreich sein und wird für die Einschätzung des immunologischen Risikos einer HLA-AK vermittelten Abstoßungsreaktion.

4.1 Besonderheiten bei der Etablierung der C4d-Methode

Ziel dieser Arbeit war an erster Stelle das Modifizieren der SPA-Technik Luminex zum Nachweis von komplementbindenden HLA-AK und das Etablieren der C4d-Methode als Routine-Methode. Die erste Forschungsgruppe, die den Luminex-Test zum Nachweis von komplementfixierenden HLA-AK modifiziert hat, ist die Gruppe von Wahrmann und Böhmig. Dies ist die erste beschriebene Methode, die die Komplementbindung ohne Anwesenheit von Zellen detektiert [81]. Die Arbeitsgruppe entwickelte die Technik bei der Suche nach einer nicht-invasiven Methode zum Nachweis einer Rejektion, um eine Nieren-Biopsie zu vermeiden. Sie erkennen die Korrelation zwischen C4d-bindenden HLA-AK im Serum von Patienten und einer C4d-Ablagerung der Biopsie [82]. In anderen Studien wird gezeigt, dass die Anwesenheit von C4d-bindenden HLA-AK eine AMR (*Antibody-mediated-Rejection*) voraussagen kann [83]. Eine zweite Gruppe (Smith [62]), hat den Luminex-Test ebenfalls entsprechend modifiziert. Diese Modifikation wird bei der Testung von Patientenserum nach Herz-Transplantation verwendet. Smith verwendet ebenso die Detektion des C4d-Spaltprodukts nach Komplementaktivierung und findet eine Korrelation zwischen dem Nachweis von komplementbindenden HLA-AK und einem schlechteren Transplantatüberleben [84]. Die Arbeitsgruppe von Watanabe vergleicht den Nachweis von

4. Diskussion

verschiedenen Komplement-Komponenten (C3b, C4d, C1q, C5), gebunden an HLA-AK [85]. Es wurde dort gezeigt, dass die C3b-Komponente die stärkste Bindung an HLA-AK aufweist, gefolgt von C4b und C5. Die Bindung von C1q, C3d oder C5-9 war in dieser Studie hingegen schwach und sehr schlecht detektierbar. Hier muss erwähnt werden, dass Watanabe mit Zellen (*Durchflußzytometrie*) und nicht mit Beads gearbeitet hat. Aufgrund der Überlegung, dass die C3-Komponente auch durch Aktivierung der Komplementkaskade auf dem alternativen Weg (ab C3 und nicht nur AK- bedingt) erfolgen kann [70], haben wir uns entschieden, in unserem Labor die Modifikation zum Nachweis von C4d zu etablieren. Zu dieser Entscheidung hat aber an erster Stelle die Korrelation zwischen einer humoralen Abstoßung, C4d-positiven Biopsien und dem Nachweis von C4d-bindenden HLA-AK im Serum geführt.

Zu Beginn haben wir das Arbeitsprotokoll von Wahrmann und Böhmig mit dem anti-C4d-Detektionsantikörper DyLight™ 549 (Biozol) verwendet. Es wurden zwei verschiedene Chargen AK ausgetestet und mehrere Versuche durchgeführt. Die Austestungen mit diesen Reagenzien blieben aber ohne Erfolg. Daher wurden weitere anti-C4d-AK getestet (Fa.Serotec), die funktional sind und weiterhin eingesetzt werden. Jeder Schritt im Testprotokoll wurde ausgetestet und optimiert. Wir haben folgende Punkte bei dem Test zum Komplementnachweis als sehr wichtig identifiziert: optimale Temperatur [70], die für jeden Schritt ein anderes Optimum hat, verwendete Pufferlösungen zum Waschen der Platten und zum Verdünnen der Antikörper sowie der Umgang mit dem Komplement. Es ist auch zu vermerken, dass nur die Handmethode des Luminex zu verwenden ist, weil es bei der Filtermethode (Waschen durch Filtrieren) zu einer Komplementaktivierung kommen kann, wie auch bekannt ist, dass bei Dialyse-Patienten eine *in vivo*-Aktivierung von Komplement beobachtet wird [85].

Bei der Etablierung der C4d-Methode haben wir erkannt, dass unverdünntes FS als Komplementquelle nicht geeignet ist, weil es noch viele aktive Komplement-Inhibitoren enthält [32]. Aus diesem Grund wurde HC eingesetzt. Die Verdünnung von HC 1:21 in PBS wurde als optimal bestimmt. Weil der Waschpuffer die Reaktion auch teilweise inhibiert hat, kann diskutiert werden, ob bestimmte Proteine ebenso dazu beitragen, die Aktivierung zu blockieren. Der Versuch mit der Zugabe von FS, inaktiviertem FS und gelagertem NS, hat gezeigt, dass die stärkste Inhibierung bei FS passiert, was auf aktive Inhibitoren im FS hindeutet. Erstaunlich ist die Tatsache, dass die anderen Arbeitsgruppen von Wahrmann und

4. Diskussion

Smith, unverdünntes Serum verwendet haben [86]. Das im LCT verwendete Komplement aus Kaninchen, hat hier sehr schwache Reaktionen ergeben. Im LCT wird allerdings Kaninchen-Komplement eingesetzt, weil bereits in den 80er Jahren erkannt wurde, dass Zellyse (damals Erythrozytenlyse) beim Einsatz von heterologen spezieübergreifenden Komplementquellen erfolgt, und dass homologes Serum die Zellyse inhibiert [87-89]. Eine erstaunliche Beobachtung ist uns während der Validierung der C4d-Methode mittels PKS gelungen: Es ist in der Labormedizin weit verbreiteter Ansicht, dass Komplementkomponenten im Serum nur im frischen, nicht gelagerten Serum zu bestimmen sind [71]. In der vorliegenden Arbeit haben wir aber eine Restaktivität in gelagerten und mehrmals aufgetauten Seren gefunden. Die inhibitorische Wirkung von FS wurde bereits erwähnt. Hier ist es wichtig hervorzuheben, dass im PKS eine Komplementaktivierung und C4d-Bindung zu den plausiblen bekannten AK-Spezifitäten ohne Zusatz von externem Komplement erfolgt. Ein aktives Komplement in diesem *gepoolten* Serum, das aus 20 verschiedenen, seit Monaten bzw. Jahren gelagerten Patientenseren zusammengesetzt ist, haben wir nicht erwartet. Als zweite Möglichkeit, kann eine in vivo stattgefunden Komplementaktivierung mit in vivo-Bindung von C4d an den HLA-komplementbindenden AK diskutiert werden. Dafür haben wir die C3- und C4c-Konzentrationen im PKS gemessen, mit der Vermutung, dass eine Komplementaktivierung sich negativ auf die Konzentration der Komplementkomponenten auswirken kann. Die Werte dieser Komplementkomponenten waren aber im normalen Bereich. Unsere Komplementquelle (HC, FS) wurde ebenfalls gemessen. Es gab keine erhöhten Werte, was eine Vermutung auf passives Übertragen von C4d ausschließt. Unspezifisches Ablagern von C4d ist ausgeschlossen, weil alle positiven Reaktionen, bei der Austestung von PKS, plausibel und bekannt waren. Die Testung von 10 positiven Seren mit und ohne HC hat schwache spezifische Reaktionen im Ansatz ohne HC gezeigt, die auf eine Restaktivität von Komplement im gelagerten Serum zurückzuführen ist. Einige Forschungsgruppen bestätigen die de novo Bildung von C4d beim C4d-Luminex-Test [90]. Wir vertreten die Meinung, dass es aktive Komplementkomponenten im gelagerten Serum gibt, entgegen der verbreitete Meinung, und dass dieses Komplement bei stark aktivierenden HLA-AK (bzw. hochtitrigen AK) in der Lage ist, die Reaktion zu starten, ohne Zusatz von externem Komplement. Eine andere Erklärung dafür, könnte ein Prozone-Effekt sein, der bei hochtitrigen AK beobachtet wird (AK werden nach Verdünnen des Serums nachgewiesen) [75]. Im Gegenteil zu unseren Ergebnissen, werden die Reaktionen bei diesem Phänomen abgeschwächt, oder die AK gar

4. Diskussion

nicht detektiert. Forscher vermuten, dass es sich im Hintergrund um C1q-Bindung und Blockierung der Beads handelt, wobei C1q sich spezifisch an IgM bindet, proportional zu der IgM-Dichte auf der Bead-Oberfläche, die Bindung von C1q an IgG erfolgt nach Erreichen einer bestimmten Dichte. Dieses Phänomen wird durch Inaktivieren oder nach DTT-Behandlung der Seren inhibiert [75] und erklärt unsere Resultate nicht. Weitere Untersuchungen sollten diese unerwarteten Befunde weiter abklären.

4.1.1 Unterschiede des *in house* C4d-Luminex-Tests zu den bekannten Modifikationen

Wie in Kapitel 3.1. erwähnt wurde, unterscheidet sich unser C4d-Assay von dem Test bei Böhmic und Wahrman [91], vor allem durch den detektions AK. Die bei dieser Arbeitsgruppe verwendeten AK [70], haben bei uns nicht funktioniert, was uns auch von anderen Arbeitsgruppen (Schaub S.) persönlich mitgeteilt wurde. Wir haben schließlich einen monoklonalen Maus anti-human C4d-AK der Firma Serotec und einen sekundären Ziege-anti-Maus IgG-PE-AK der Firma Southern Biotech verwendet. Die Inkubationszeiten in unserem Assay wurden verkürzt. Die Inkubationen mit Komplement und mit anti-C4d-AK erfolgten für 30 statt 60 Min. Wir haben beobachtet, dass eine Inkubation mit dem Ziegen-anti-Maus IgG-PE-AK für 40 oder 60 Min niedrige MFI-Werte als diese für 20 Min liefert. Die längere Inkubation kann vermutlich zu unspezifische Bindungen führen, die das Signal stören, oder zu Beeinträchtigung der PE-Konjugate. Das Verkürzen der gesamten Testdauer ist ein wesentlicher Punkt für die Verwendung des Tests als Routine-Test. Zwei weitere wichtige Unterschiede sind die Inkubationstemperatur und die Waschprozeduren. Böhmic verwendet 4°C als Inkubationsoptimum für alle Arbeitsschritte [70]. Die Gruppe von Smith hatte keine Angaben. In unserer C4d-Modifikation hat dieses Protokoll nicht funktioniert. Es ist bekannt, dass kalte Lösungen zum Stoppen der Komplementreaktion verwendet werden [22]. Wir haben jeden Schritt bezüglich des Temperaturoptimums getestet. Es hat sich die RT für alle Arbeitsschritte, außer der Inkubation mit PE-konjugiertem AK, die bei 4°C abläuft, als optimal erwiesen. Laut Böhmic ist die optimale C4d und C1q-Bindung bei 4°C für 60 Min. Bei 37°C soll die Komplementaktivierung unabhängig von C4 und meist über den alternativen Weg verlaufen [70]. Das ganze Reaktionsoptimum beim Protokoll von Böhmic ist bei 4°C. Es wird ebenso mit kaltem PBS-Puffer gewaschen, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Unsere Austestungen zeigten eher schwache Reaktionen bei 4°C. Als

4. Diskussion

Waschpuffer und Verdünnungspuffer für Serum und Komplement haben wir PBS gewählt. Die Resultate zeigten 1,7-mal höhere MFI beim Waschen mit PBS als mit Luminex-WP. Ursache ist wahrscheinlich die Maskierung von AK-Komplement-Bindungsstellen durch unspezifische Proteine im WP oder komplementinhibierende Komponenten, die dort anwesend sind. Das könnten z.B. Bestandteile (oder Verunreinigungen) im BSA sein (hier 1,5% in Waschpuffer). Als Komplementquelle wird in unserer Modifikation 1:21 verdünntes HC verwendet, anders als bei den o.g. Arbeitsgruppen, die frisches Spenderserum verwenden. Durch die Verwendung von HC (käufliches Serumkomplement) wird die Aktivierung der Komplementkaskade standardisiert, welches ein wichtiger Vorteil für eine Routinemethode ist. Ein weiterer Unterschied ist das Verdünnen des Komplements 1:21 im PBS, anders bei Smith und Böhmig, wo unverdünntes Serumkomplement verwendet wird. Die Optimierung des Komplement-Schrittes unter Berücksichtigung der Komplement-Inhibitoren ist ein wesentlicher Punkt unserer Modifikation.

4.1.2 Bedeutung des „Cut-off“ Wertes beim C4d-Luminex-Test

Die Cut off- Problematik beim Luminex-Test ist weit bekannt [65]. Ein Konsensus ist bislang noch nicht erreicht. Für den Luminex-SA weiten sich die Cut off-Grenzen von 500 bis zum über 5000 MFI aus [55,73,74]. Diese Problematik ist auch im C4d-Luminex-Test aktuell. Die positiven Resultate im C4d-Test variieren zwischen 400 und 1800 MFI, selten über 2000 MFI. Bei den stärkeren Reaktionen mit MFI über 1000 Einheiten, gibt es keinen Zweifel, dass die AK als potenziell klinisch relevant einzustufen sind. Die Frage bleibt: Wo ist die Grenze stark/schwach komplementaktivierend? Daher muss beim Auswerten des Standard-Luminex-Tests, die Gesamtsituation, individuell beurteilt werden, in Beziehung zu immunisierenden Ereignissen, z.B. Transfusionen, Transplantationen oder Schwangerschaften und Therapien. Die Frage ist, ob diese individuelle Bewertung auch beim C4d-Test hilfreich ist, weil es sich um komplementaktivierende AK handelt. Die Fähigkeit Komplement zu aktivieren, kann von verschiedenen Faktoren beeinträchtigt werden: Titer der AK oder blockierende Proteine, die genau bei diesen „schwachen“ HLA-AK Einfluss haben. Es wurde berichtet, dass C4d-bindende AK eine wichtige Rolle bei AMR und Transplantantsüberleben spielen können [83]. 2010 wird dagegen dargestellt, dass die C4d-Bindung von *low-level* DRA vor TX, nicht immer mit dem Risiko korreliert, eine frühe AMR zu entwickeln [92]. Hier sind weitere

4. Diskussion

Studien notwendig, um die Korrelation zwischen den MFI-Werten der C4d-bindenden-AK und der Wahrscheinlichkeit, eine Rejektion zu entwickeln, zu klären. Nur so kann auch die Cut-off-Grenze beim C4d-Test definiert werden. Wir führen derzeit die Auswertung des C4d-Tests, zusammen mit den o.g. individuellen Informationen und der ermittelten Serumqualität durch. Beim jetzigen Stand, können wir uns vorstellen, den Test zur Risikodefinition insbesondere bei hochimmunisierten Patienten zu verwenden [93,94].

Eine andere Problematik ist, ob das Patientenserum zu verdünnen ist oder unverdünnt eingesetzt wird. In unserem Protokoll verwenden wir das zu untersuchende Serum unverdünnt. Es gibt Meinungen, dass das Serum verdünnt einzusetzen ist, wegen des eventuell vorhandenen „Prozone“-Phänomens in hochtitrigen Seren [95]. Einige Gruppen verwenden das Serum 1:10 verdünnt [62]. Wir haben gezeigt, dass die Nachweisgrenze bei unserem C4d-Test bei einer Verdünnung zwischen 1:6 und 1:8 liegt, und zwar bei PK2 und weiteren Seren von hochimmunisierten Patienten. Watanabe zeigt, dass die Komplementbindung an T-Zellen sehr schwach ist, sogar bei Verdünnung des Patientenserum von nur 1:2 [85]. Da stellt sich die Frage, ob wir nicht einige HLA-AK, die Komplement binden, übersehen, wenn wir das Serum verdünnt einsetzen. Eine Möglichkeit wäre, bei Patienten mit HLA-IgG-AK im Standard-Luminex-Test > 85% PRA und negativem C4d-Test, eine zweite Untersuchung im C4d-Test mit verdünntem Serum ansetzen, um ein eventuell vorhandenes Prozonen-Phänomen auszuschließen. Eine solche Titration kann bei Plasmapheresen als Aussage über die Effektivität des Vorgangs genutzt werden. In einer Studie von Tyan [96] wurde gezeigt, dass die Komplementbindung (C1q in diesem Beispiel) aussagekräftiger für die Effektivität der Plasmapherese bzw. Immunadsorption und ohne Probleme mit dem Background im Vergleich zum Monitoring mittels Standard-Luminex ist.

4.1.3 Background, DTT-Behandlung und Inaktivieren der Seren im C4d-Luminex-Test

Es ist bekannt, dass im Luminex-Standard-Test ein hoher Background vorliegen kann [97]. Dieses Problem erschwert die Auswertung, die in diesen Fällen oft nicht möglich ist und stellt die Laborärzte vor der Frage, wie man den Background neutralisieren kann, um einen validen Befund zu generieren. Wissenschaftler erklären diese unspezifische Bindung mit

4. Diskussion

blockierenden IgM-AK, die mit den Beads reagieren. Somit werden die Bindungsstellen für IgG-AK verdeckt. Zachary und Leffell [97] beschreiben, dass diese unspezifische Bindung unterschiedlich für Luminex Mix und SA ist und ebenso für SAI und SAII. Das haben wir bei der Verwendung des Routine-Luminex-Tests ebenso beobachtet. Es kann durch die unterschiedliche Beschichtung der Beads mit HLA-Ag und vielleicht, bei dem Unterschied im Background-Signal zwischen HLA-Klasse I und II, mit klassenspezifischen IgM Ak, erklärt werden. Die Vorgehensweise im HLA-Labor der Charité war immer, das Serum mit SA zu testen, wenn der Mix-Ansatz nicht auswertbar ist, oder LCT bzw. ELISA anzusetzen. Der Nachteil von LCT und ELISA ist die geringe Sensitivität [70] und damit das Risiko, AK-Spezifitäten zu übersehen, die möglicherweise relevant sind. Viele Seren haben einen bis zum 6000 MFI (NC) erhöhten Background auch im Luminex-SA. Das Problem besteht weiterhin in der Routine und führt oft zu erhöhten Testkosten durch die Verwendung von mehreren Methoden, und an erster Stelle bleibt die Frage der Kliniker offen, ob der Patient, der eine verschlechterte Nierenfunktion hat, neue HLA-AK (möglicherweise DRA) gebildet hat und bzw. eine Rejektion zu erwarten ist. Die C4d-Modifikation des Luminex-Tests hat den Vorteil, dass es keinen erhöhten Background gibt. Wir haben mehr als 260 Seren untersucht sowie zusätzlich 10, die einen sehr hohen NC-Wert aufweisen. All diese Seren konnten mit dem C4d-Luminex-Test ausgewertet werden, ohne zusätzliche Methoden und Ansätze zu benötigen.

Viele Labore, die im Assay einen hohen „Background“ haben, versuchen die unspezifischen Bindungen durch eine Behandlung mit DTT zu lösen [98]. DTT wurde in den 70er Jahre für die AK-Diagnostik eingeführt und erstmals in der Erythrozyten-Serologie zum Differenzieren zwischen IgM und IgG-AK verwendet. Es ist bekannt, dass DTT eine stärkere Wirkung bei IgM (Zerstörung der Disulfidbrücken) als bei IgG aufweist [77]. Das Maximum des Effekts entfaltet sich in Konzentrationen zwischen 2,5 und 5mM bei 37°C. Routinemäßig wird die DTT-Behandlung beim LCT und bei den Kreuztesten zwischen Spender und Empfänger vor Organ-Tx verwendet, mit dem Hintergrund, non HLA-IgM-AK zu zerstören und nur die wichtigen IgG-AK zu berücksichtigen [99]. Einige Autoren, wie Kosmopoliaptsis, empfehlen das Verwenden von Luminex mit und ohne DTT-Behandlung der Seren [98], weil nach DTT-Behandlung eine stärkere Bindung der HLA-AK zu den Luminex-Beads erfolgt, wenn in diesem Serum maskierende IgM-AK vorhanden sind. Es gibt aber auch Berichte darüber, dass

4. Diskussion

DTT die HLA-AK Spezifitäten sehr stark verändert [97]. Als Vorschlag zur Reduktion des Background-Signals empfehlen die Autoren das Verwenden von HD (*hypotonic dialysis*), bei der fast keine Spezifitäten-Änderung erfolgt [97]. Um die Klassenzugehörigkeit der HLA-AK, die im C4d-Test detektiert werden, zu prüfen, haben wir einige Versuche mit DTT-Behandlung der Seren durchgeführt. Die Ergebnisse (Punkt 3.2.1) zeigten, dass nach DTT-Behandlung einige C4d-bindende HLA-AK nicht mehr nachweisbar waren und andererseits einige neue Spezifitäten zusätzlich detektiert wurden. Die zusätzlichen C4d-bindenden HLA-AK könnten durch das Beseitigen von blockierenden Proteinen der Ag-AK-Bindungsstellen erklärt werden. Das Reduzieren der Spezifitäten im C4d-Test nach DTT-Vorbehandlung der Seren, kann als IgM-Zugehörigkeit der AK gesehen werden, oder als Zerstören von schwachen IgG AK. Interessant bei den Beispielen, war die Tatsache, dass alle C4d-bindenden DRA auch nach DTT-Behandlung Komplement aktivieren konnten. Das unterstützt unsere Hypothese, dass die restlichen C4d-bindenden HLA-AK, die nach DTT nicht mehr nachweisbar sind, eventuell schwache, niedrigtitrige und nicht gegen das Transplantat gerichtete AK sind. Diese „schwachen“ AK haben die Fähigkeit Komplement zu aktivieren und sollten auch als potenziell gefährlich angesehen werden. Dann bleibt die Frage, ob die weitverbreitete Vorgehensweise bei LCT, mit Auswertung nach DTT-Behandlung, alle wichtigen, relevanten und zytotoxischen HLA-AK erfasst. Das Verwenden von DTT scheint möglicherweise eine zu grobe Technik zur Background-Reduktion zu sein. Wir würden den C4d-Test ohne Vorbehandlung der Seren empfehlen. Die neuen Spezifitäten, die wir nach DTT-Behandlung im C4d-Test gefunden haben, könnte durch das Zerstören von blockierenden IgM-AK erklärt werden.

Einen anderen Vorteil des C4d-Tests im Vergleich zum LCT haben wir bei Patienten nach Rituximab-Behandlung gesehen. Nach dieser B-Zell-zerstörenden Therapie ist die Auswertung von LCT oder Kreuztesten unmöglich, da es zu falsch positiven Ergebnissen kommt [70], bedingt durch das Verwenden von vitalen Lymphozyten in dem Test. Da im C4d-Test Ag-beschichtete Beads verwendet werden und die Komplementaktivierung erst in einem nächsten Schritt nach Auswaschen des Patientenserums geschieht, kann es zu keiner Beeinträchtigung der Ag-AK-Reaktion und an zweiter Stelle der Komplementaktivierung kommen. Hier stellt sich die Frage, ob die C1q-Methode zum Nachweis komplementbindender HLA-AK im Luminex, mit DTT durchgeführt werden kann, weil die

4. Diskussion

Ag-AK-Reaktion und die C1q-Bindung im demselben Schritt verlaufen. Zusammengefasst kann man sagen, dass der C4d-Test ein in der Routine dringend benötigter Test ist, der zu einer schnellen Antwort auf die Frage führt, ob es zytotoxische HLA-AK gibt oder nicht, ohne zusätzliche Kosten, ohne Background im Test und ohne Einfluss auf die Vitalität der Lymphozyten im Serum zu haben. Weil es im C4d-Test um Aktivierung der Komplementkaskade geht, könnte eine eventuell vorhandene Komplement-Restaktivität im untersuchenden Serum ebenso als „Background“ bezeichnet werden. Wie im Punkt 3.2.1 beschrieben, haben wir eine solche Aktivität detektiert. Um die restliche Komplementaktivität im Serum von Patienten zu neutralisieren, werden alle Patientenproben und Kontrollen bei 56°C für 30 Min inaktiviert, was auch bei anderen Arbeitsgruppen die Vorgehensweise ist [85]. Die Hitzeinaktivierung ist die gebräuchlichste Methode zur Inaktivierung der Komplementbindungskapazität und der enzymatischen Aktivität im Serum. Bei der Optimierung dieses Schrittes wurde beobachtet, dass die Signale nach 30 Min Inaktivierung schwächer sind als die der unbehandelten Seren. Das kann bedeuten, dass die restliche enzymatische Aktivität im Serum, die zu einer Ag-AK unabhängigen Aktivierung des Komplements und eine Bindung von C4d an Ag-AK Komplexe führen kann, neutralisiert wurde. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass eine solche Aktivierung der Kaskade von den HLA-AK ausgeht und die Komplementbindungskapazität dieser HLA-AK durch Konformationsänderungen abgeschwächt wurde. Das wurde in Testseren mit „Verschwinden“ einiger HLA-AK-Spezifitäten nach Inaktivieren beobachtet. Diese Hypothese bestätigt sich bei der Inaktivierung für vier Stunden, wo die MFI-Werte im C4d-Test um das Fünffache gesunken sind. Welche Klassenzugehörigkeit diese AK haben, ist nicht klar. Bekannt ist aber, dass bei einer solchen Behandlung humane Ig der Klasse IgE denaturiert werden. Somit empfehlen wir eine genaue Einhaltung der Inkubationszeiten, um keine falsch-negativen Ergebnisse zu bekommen. Andererseits haben wir gesehen, dass es Seren gibt, bei denen DRA komplementbindende HLA-AK erst nach Inaktivieren des Serums detektiert wurden, was mit Zerstören von inhibierenden Proteinen (möglicherweise auch spezifischen HLA-IgM AK) zu erklären ist [75]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Hitzeinaktivierung der Patientenseren ein sehr wichtiger Schritt zur Standardisierung der C4d-Methode ist, aber es bleibt die Frage, ob diese AK, die wir nach der Behandlung nicht mehr detektiert haben, eine Relevanz haben. Das ist ein Thema weiteren Studien.

4.1.4 Klassenzugehörigkeit der komplementbindenden HLA-AK im C4dLuminex-Test

Die Immunoglobulin-Klassen der HLA-AK, bezüglich der klinischen Relevanz, stehen oft im Vordergrund der Diskussion. Die Standard-Methode LCT detektiert zytotoxische HLA. Nach DTT-Behandlung bleiben nur die IgG-AK. Der Luminex-Standard-Test ist für den Nachweis von IgG-AK geeignet, ohne die Möglichkeit zwischen komplementbindenden und nicht komplementbindenden AK zu unterscheiden. Die relevanten HLA-AK, verbunden mit akuter AMR, sind die zytotoxischen AK [10]. Um die Relevanz der Luminex-IgG-AK zu prüfen, haben wir den C4d-Test etabliert. Es bleibt die Frage, welche Klassenzugehörigkeit die im C4d-Test nachgewiesenen HLA-AK haben. Die Detektions-AK in unserem Test können nur das C4d-Fragment detektieren. Zweit-AK zur Detektion der Ig-Klassen, der vorhandenen HLA-AK haben wir nicht eingesetzt. Diese Frage führt über diese Arbeit hinaus und ist Anliegen weiterer Studien. Wie im Ergebnissteil beschrieben, haben wir die Plausibilität der HLA-AK-Spezifitäten durch den Vergleich zwischen den detektierten Spezifitäten im C4d-Test und dem Luminex-Standard-Test geprüft. Die Übereinstimmung in den HLA-Spezifitäten kann als indirekter Hinweis benutzt werden, dass die C4d-bindenden AK zu der IgG-Klasse gehören. Es wurden aber auch Seren gefunden, bei denen durch den C4d-Test neue AK detektiert wurden, die im Standard Luminex nicht ermittelt wurden. Solche C4d-bindenden, aber im IgG-Luminex nicht zu detektierende HLA-AK, wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [91]. Diese HLA-AK könnten zur IgG- oder IgM-Klasse gehören, oder ein Gemisch davon sein. Grund für das Fehlen der AK im sensitiven Standard-Luminex könnten falsch positive Reaktionen, IgM-Zugehörigkeit oder niedrigtitrige IgG-AK sein, die im Luminex IgG-Test nicht erfasst wurden. Bestimmte Seren wurden nach DTT-Behandlung untersucht, mit dem Ergebnis, dass einige C4d-bindende-Spezifitäten (meist nicht durch TX erklärbar) nicht mehr nachzuweisen waren. Damit würde sich wieder die Frage stellen, ob diese AK schwache DTT-sensitive IgG-AK oder IgM-non HLA-AK sind. Dies kann mit den vorliegenden Untersuchungen in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Wenn angenommen wird, dass die meisten C4d-bindenden AK zu der IgG-Klasse gehören, und einige wenige zu IgM, muss die Relevanz der AK diskutiert werden. Es ist bekannt, dass IgG1 und IgG3 AK stärker Komplement aktivieren als IgG2 und IgG4, die zu einer

4. Diskussion

ineffektiven Aktivierung führen [23]. Die IgG3 AK haben ca. doppelt so viel C1q-Bindungsstellen als IgG1 [22], verursachen aber eine stärkere Aktivierung der Komplementkaskade [100]. Die Arbeitsgruppe von Böhmig berichtet, dass die meisten detektierten HLA-AK bei Rejektion nach Nieren-TX zu der IgG1 Klasse gehören. HLA-IgA AK korrelieren mit einer besseren Transplantatfunktion, weniger Rejektionen, was mit dem Blockieren von schädlichen IgG-AK erklärt werden kann [83]. Die Forscher beobachteten, dass HLA-AK, die zur IgM-Klasse gehören, mit weniger Risiko für Rejektion verbunden sind. Als Beispiel dienen viele Nieren-TX mit guter Transplantat-Funktion, bei denen die Patienten positiv für IgM-AK sind. Es wurden Studien zur Bewertung der Langzeit-Funktion der Transplantate nach Nieren-TX durchgeführt, in denen Patienten mit zytotoxischen IgM-AK und ein Beobachtungszeit von über drei Jahren nach TX, eingeschlossen wurden. Es gab keine Korrelation zwischen den IgM-AK und dem Langzeit-Überleben [99]. Andere Forschungsgruppen berichten, dass das Detektieren von donorreaktiven IgM-AK nicht mit einem erhöhten Serum-Kreatinin oder mit erhöhter Rejektionsrate korreliert [101]. Einige Autoren erklären die Relevanz der IgG-AK mit einer T-Zell-Aktivierung gegen HLA-Ag. Sie haben eine Korrelation zwischen den HLA-IgG-Ak und T-Zell-Aktivierung gegen identischen HLA-Spezifitäten gefunden und keine Korrelation zwischen IgM-AK und T-Zell-Aktivierung [21]. Um die Rolle der IgM-AK zu klären, haben andere Gruppen den Klassenwechsel von IgM zu IgG bei Patienten nach Herz-TX studiert [102]. Es wurde berichtet, dass neu gebildete IgM-AK oft zu IgG AK wechseln (Beobachtung für Klasse II HLA-AK) und dass dies mit einem erhöhten Rejektionsrisiko verbunden ist. Wenn kein Klassenwechsel beobachtet wurde, haben die IgM-AK sogar eine protektive Rolle. Diese Immunmechanismen entstehen durch eine T-Zell-Aktivierungen, ausgelöst meist durch Interleukin 4 (IL-4). Bekannt ist, dass IL-4 die Produktion von IgM und IgG3 inhibiert und die von IgG1 aktiviert [24]. Interferon Gamma (INF- γ) inhibiert die IgM- und IgG1-Produktion und aktiviert die von IgG3. Diese Mechanismen können eine Rolle bei einem eventuellen Klassenwechsel von IgM zu IgG spielen. Deswegen kann man schlussfolgern, dass IgM-AK ebenso eine Relevanz haben könnten (besonders DRA) [65] und eine Unterdifferenzierung der C4d-bindenden AK in IgG und IgM nicht nötig wäre. Dafür sind allerdings weitere Studien notwendig. Es ist bekannt, dass MMF ein Medikament ist, das den Klassenwechsel von IgM zu IgG durch Unterdrücken der T-Zell-Aktivierung verhindert, im Gegensatz zu Azathioprin [102] und mit diesem Ziel eingesetzt wird. Die weit verbreitete Meinung ist, dass die IgM-AK meist Auto-AK und nicht

4. Diskussion

schädlich sind, sowie, dass ein positiver Kreuztest wegen IgM-AK keine Kontraindikation zur TX ist. Wiederum wurde bei Herz-Transplantationen belegt, dass IgM-Ak ein Prädikat für Rejektion sind. Es wurde eine klare Korrelation zwischen DRA IgM-AK und TCAD (*Transplant related coronary disease*) $p < 0,00001$ gefunden. [103]. Eine andere Publikation hat einen Fall nach Nieren-TX beschrieben, wo es IgM-AK mit hohem Titer und durch positiven LCT detektiert wurden. Drei Monate nach TX hat eine Rejektion stattgefunden, mit einem hohen Anteil von IgM- und C4d-''Deposits'' bei der Nieren-Biopsie (positives C4d-Signal bei Färbung nach einer Biopsie) [104]. Aufgrund dieser Beispiele und Überlegungen sind wir zur folgenden Schlussfolgerung über die Relevanz der C4d-bindenden AK gekommen: Wir vermuten, dass unabhängig von der Ig-Klasse, die im C4d-Luminex detektierten HLA-AK relevant sind und berücksichtigt werden müssen.

Eine andere Gruppe C4d-bindender HLA-AK ist die Gruppe der natürlichen AK. Es wurden solche sogenannten „*natural*“ AK beschrieben, detektiert durch Standard-Luminex-Test [105]. Diese AK sind bei Patienten ohne vorherige Transplantationen, Transfusionen oder Schwangerschaften gefunden worden. Die Erklärung dafür sind möglicherweise Kreuzreaktionen zwischen HLA-AK und Antigenen von bakteriellen Proteinen wie E. Coli oder S.aureus. Es wurden bestimmte AK-Spezifitäten gefunden, die, wenn anders nicht erklärbar, als natürliche AK gerechnet werden können, wie z.B. A*30:02, B76, Cw*17:01. Es wird vermutet, dass solche AK nach IVIg-Gabe vermehrt produziert werden und den Klassen IgM und IgA angehören [106]. Vermutlich dienen die natürlichen AK der Homöostase, zum Entfernen von nicht funktionierenden Plasmaproteinen und werden bei Bedingungen wie Hypoxie und Ischämie gebildet [107]. Somit könnte die Bildung von natürlichen HLA-AK erklärt und darauf hingewiesen werden, dass einige auch Komplement aktivieren und durch den C4d-Test nachgewiesen werden. Die Frage ist, ob diese C4d-bindenden natürlichen AK eine Relevanz für die AMR haben und dem Transplantat eine Schädigung zuführen können. Bei der Auswertung der AK-Spezifitäten im C4d-SA sind solche nicht plausiblen (nicht durch TX erklärbare) Muster von AK aufgefallen. An erster Stelle ist die Kombination B37, B75, B63. Dieses Muster wurde 16 Mal bei Klasse I positiven Seren ohne Erklärung durch vorangegangene Immunisierungsereignisse gefunden. Die AK waren keine DRA zur TX, aber auch keine kreuzreagierenden AK. Eine mögliche Erklärung ist, dass diese AK durch Transfusionen oder Schwangerschaften erworben sind. Die zweite Möglichkeit ist, dass diese

4. Diskussion

AK zu diesen natürlichen HLA-AK gehören. Diese kreuzreagierenden AK werden im Laufe des Lebens durch Kontakt mit verschiedenen Mikroorganismen, die HLA-ähnliche Epitope aufweisen, gebildet. Dabei erfolgt eine Immunisierung gegen HLA-ähnliche Strukturen mit der Folge des Nachweises von HLA-AK, die möglicherweise auch die richtigen HLA-Ag attackieren können. HLA-B37 und B75 wurden als solche von Morales-Buenrostro beschrieben [105]. Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass mit dem C4d-SA-Test auch HLA-AK gegen bestimmte Allele detektiert werden. Einige Allel-spezifische AK waren DRA. Es wurden drei allelspezifische Spezifitäten beobachtet, die durch uns bekannte Informationen nicht zu erklären waren: Diese HLA-AK sind gegen A*11:02, A*66:02 und B*13:02 gerichtet. AK gegen A*11:02 wurde 13 Mal detektiert, aber nur einmal als DRA. Der AK ist auch als natürlicher AK bekannt. AK gegen A*66:02 wurden neun Mal beobachtet und gegen B*13:02 vier Mal. Diese HLA-AK könnten eventuell gegen natürliche HLA-ähnliche Ag gerichtet sein (wie für A*66:02 beschrieben). Das interessante dabei ist die zytotoxische Aktivität und es stellt sich die Frage, ob diese natürliche HLA-AK direkt oder durch Kreuzreaktionen Transplantatschäden verursachen können. Zu bemerken hier ist, dass diese s.g. „natürliche AK“, die eventuell auch non-HLA sein können, in unserer Studie nur zur HLA-Klasse I gehörten und keine solche bei HLA Klasse II gefunden wurden.

4.2 C4d-Luminex-Test versus Standard-Methoden, Relevanz der HLA-AK

Ein Ziel dieser Arbeit war der Vergleich zwischen dem neu eingeführten C4d-Luminex-Test und dem gut etablierten LCT. Wie in der Einleitung schon erwähnt (Punkt 1.5) hat der LCT mehrere Schwachpunkte **1)** die niedrige Sensitivität aufgrund der Verwendung einer begrenzter Zahl an Panelzellen, **2)** Schwierigkeiten beim Unterscheiden von Klasse I und II AK ohne Adsorption auf Thrombozyten, **3)** technische Probleme mit den B-Zellen, die sehr empfindlich sind und oft falsch positiv [78], **4)** die Unfähigkeit sehr schwache, niedrigtitrige HLA-AK zu detektieren [108], [70]. Es ist auch bekannt, dass die Reaktionen im LCT falsch positiv sein können [81], aufgrund von AK, die nicht gegen HLA-Ag auf den Lymphozyten, sondern gegen andere polymorphe Moleküle gerichtet sind [62]. Vorteil von der Standard LCT Methode ist der hohe positive prädiktive Wert für eine akute AMR [10,62,109] . Wie im Ergebnisteil beschrieben (Kapitel 3.2.3.), hat der C4d-Test 21% mehr komplementaktivierende HLA-AK als der LCT detektiert (Tabelle 19 A, B). Dieser Anteil bezieht sich auf die Gruppe von immunisierten, im Standard-Luminex als positiv getesteten

4. Diskussion

Seren. Eine Überlegung ist, dass die zusätzlich detektierten HLA-AK zur der IgM-Klasse gehören können und deshalb im Standard Luminex unerkannt bleiben. Im LCT nach DTT-Behandlung werden ebenfalls nur IgG-AK nachgewiesen. Die Relevanz der IgM-AK wurde in Kapitel 4.1.4. weitergehend diskutiert. Außerdem haben wir einige Seren im C4d-Test nach DTT-Behandlung angesetzt und gesehen, dass nur einige wenige Spezifitäten nicht mehr detektierbar sind, was dafür spricht, dass die C4d-AK in der Mehrzahl zu der IgG-Klasse gehören. Diese Differenzierung bedarf aber weiterer Studien. Die zweite Überlegung für die ungenügende Sensitivität der LCT-Methode ist die Möglichkeit, dass die vorhandenen komplementbindenden HLA-AK sehr schwach sind und ihr Titer nicht ausreichend ist, um zur Zellyse zu führen [108]. Rose und Smith berichten, dass die Bindung von Komplementkomponenten allein, ohne die Bildung von dem terminalen lytischen Komplex, genügt, um das Transplantat zu beschädigen [84]. Watanabe beschreibt auch, dass solche sublytischen AK eine hyperakute Rejektion verursachen können [85]. Die Autoren schreiben, dass die Fähigkeit der HLA-AK, C4d zu binden besser mit einem schlechten Transplantatüberleben korreliert als die Höhe der MFI. Das ist wieder ein Hinweis über die große Relevanz von C4d-bindenden AK, ohne ihre Fähigkeit zu betrachten, zur Zellyse zu führen. Außerdem gibt es oft falsch positive Reaktionen im LCT, weil die B-Zellen sehr sensitiv sind und der Prozentsatz an toten Zellen bei der technischen Bearbeitung hoch sein kann [78]. Außerdem kann die im LCT in vitro erfolgte Zellyse, eventuell eine fragliche Relevanz in vivo haben [62].

Die Beobachtung, dass mit dem C4d-Test mehr komplementbindende HLA-AK als im LCT detektiert werden, haben wir in jeder Gruppe von Patientenseren (N/N, N/P, P/N, P/P) gemacht. Nicht erwartet hatten wir C4d-bindende AK in der N/N Gruppe. Andere Forscher, die mit C4d-Modifikationen gearbeitet haben, konnten ebenso einige C4d positive IgG negative (im Standard Luminex negative) HLA-AK finden [82,91]. Außer den o.g. Gründen, könnte noch ein weiterer Faktor eine Rolle spielen. Die N/N Gruppe wurde nach negativer Austestung mittels LCT und dem Luminex Mix Test definiert. Wir haben beobachtet, dass letzterer nicht immer vertrauenswürdig ist, und zwar sowohl im Standard Luminex als auch in der Modifikation des C4d-Tests. Hier gab es insgesamt 4 Seren, die im Mix bestätigt negativ waren und im SAI positiv getestet wurden (Tabelle 19A, B). Der Luminex Mix-Test ist ebenso falsch negativ ausgefallen bei einigen Untersuchungen mittels Standard Luminex.

4. Diskussion

Dies stellt ein großes Problem beim HLA-AK Screening dar, weil routinemäßig die Patienten zunächst mit den Luminex Mix getestet werden und nur beim positiven Mix-Test die weiteren Spezifizierungen mittels SAI/II angesetzt werden. Somit wird der weit verbreitete Screeningstest, unter der Verwendung von Luminex-Mix-Beads, in Frage gestellt. Als Grund dafür kann die unterschiedliche Zusammensetzung der Beadpopulationen angenommen werden [110]. Die Mix-Beads werden mit jeweils zwei HLA-A, B, Cw und Bw-Ag für Klasse I beschichtet, ähnlich wie bei menschlichen Zellen. Damit wird eine kleinere Ag-Dichte an der Oberfläche erreicht und es ist wahrscheinlich vom AK-Titer abhängig, ob einige AK zu den zugehörigen Ag binden oder nicht. Dieser Nachteil – die niedrige Spezifität des Screening Mix-Test erwähnen auch andere Anwender [111]. Wir haben einige Beispiele gefunden, wo es zu sehen war, dass nur mit Hilfe des C4d-Luminex-Tests anwesende DRA detektiert wurden. Bei manchen Seren waren die AK nachweisbar, allerdings nur nach zusätzlicher Austestung mit dem Luminex SA Test. Abbildung 16 zeigt noch ein Beispiel dafür.

4. Diskussion

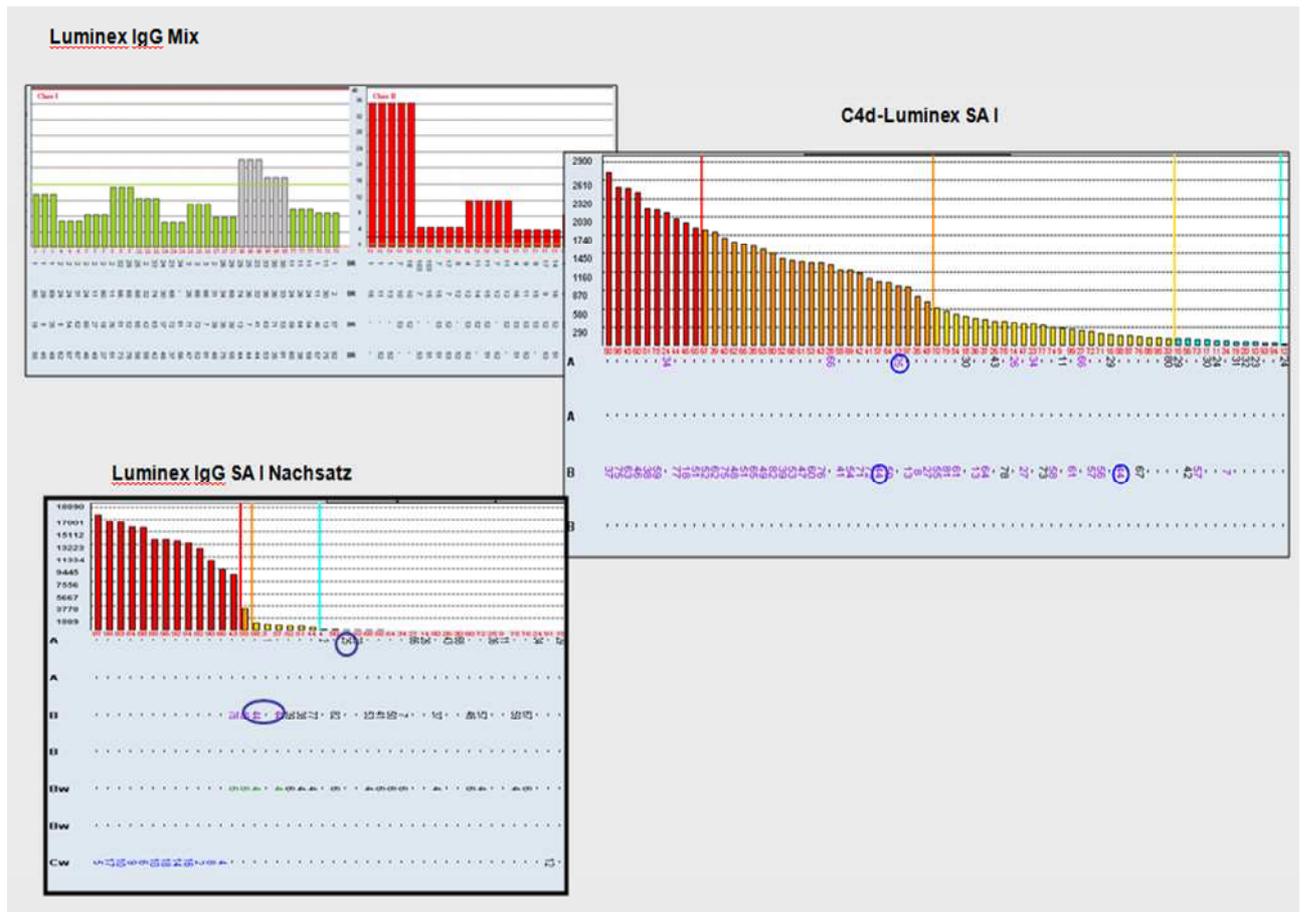


Abbildung16: Testung von einem Serum (einmalige Blutabnahme) mit drei verschiedenen Methoden: Luminex Mix und SA I mit IgG-AK Nachweis, und C4d-Luminex mit dem Nachweis zytotoxischer HLA-AK. Blau markiert sind die DRA im C4d-Luminex und IgG-Luminex (B44 und A25).

Erstmals wurde im Labor die Screeningmethode Luminex Mix angesetzt, mit der Aussage Klasse I HLA-AK negativ (Ergebnisse in Graubereich, eher negativ: s. Abbildung oben links). In unserer Arbeit wurde dieses Serum mittels C4d-Luminex Mix und SA getestet. Beide Tests haben positive Resultate gezeigt (Abb. 16 zeigt SA I). Wegen vorhandenen komplementaktivierenden DRA im C4d-Luminex, wurde nachfolgend der Luminex SA I Standard-Test angesetzt mit dem überraschenden Ergebnis, dass hier ebenso starke HLA IgG AK Klasse I nachweisbar sind. Es sind zwei Besonderheiten zu bemerken: 1. Der Screeningstest Luminex Mix mangelt an Sensitivität. Die HLA IgG AK, nachgewiesen im SA I sind mit sehr hohen MFI (bis 17 000 MFI) und 2. Die DRA AK sind schwach (B44) oder gar nicht nachweisbar (A25) im Luminex Standard Test. Hier kann man erneut die Frage

4. Diskussion

stellen, warum stark zytotoxische AK niedrige MFI (IgG Subklasse) haben. Die Zusammenhänge zwischen MFI, Titer und Komplementbindung sollten in weiteren Studien untersucht werden. Eine Austestung der Seren aller Patienten auf der Warteliste (n=1540 für Berlin, n= 8000 für Deutschland) mittels Luminex SA ist sehr kostenintensiv. Wir würden deswegen bei grenzwertigen Ergebnissen (Grauzone) im Luminex Standard oder C4d-Test mit den Mix-Beads, eine weiterführende Diagnostik mit SA-Beads empfehlen, um falsch negative Resultate zu vermeiden und somit die Patienten nicht zu gefährden.

Unter den zusätzlich zum LCT detektierten C4d-bindenden HLA-AK waren sehr viele DRA, was die Relevanz dieser AK beweist. Viele davon waren neu gefundene AK, auch im Vergleich zum Luminex Standard Test. Wie im Ergebnisteil berichtet wurde (Kapitel 3.2.3), haben wir in jeder Gruppe von Patientenseren DRA gefunden, neu davon waren in 20 von 69 Seren in der P/P Gruppe, in 5 von 67 in der P/N Gruppe, in 8 Seren von 63 in der N/P Gruppe und in 2 von 62 Seren in der N/N Gruppe. In der P/P Gruppe sind die DRA 29% von allen C4d-bindenden HLA-AK in dieser Gruppe. Verglichen mit dem LCT wird noch mal deutlich, dass der C4d-Test sensitiver und sicherer ist als der LCT: Es werden existierende relevante, komplementaktivierende DRA durch das alleinige Verwenden des LCT übersehen. Diese Kenntnisse zeigen noch dringlicher die Notwendigkeit, den C4d-Test als Routine-Test einzuführen, um hier größere Sicherheit zu gewinnen. Wahrmann findet, dass C4d-bindende HLA-AK, ohne Unterschied ob sie DRA oder non-DRA sind, mit einem schlechteren 5-Jahres Transplantat-Überleben korrelieren. Andererseits beschreibt er, dass die DRA HLA-AK bereits an sich, egal ob sie C4d binden oder nicht, mit einem erhöhten Risiko für AMR und einem schlechteren Transplantatüberleben assoziiert sind [91]. In anderen Studien berichtet diese Arbeitsgruppe wieder, dass die Trennung der IgG-AK in C4d-bindende und C4d nicht-bindende, ein Hinweis für eventuelle Rejektion sein kann [81]. Ebenso findet Rose eine Korrelation zwischen relevanten (DRA) komplementbindenden HLA-AK und Transplantatüberleben nach Herz-TX [84]. Claas berichtet, dass die DRA HLA-AK, die nach TX detektiert werden, mit einer Chronischen Rejektion assoziiert sind [56] und dass es auch viele Rejektionen mit C4d-positiven Biopsien gibt, wo keine zirkulierenden DRA HLA-AK gefunden worden sind. Das erklärt man mit der Adsorption dieser DRA an das Transplantat. Die Arbeitsgruppe von Terasaki konnte zeigen, dass diese AK sicher eine Transplantat-Schädigung verursachen, aber dass dies eine gewisse Zeit braucht [112]. Die Rolle der C4d-

4. Diskussion

bindenden HLA-AK sowie die der DRA-AK werden kontrovers diskutiert. Die Möglichkeit, komplementbindende DRA sehr sensitiv zu detektieren, würde uns zu einer Definition der sicher TX-relevanten IgG-AK näherbringen. Wir haben beschrieben, dass mittels C4d-Test de novo HLA-AK nach TX detektiert wurden, die im Luminex IgG-Test nicht bekannt waren. Stegall beschreibt 2010, dass de novo detektierte zytotoxische AK nach TX ein prädiktiver Faktor für ein Transplantatverlust sind [113]. Ähnliche Beobachtung macht die Arbeitsgruppe von Moise [53,54]. Die Tatsache, dass einige C4d-bindende Spezifitäten nicht im IgG-Luminex detektiert wurden, kann mit einem niedrigen Titer der HLA-AK erklärt werden, oder einer anderen Klassenzugehörigkeit. Honger und andere Forscher wiederum berichten, dass niedrigtitrige DRA, die C4d binden, nicht immer relevant sind und nicht prädiktiv für eine frühe AMR oder peritubuläre C4d-Ablagerung [92,114]. Bartel ruft zu einer vorsichtigen Interpretation der Ergebnisse beim HLA-AK Monitoring bei Patienten mit normaler Transplantatfunktion auf, weil er keine Assoziation zwischen C4d-bindenden AK und einer Verschlechterung der GFR und Proteinurie bei Patienten mit guter Funktion nach 1-Jahr, gefunden hat [115]. Diese kontroverse Diskussionen und Studienergebnisse müssen weitergeführt werden, bis sich eine klare Definition findet, welche HLA-AK relevant sind und wann. Dafür sind weitere Studien mit einer größeren Zahl Patienten nach Transplantation geplant.

Besonders problematisch ist der LCT-Test beim Detektieren von HLA-AK Klasse II in Gegenwart von vorhandenen Klasse I AK. Der Hinweis, dass bei dem jeweiligen Patienten komplementbindende AK Klasse II vorhanden sind, spielt eine große Rolle bei der Steuerung der immunsuppressiven Therapie. Wir haben berichtet, dass die meisten neuen DRA, die C4d binden, in den Gruppen mit Klasse II positiven Patienten zu finden waren: den N/P- und P/P-Gruppen. Eine andere Beobachtung haben wir gemacht, als wir diese HLA-Klasse II AK mit C4d-Luminex und anhand von klinischen Daten analysiert haben. Wir konnten sehen, dass es keine unklaren Reaktionen unter den Klasse II AK gibt. Alle Spezifitäten konnten durch Transplantationen und kreuzreagierende AK erklärt werden. DRA waren auch nach Behandlung mit DTT detektierbar, was noch einmal die Relevanz dieser Klasse II AK zeigt und die Notwendigkeit eine sensitivere Methode wie den C4d-Test in der Routine zu verwenden. Die Relevanz von Klasse II AK wird ebenso kontrovers diskutiert. Wahrmann berichtet, dass nur Patienten, die HLA-Klasse I komplementbindende AK haben, ein

4. Diskussion

schlechteres Transplantatüberleben aufweisen. Das wurde bei Klasse II AK in dieser Studie nicht beobachtet [81]. Opelz und Süsal beobachteten 5949 Patienten nach Nieren-TX mit der Erkenntnis, dass bei Patienten mit isolierten HLA-Klasse II AK (IgG) kein signifikant schlechteres Transplantatüberleben beobachtet wurde. Ganz im Gegenteil zu Patienten mit Klasse I+II IgG-AK, bei denen sich die Transplantatfunktion noch in der ersten 6 Monaten nach TX verschlechtert hat [116]. Eine parallele Beobachtung nach Herz-TX macht die Gruppe von Lietz [102]: Sie beobachten, dass ein *de novo* B-Zell Klassenwechsel von IgM auf IgG bei HLA-AK Klasse II, mit einer frühen und oft sehr schweren zellulären Rejektion assoziiert ist, sowie mit einem schlechteren Transplantatüberleben. Das wurde für Klasse I AK nicht gefunden. Einen besonderen Fall wurde in der Tabelle 22 abgebildet. Es handelt sich um die vergleichende Untersuchung von Seren eines Patienten im Verlauf, sowohl mittels C4d-Test, Luminex Standard Testals auch im LCT. Durch den C4d-Luminex-Test konnten wir die immunologischen Mechanismen während einer Rejektion näher beobachten. Wir fanden in einem der Seren (#204), wo der Verdacht auf Rejektion von den Klinikern geäußert wurde, dass plötzlich die C4d-bindenden HLA-AK Klasse I nicht mehr nachweisbar waren. Andererseits konnten wir *de novo*-Bildung von DRA komplementbindender AK Klasse II nachweisen. Dies wurde in zwei verschiedenen Seren und bei Wiederholung der Testansätze bestätigt. Gleichzeitig wurden mehr IgG Klasse I AK im Standard Luminex nachgewiesen und *de novo* Klasse II AK. Hier könnte diskutiert werden ob die *de novo* Bildung von Klasse II AK (die auch zytotoxisch sind) die Hauptrolle beim Rejektionsereignis gespielt hat, oder das Adsorbieren der Klasse I AK auf dem Organ. Wir vermuten, dass bei dieser Rejektion, die fehlenden C4d-positiven Klasse I AK, die vermutlich das Organ auf einer großen Oberfläche attackiert haben, das Verschwinden dieser AK im Serum verursacht haben. Wichtig ist die Beobachtung, dass insgesamt viel IgG-AK im Standard-Test detektiert wurden und nur die komplementbindenden, nicht mehr peripher im Serum zu finden waren. Hier im Standard-Luminex war zu sehen, dass eine vermehrte Produktion von AK und damit eine Aktivierung der Immunantwort stattgefunden hatten. Der C4d-Luminex-Test zeigte dagegen deutlich, welche AK eventuell den Organschaden verursacht haben. In dieser Arbeit wurde in der Routine-Testung von Patienten beobachtet, dass sehr oft nach Ektomie einer Niere wegen Rejektion, im Serum *de novo* zytotoxische HLA-AK, gerichtet gegen das verlorene Transplantat, detektiert wurden. Diese Beobachtung ist bekannt und bestätigt unsere Hypothese über Adsorption von HLA-AK auf das Transplantat und eine damit verbundene

4. Diskussion

Schädigung. Der C4d-Test kann ein hilfreicher Hinweis für die Kliniker sein, dass es nicht nur zu einer *Boosterung* der AK-Produktion kommt, sondern auch eine Schädigung und Rejektion im Gang ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, werden weitere Studien benötigt, die nacheinander solche Patientenserum im Verlauf beobachten.

Ein weiteres interessantes Thema zur Diskussion in dieser Arbeit ist der Zusammenhang zwischen den PRA im Luminex Standard-Test und dem Anteil an zytotoxischen C4d-bindenden AK. Wir haben die untersuchten Patientenserum in drei Gruppen nach dem PRA-Wert im Standard-Luminex gruppiert. In der Gruppe Serum mit PRA >80% war der Anteil an Serum mit komplementbindenden AK (bezogen auf alle Serum in der Gruppe) für Klasse I sowie Klasse II AK über 60% (Klasse I 77% der Serum, Klasse II 69% der Serum). Diese Beobachtung lässt uns vermuten, dass der HLA-AK-Titer eine große Rolle für das Vorhandensein von zytotoxischen AK spielen kann. Solche Beobachtungen wurden ebenso von anderen Arbeitsgruppen gemacht [90]. Die MFI von DRA IgG AK korrelieren gut mit einer Positivität im LCT, was ebenso auf einen höheren Titer der entsprechenden AK hinweist [73]. Smith findet, dass alle LCT positive HLA-AK auch im C4d-Test positiv sind, was auch unseren Resultaten entspricht [62]. Es wurden aber solche HLA-AK detektiert, die im LCT positiv und im C4d-Luminex negativ sind [91]. Mizutani beschreibt in einer Studie, dass eine C4d-Bindung nur bei hochtitrigen IgG-AK stattfindet und dass diese Bindung mit den Luminex MFI korreliert [90,117]. Diesen Studien entsprechen auch unsere Beobachtungen. So könnte vermutet werden, dass die IgG-AK irgendwann bei Erhöhung des Titers, nach Aktivierung des Immunsystems, zytotoxisch werden und zum sicheren Transplantatschaden führen werden, wenn diese AK zu den DRA gehören.

Die C4d-Modifikation des Luminex-Tests wurde mit einer zweiten neuen Modifikation, C1q-Luminex, bei einigen Patientenserum, im Rahmen einer anderen Forschungsarbeit, verglichen. Die C4d-Modifikation diene als Hauptmethode, mit sicherer Relevanz und Korrelation mit C4d-Biopsie-Ergebnissen. Bei diesem Vergleich war die unterschiedliche Methodik wichtig. Beide Modifikationen weisen zwar Komplementspaltprodukte nach, aber bei dem C4d-Luminex-Test kommt es zu einer Komplementaktivierung im Reaktionsgefäß, wohingegen beim C1q-Test keine Aktivierung erfolgt, sondern nur die Bindung von C1q-Protein zu AK mit komplementbindenden Fähigkeiten. Das macht das Durchführen der C1q-Methode unkomplizierter. Die zwei unterschiedlichen Methoden haben ein gemeinsames Ziel:

4. Diskussion

sensitiverer Nachweis von komplementbindenden HLA-AK im Luminex SPA. Aktuell läuft eine Studie zum Charakterisieren und Vergleichen von ca. 60 Patientenseren aus dem AMM-Programm parallel mit C4d-Test und C1q-Test. Die Ergebnisse sind Teil weiterer Arbeiten. Erwähnenswert ist die große, fast vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse im C4d- und C1q-Luminex (Abb. 17).

A) HLA-Klasse I AK

HLA-Klasse I AK	B16	A10	B51	B53	B63	B54	B8	A1	A29	A30	A31	A36	A43	A28	A80
IgG-Luminex															
C4d-Luminex															
C1q-Luminex															
LCT															

B) HLA-Klasse II AK

HLA-Klasse II	DR53	DQ9	DQ8	DR51	DR4	DR16	DR14	DR13	DR11	DR10	DQ6	DR9	DR8	DR7
IgG-Luminex														
C4d-Luminex														
C1q-Luminex														
LCT														

Abbildung 17: Vergleich zwischen Luminex IgG-, C4d- und C1q-Methode, sowie LCT. A) HLA-Klasse I AK B) HLA-Klasse II AK . Grau gefüllt sind die Kästchen mit positiven Reaktionen in dem entsprechenden Test. Die 1. Spalte zeigt die verwendete Methode, die 1. Zeile zeigt die HLA-AK Spezifitäten.

Folgende Beobachtungen können aus diesem Beispiel abgeleitet werden: nicht alle IgG-AK sind zytotoxisch (LCT) und komplementaktivierend (C1q, C4d); durch den LCT werden nicht alle komplementbindende relevante AK detektiert, besonders bei Klasse II; es gibt in diesem Beispiel eine vollständige Übereinstimmung zwischen den C4d- und C1q-Methoden für Klasse I und II. Diese wurde ebenso bei anderen Patienten beobachtet. Es stellt sich damit die Frage was die Vorgehensweise bei solchen unterschiedlichen Resultaten zwischen LCT und die Modifikationen ist und was die Gründe dafür sind: Sensitivität der Methode, unterschiedliche Mechanismen zur Komplementaktivierung oder sind die nicht übereinstimmenden Reaktionen falsch positiv? Es wird klar, dass diese sensitiven neuen Methoden zum Nachweis von komplementbindenden HLA-AK sehr gut studiert, in großen Studien zum Transplantatüberleben und mit Rejektionen korreliert werden müssen. Weiterhin

4. Diskussion

bleibt das Problem bei der HLA-AK-Diagnostik, dass es keine einheitliche Vorgehensweise zwischen den verschiedenen Laboren gibt. Grund dafür ist sich weiterentwickelnde Forschung mit neuen Erkenntnissen und Methoden, wobei jedes Labor unterschiedlichen Testanalysen vertraut.

Zusammenfassend kann man folgende Stichpunkte für die in dieser Arbeit verwendeten Methoden aufführen (Tabelle 23).

Tabelle 23: Die wichtigsten Vor- und Nachteile der meistverwendeten Methoden zum HLA-AK Nachweis.

Test	Träger	Typ AK	Sensitivität	Spezifität	Limitierung	Kosten
LCT	Zellen	zytotoxische IgG+IgM	schwach	schwierig zu erkennen	antilymphozytäre Medika (Rituximab)	nicht kostenintensiv
Luminex IgG Mix	Beads	IgG	schwach	schwierig zu erkennen	erhöhter Background (nach Ivlg)	preiswerter als SA
Luminex IgG SA	Beads	IgG	sehr sensitiv	eindeutig	detektiert „sehr viele AK“	kostenintensiv
Luminex C4d-SA	Beads	komplementbindende (C4d) IgG+IgM	sehr sensitiv	eindeutig	Komplementinhibitoren in Serum	kostenintensiv

Aus der o.g. Tabelle ist nachzuvollziehen, dass unsere neue Modifikation des Luminex-Tests, die wichtigsten Vorteile aller anderen Methoden einschließt (Nachweis sicher relevanter komplementaktivierender HLA-AK, große Sensitivität, leichte Auswertung, Verzicht auf Zellen) und als Nachteil können die Kosten erwähnt werden, die allerdings die von einem SA-Test nicht wesentlich übersteigen.

4.3 Nutzen von C4d-Luminex und Ausblick

Mit dieser Arbeit haben wir eine neue Modifikation des Luminex-Tests entwickelt. Neu hier sind das Analysieren von Patientenserum in der Spät-Phase nach Nieren-TX, sowie der Testablauf an sich. In der Zukunft sehen wir den C4d-Luminex-Test als eine führende solide Methode zum non-invasiven Nachweis von humoraler Rejektion. Wir sehen die Methode als einzige rettende Möglichkeit für viele hochimmunisierte Patienten im AMM-Programm, indem sensitiver und genauer die komplementbindenden HLA-AK definiert werden. Unser C4d-Luminex-Test kann ein Hinweis für eine beginnende Rejektion geben und den Erfolg nach Plasmapheresen oder IgG-Therapien beurteilen. Diese Methode kann ebenso gut zum Auswahl von „gematchten“ TKs dienen. Diese möglichen Anwendungen der Methode

4. Diskussion

können in der Zukunft sicherer genutzt werden, indem größere Studien mit Beurteilung der klinischen Relevanz erfolgen. Die C4d-AK sind vermutlich wie die im LCT bekannten zytotoxischen HLA-AK klinisch relevant und führen zur Rejektion oder weisen daraufhin. Es muss in Studien das Zeit-Fenster zwischen dem ersten Auftreten von C4d-AK und einer Rejektion definiert werden, sowie der Zeitpunkt zum Einsetzen bzw. Ändern der Therapie bestimmt werden. Es kann im Testablauf zum Nachweis von C4d-bindenden HLA-AK ein Sekundär-AK zum Detektieren der Ig-Klassen der HLA-AK eingeführt werden. Weitere Methoden, die andere Komplementkomponenten nachweisen, können ebenso eingeführt werden. Das Verwenden dieser hochsensitiven Techniken könnte in Zukunft den Standard-LCT-Tests vervollständigen oder sogar ersetzen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis von klinisch-relevanten HLA-Antikörpern (AK) nach Nieren-Transplantation. Dabei spielen zytotoxische AK, die gegen HLA-Merkmale des Spenders gerichtet sind, eine essentielle Rolle; sie stellen bereits zur Transplantation eine absolute Kontraindikation dar, da sie eine hyperreaktive Rejektion auslösen können. Das momentanige Anliegen ist, in der Spät-Phase nach Nierentransplantation neue, nicht invasive Labormethoden zu entwickeln, um eine Transplantatabstoßung rechtzeitig zu diagnostizieren. Der Luminex-Test ist derzeit die meist verwendete Methode, die eine sehr große Sensitivität aufweist. Um diese Luminex-HLA-AK besser zu charakterisieren und sensitiver komplementbindende HLA-AK von nicht komplementbindenden zu unterscheiden, haben wir eine Modifikation des Luminex-Festphasen-Tests entwickelt. Der Nachweis erfolgt durch Detektion von der C4d-Komplementkomponente, was gut mit C4d-positiven Biopsien bei Rejektion korreliert.

Ziel dieser Arbeit war diese C4d-Luminex-Modifikation zu optimieren, als Routine-Test zu evaluieren, das Prüfen der klinischen Relevanz an Patientenseren, sowie der Vergleich zwischen dem C4d-Luminex-Test mit den Standard-Methoden: Lymphozytotoxizitätstest (LCT) und Luminex-IgG.

Die Ergebnisse zeigen eine sehr hohe Sensitivität und Plausibilität des C4d-Luminex-Tests. Es wurden alle Schritte des Arbeitsprotokolls, wie Inkubationszeiten, Temperatur, Waschschritte, Detektions-AK, Komplementquelle, Vorbehandlung der Testseren, ausgetestet und optimiert. Wir haben keinen erhöhten Background oder falsch positive Ergebnisse in unserem Test gefunden, auch nicht in Seren nach Rituximab-Behandlung der Patienten. Es wurde hingegen festgestellt, dass der Luminex-Screening-Test falsch negative Resultate liefern kann. Dies führt zur Empfehlung, alle dort grenzwertig positiven Seren auch mit den Luminex-Einzelantigentests Klasse I bzw. II zu untersuchen. Bei dem Vergleich zwischen C4d-Luminex-Test und den Standard-Methoden wurden interessante und nicht erwartete Resultate beobachtet: In der Gruppe von HLA-Klasse I und II negativen Patienten, wurden donorreaktive C4d-bindende HLA-AK detektiert. In der Gruppe von Patienten, die für HLA Klasse I und II AK positiv waren, wurden mittels C4d-Luminex-Test ebenso DRA gefunden, die im LCT nicht detektierbar waren. Es wurde auch beobachtet, dass mehr als die Hälfte der

5. Zusammenfassung

Seren von hoch-immunisierten Patienten, getestet im Standard-Luminex-Test, HLA Klasse I und II C4d-bindende AK aufweisen.

Die Vorteile des C4d-Luminex-Tests sind die große Sensitivität und Spezifität der nachgewiesenen HLA-AK, leichte und eindeutige Auswertbarkeit, sowie der Verzicht auf Arbeiten mit Spender-Zellen. Diese Modifikationen überbrücken die Nachteile der Standard-Methoden LCT und Luminex und detektieren komplementbindende beider HLA-Ak Klassen I und II, mit einer deutlich höheren Sensitivität im Vergleich zum LCT. Der C4d-Luminex-Test kann zur Risiko-Definition bei hochimmunisierten Patienten verwendet werden, sowohl als Routine-Test wie auch als Screening-Methode eingeführt werden. Der Nachweis der Relevanz der C4d-bindenden HLA-AK im Langzeitüberleben nach Nieren-TX steht für weitere Studien noch aus.

6 Eigenständigkeitserklärung

Ich, Kremena Todorova, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Entwicklung eines C4d-Luminex-Festphasen-Assays zum Nachweis
komplementaktivierender HLA-AK nach Nieren-Transplantation“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

02.07.2012

Berlin

(Kremena Todorova)

7 Danksagung

Die Bearbeitungen zum Thema der vorliegenden Dissertationsschrift erfolgten im Zeitraum vom Juni 2010 bis zum Juni 2012 am Institut für Transfusionsmedizin unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.Salama. Ich danke für die gegebene Möglichkeit, diese Forschungsarbeit zu verwirklichen.

Meinem Doktorvater, PD Dr. Harald Schulze, danke ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung, die wertvollen Ratschläge bei meiner experimentellen Arbeit und die fruchtbare Diskussionen und auch dafür, dass er für mich trotz seiner enormen Arbeitsbelastung jederzeit ansprechbar war.

Ein ganz besonderer Dank gilt Fr.Dr.Schönemann, Leiterin des Gewebetypisierungslabors der Charité, für die Vergabe dieses interessanten Themas, für die Ermöglichung der Arbeit in ihren Laboren, für die geduldige Unterstützung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen und allen MTLAs aus HLA-Labor für das angenehme Arbeitsklima, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Für die Genehmigung zur Dateneinsicht und -verwendung von Patientendaten danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Budde.

Nicht an letzter Stelle danke ich meinen Eltern und Großeltern, meiner Schwester und meinem Ehemann, die mich ermutigt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner wundervollen Tochter Preslava, die mich verstanden hat.

8 Lebenslauf von Kremena Todorova

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationsliste

1. Todorova K, Schulze H, Ciroki J, Uharek L, Salama A, Schönemann C. A new HLA-B*52 allele, B*52:23, detected in a patient before bone marrow transplantation. Tissue Antigens. 2011 Dec;78(6):455-6
2. Todorova K, Schulze H, Lassahn A, Galicki L, Salama A, Schoenemann C. Identification of a new HLA-DRB1* 14 allele, DRB1*14:99, by HLA typing of an Asian individual. Tissue Antigens. 2011 Dec;78(6):466-7
3. Todorova K, Schulze H, Diederich G, Ebell W, Salama A, Schoenemann C. A novel HLA-DQB1*03:02 variant designated DQB1*03:02:05 Tissue Antigens. 2011 Nov;78(5):404-5
4. Todorova K, Schulze H, Hartmann S, Arnold R, Salama A, Schönemann C. A new HLA-C*07 variant allele, C*07:108, identified by sequence-based typing. Tissue Antigens. 2011 Nov;78(5):403-4
5. Todorova K, Schulze H, Dautert C, Arnold R, Salama A, Schoenemann C. Identification of a novel HLA-C*02 allele, HLA-C*02:02:09. Tissue Antigens. 2011 Dec;78(6):456-7
6. Schulze H, Todorova K, Cirocki J, Uharek L, Schönemann C., Detection of a novel HLA-A allele, designated A*02:334. Tissue Antigens. 2012 Jun 06

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bei der 19. Jahrestagung der DGI (Sept. 2011) vorgestellt. Eine Erstautorpublikation in „Transplantation“ ist bereits akzeptiert.

10 Literaturverzeichnis

1. Deutsches Ärzteblatt: „Organspende: Das Potenzial ist hoch“ (30.03.2012), <http://www.aerzteblatt.de/>
2. Kühn, Teut Risler. Facharzt Nephrologie, 2008, ELSEVIER, 1. Auflage
3. Lodhi SA, Meier-Kriesche HU. Kidney allograft survival: the long and short of it. *Nephrol Dial Transplant*. England; 2011:15-17
4. Garcia G, Harden P, Chapman J. The global role of kidney transplantation. *Iran J Kidney Dis* 2012; 6: 81-87
5. Whalen H, Clancy M, Jardine A. Future challenges in renal transplantation. *Minerva Chir* 2012; 67: 15-30
6. DSO. Statistik 2012; <http://www.dso.de>
7. Eurotransplant. 2012; <http://www.eurotransplant.org>
8. Schilling-Leiss D, Bracone F, Selbert M et al. [Report on notifications according to Section 8d of the German Transplantation Act (TPG) for the year 2008]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2011; 54: 1116-1125
9. Bundesärztekammer. Richtlinie zur Organtransplantation gemäß § 16 Transplantationsgesetz. 2012; <http://www.bundesaerztekammer.de/>
10. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739
11. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. *Transfusionsmedizin*; 2011, Springer, 3. Auflage
12. Dausset J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol* 1958; 20: 156-166
13. Wake CT. Molecular biology of the HLA class I and class II genes. *Mol Biol Med* 1986; 3: 1-11
14. Jan Klein, Akie Sato, Ph.D. The HLA System — *NEJM*. 2012; *N Engl J Med* 2000; 343:702-709
15. Lemy A, Andrien M, Lionet A et al. Posttransplant Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Gene A Antibodies and Long-Term Graft Outcomes in a Multicenter Cohort of 779 Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* 2012;
16. Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R. *Taschenatlas der Immunologie*, 2006; Thieme, 2. Auflage
17. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 2010; 75: 291-455
18. Muro M, González-Soriano MJ, Salgado G et al. Specific "intra-allele" and "intra-broad antigen" human leukocyte antigen alloantibodies in kidney graft transplantation. *Hum Immunol* 2010; 71: 857-860
19. Marsh SG. Nomenclature for factors of the HLA system, update January 2012. *Int J Immunogenet* 2012;
20. L. Thomas. *Labor und Diagnose* 2007, TH-Books, 5. Auflage
21. Roelen DL, van Bree J, Witvliet MD et al. IgG antibodies against an HLA antigen are associated with activated cytotoxic T cells against this antigen, IgM are not. *Transplantation* 1994; 57: 1388-1392

22. Bindon CI, Hale G, Bruggemann M et al. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med* 1988; 168: 127-142
23. Kushihata F, Watanabe J, Mulder A et al. Human leukocyte antigen antibodies and human complement activation: role of IgG subclass, specificity, and cytotoxic potential. *Transplantation*. United States; 2004:995-1001
24. Kenneth M. Murphy PT, Mark Walport. *Janeway Immunologie 7.Auflage*
25. Hyun J, Park KD, Yoo Y et al. Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in solid organ transplantation patients. *Transplant Proc* 2012; 44: 222-225
26. Qian Z, Lee CY, Murata K et al. Antibody and complement mediated injury in transplants following sensitization by allogeneic blood transfusion. *Transplantation*. United States; 2006:857-864
27. Balasubramaniam GS, Morris M, Gupta A et al. Allosensitization rate of male patients awaiting first kidney grafts after leuko-depleted blood transfusion. *Transplantation* 2012; 93: 418-422
28. Bartel G, Walch K, Wahrmann M et al. Prevalence and qualitative properties of circulating anti-human leukocyte antigen alloantibodies after pregnancy: no association with unexplained recurrent miscarriage. *Hum Immunol* 2011; 72: 187-192
29. Hughes PD, Cohn SJ. Modifiers of complement activation for prevention of antibody-mediated injury to allografts. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 425-433
30. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 2009; 20: 34-50
31. Leshner A, Song WC. New complement regulator exposed. *Blood* 2009; 114: 2363-2364
32. Roos A, Nauta AJ, Broers D et al. Specific inhibition of the classical complement pathway by C1q-binding peptides. *J Immunol* 2001; 167: 7052-7059
33. Platt JL. C4d and the fate of organ allografts. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2417-2419
34. M. Mengell, B. Sis. Haas, R. B. Colvin, P. F. Halloran, D. Glotz. Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection - Mengel - 2012 - American Journal of Transplantation - Wiley Online Library. 2012;
35. Carpio VN, Rech C, Eickhoff EI et al. Clinical and pathological correlations of C4d immunostaining and its influence on the outcome of kidney transplant recipients. *J Bras Nefrol* 2011; 33: 329-337
36. Fuggle SV, Allen JE, Johnson RJ et al. Factors affecting graft and patient survival after live donor kidney transplantation in the UK. *Transplantation* 2010; 89: 694-701
37. Haas M. The significance of C4d staining with minimal histologic abnormalities. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 21-27
38. Feucht HE, Mihatsch MJ. Diagnostic value of C4d in renal biopsies. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. England; 2005:592-598
39. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 574-582
40. Colvin RB. Dimensions of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. United States; 2010:1509-1510
41. Bohmig GA, Exner M, Habicht A et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-1099

42. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9: 2312-2323
43. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 42-48
44. Williams WW, Taheri D, Tolkoff-Rubin N et al. Clinical role of the renal transplant biopsy. *Nat Rev Nephrol* 2012; advance online publication
45. Cravedi P, Heeger PS. Immunologic monitoring in transplantation revisited. *Curr Opin Organ Transplant* 2012; 17: 26-32
46. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol. United States*; 2010:1398-1406
47. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Contrib Nephrol. Switzerland: Basel.*; 2009:1-12
48. Thammanichanond D, Ingsathit A, Mongkolsuk T et al. Pre-transplant donor specific antibody and its clinical significance in kidney transplantation. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012; 30: 48-54
49. Eng HS, Bennett G, Chang SH et al. Donor human leukocyte antigen specific antibodies predict development and define prognosis in transplant glomerulopathy. *Hum Immunol* 2011; 72: 386-391
50. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74: 1192-1194
51. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003; 3: 1488-1500
52. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* 2008; 86: 377-383
53. Moise A, Nedelcu D, Toader A et al. Cytotoxic antibodies--valuable prognostic factor for long term kidney allograft survival. *J Med Life* 2010; 3: 390-395
54. Moise A ND, Toader A, Sora M, Tica A, Ferastraoar DE, Constantinescu I. Cytotoxic antibodies-valuable prognostic factor for long term kidney allograft survival. *J Med Life*; 2010;3(4):390-395
55. Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, González-Roncero FM et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1231-1238
56. Claas FH. Clinical relevance of circulating donor-specific HLA antibodies. *Curr Opin Organ Transplant*; 2010(4):462-466
57. Tiercy JM, Cattin S, Pongratz G et al. A complementary strategy for pretransplant HLA antibody screening. *Transplant Proc* 2002; 34: 850-851
58. Worthington JE, Robson AJ, Sheldon S et al. A comparison of enzyme-linked immunoabsorbent assays and flow cytometry techniques for the detection of HLA specific antibodies. *Hum Immunol* 2001; 62: 1178-1184
59. Tait BD, Hudson F, Cantwell L et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14: 247-254

60. Gibney EM, Cagle LR, Freed B et al. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2625-2629
61. Cecka JM. Current methodologies for detecting sensitization to HLA antigens. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 398-403
62. Smith JD, Hamour IM, Banner NR et al. C4d fixing, luminex binding antibodies - a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. *Am J Transplant. Denmark*; 2007:2809-2815
63. Süsal C, Ovens J, Mahmoud K et al. 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* 2011; 91: 883-887
64. Zoet SHB-S, D. L. Roelen, A. Mulder, F. H. J. Claas, I. I. N. Doxiadis,. Challenging the golden standard in defining donor-specific antibodies: does the solid phase assay meet the expectations? *Tissue Antigens*; 2011:Volume 77, Issue 73, pages 225–228
65. Tait BD, Hudson F, Brewin G et al. Solid phase HLA antibody detection technology--challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010; 76: 87-95
66. Eng HS, Bennett G, Bardy P et al. Clinical significance of anti-HLA antibodies detected by Luminex: enhancing the interpretation of CDC-BXM and important post-transplantation monitoring tools. *Hum Immunol* 2009; 70: 595-599
67. Turgeon NA, Kirk AD, Iwakoshi NN. Differential effects of donor-specific alloantibody. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23: 25-33
68. Heinemann FM, Roth I, Rebmann V et al. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Hum Immunol* 2007; 68: 500-506
69. Lobashevsky A, Rosner K, Goggins W et al. Subtypes of immunoglobulin (Ig)-G antibodies against donor class II HLA and cross-match results in three kidney transplant candidates. *Transpl Immunol* 2010; 23: 81-85
70. Wahrmann M, Exner M, Regele H et al. Flow cytometry based detection of HLA alloantibody mediated classical complement activation. *J Immunol Methods* 2003; 275: 149-160
71. Garratty G. The effects of storage and heparin on the activity of serum complement, with particular reference to the detection of blood group antibodies. *J Clin Pathol* 1970; 54: 531-538
72. Colombo MB, Haworth SE, Poli F et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 465-471
73. Batal I, Zeevi A, Lunz JG, 3rd et al. Antihuman leukocyte antigen-specific antibody strength determined by complement-dependent or solid-phase assays can predict positive donor-specific crossmatches. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 1534-1540
74. Hwang HS, Sun IO, Yoon HE et al. Antibody monitoring system to support the single-antigen Luminex assay in donor-specific antibody detection. *Hum Immunol* 2012; 73: 370-375
75. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M et al. HLA antibody specification using single-antigen beads-a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011; 92: 510-515
76. Reid KBM, Day AJ. Structure-function relationships of the complement components. *Immunology Today*; 10

77. Okuno T, Kondelis N. Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *J Clin Pathol* 1978; 31: 1152-1155
78. Minucci PB, Grimaldi V, Casamassimi A et al. Methodologies for Anti-HLA Antibody Screening in Patients Awaiting Kidney Transplant: A Comparative Study. *Exp Clin Transplant* 2011; 9: 381-386
79. Zoet YM, Brand-Schaaf SH, Roelen DL et al. Challenging the golden standard in defining donor-specific antibodies: does the solid phase assay meet the expectations? *Tissue Antigens* 2011; 77: 225-228
80. Mizutani K, Shibata L, Ozawa M et al. Detection of HLA and MICA antibodies before kidney graft failure. *Clin Transpl* 2006: 255-264
81. Wahrmann M, Exner M, Schillinger M et al. Pivotal role of complement-fixing HLA alloantibodies in presensitized kidney allograft recipients. *Am J Transplant. Denmark*; 2006:1033-1041
82. Bartel G, Wahrmann M, Exner M et al. In vitro detection of C4d-fixing HLA alloantibodies: associations with capillary C4d deposition in kidney allografts. *Am J Transplant* 2008; 8: 41-49
83. Böhmig GA, Bartel G, Wahrmann M. Antibodies, isotypes and complement in allograft rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 411-418
84. Rose ML, Smith JD. Clinical relevance of complement-fixing antibodies in cardiac transplantation. *Hum Immunol* 2009; 70: 605-609
85. Watanabe J, Scornik JC. Measuring human complement activation by HLA antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 368-373
86. Wahrmann M, Exner M, Haidbauer B et al. [C4d]FlowPRA screening--a specific assay for selective detection of complement-activating anti-HLA alloantibodies. *Hum Immunol* 2005; 66: 526-534
87. Hansch GM, Hammer CH, Vanguri P et al. Homologous species restriction in lysis of erythrocytes by terminal complement proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 5118-5121
88. Schonermark S, Rauterberg EW, Shin ML et al. Homologous species restriction in lysis of human erythrocytes: a membrane-derived protein with C8-binding capacity functions as an inhibitor. *J Immunol* 1986; 136: 1772-1776
89. Houle JJ, Hoffmann EM. Evidence for restriction of the ability of complement to lyse homologous erythrocytes. *J Immunol* 1984; 133: 1444-1452
90. Mizutani K, Gotoh M. C4d binding correlated with strong HLA antibodies involved in graft failures. *Transplant Proc* 2010; 42: 4021-4025
91. Wahrmann M, Bartel G, Exner M et al. Clinical relevance of preformed C4d-fixing and non-C4d-fixing HLA single antigen reactivity in renal allograft recipients. *Transpl Int* 2009; 22: 982-989
92. Hönger G, Wahrmann M, Amico P et al. C4d-fixing capability of low-level donor-specific HLA antibodies is not predictive for early antibody-mediated rejection. *Transplantation* 2010; 89: 1471-1475
93. Doxiadis II, Claas FH. Transplantation of highly sensitized patients via the acceptable mismatch program or desensitization? We need both. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; 14: 410-413
94. Claas FH, Doxiadis II. Management of the highly sensitized patient. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 569-572

95. Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S et al. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 2009; 87: 813-820
96. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011; 72: 849-858
97. Zachary AA, Lucas DP, Detrick B et al. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immunol* 2009; 70: 496-501
98. Kosmoliaptsis V, O'Rourke C, Bradley JA et al. Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum Immunol* 2010; 71: 45-49
99. Bryan CF, Martinez J, Muruve N et al. IgM antibodies identified by a DTT-ameliorated positive crossmatch do not influence renal graft outcome but the strength of the IgM lymphocytotoxicity is associated with DR phenotype. *Clin Transplant* 2001; 15 Suppl 6: 28-35
100. Hönger G HH, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation* 2011; 92(11):41-17
101. Jackson AM, Lucas DP, Melancon JK et al. Clinical Relevance and IgG Subclass Determination of Non-HLA Antibodies Identified Using Endothelial Cell Precursors Isolated From Donor Blood. *Transplantation* 2011; 92: 54-60
102. Lietz K, John R, Burke E et al. Immunoglobulin M-to-immunoglobulin G anti-human leukocyte antigen class II antibody switching in cardiac transplant recipients is associated with an increased risk of cellular rejection and coronary artery disease. *Circulation. United States*; 2005:2468-2476
103. Stastny P, Ring S, Lu C et al. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Hum Immunol. United States*; 2009:600-604
104. Suzuki M, Ishida H, Komatsu T et al. Kidney transplantation in a recipient with anti-HLA antibody IgM positive. *Transpl Immunol* 2009; 21: 150-154
105. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA et al. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86: 1111-1115
106. Lutz HU, Miescher S. Natural antibodies in health and disease: an overview of the first international workshop on natural antibodies in health and disease. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 405-409
107. Lutz HU. Homeostatic roles of naturally occurring antibodies: an overview. *J Autoimmun* 2007; 29: 287-294
108. Tait BD. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol. England*; 2009:573-577
109. Smith JD, Hamour IM, Banner NR et al. C4d fixing, luminex binding antibodies - a new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 2809-2815

110. Pei R, Lee JH, Shih NJ et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003; 75: 43-49
111. Leffell MS, Zachary AA. Antiallograft antibodies: relevance, detection and monitoring. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 2-7
112. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 2005; 80: 1194-1197
113. Stegall MD GJ. Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment. *Curr Opin Organ Transplant*; 2010;15(11):18-10
114. Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G et al. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum Immunol* 2009; 70: 580-583
115. Bartel G, Regele H, Wahrmann M et al. Posttransplant HLA alloreactivity in stable kidney transplant recipients-incidences and impact on long-term allograft outcomes. *Am J Transplant* 2008; 8: 2652-2660
116. Opelz SaG. Good kidney transplant outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. *Human Immunology*; 2004:Volume 65, Issue 68, Pages 810-816
117. Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E et al. The importance of anti-HLA-specific antibody strength in monitoring kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2007; 7: 1027-1031