

Immunologische Verträglichkeitsdiagnostik bei der Nierentransplantation: ein Update

Die Entdeckung der immunologischen Grundlagen der Organabstoßung hat große Fortschritte in der Transplantationsmedizin ermöglicht. Die wichtigsten Transplantationsantigene bei der Nierentransplantation stellen neben den ABO-Blutgruppen die humanen Leukozytenantigene (HLA) dar. Der Artikel enthält eine Übersicht über das HLA-System und beschreibt seine aktuelle Bedeutung für die Nierentransplantation. Weiterhin ist eine Übersicht über die HLA-Antikörper- und HLA-Kreuzprobendiagnostik im Kontext der aktuell gültigen deutschen Regularien mit Ausblick auf neuere Methoden enthalten. HLA-Merkmale sind bevorzugte Ziele der zellulären und humoralen Immunität bei Transplantationen. Neben der Zuordnung HLA-A, -B und -DR-kompatibler Spender zu Empfängern ist die Berücksichtigung von HLA-spezifischen Antikörpern bei der Nierentransplantation wichtig. Die HLA-Antikörperdiagnostik hat sich mit der Entwicklung vom Lymphozytotoxizitätstest (LCT) hin zu neueren Festphasenassays (ELISA-Tests, Bead-basierte Tests) deutlich verbessert. Neben dem Nachweis von Antikörpern gegen HLA-A und HLA-B-Merkmale, die bisher auch über den LCT gut nachweisbar waren, ist es nun möglich, auch Antikörper gegen HLA-Cw und HLA-Klasse II-Merkmale (HLA-DR, -DQ und -DP) genauer zu spezifizieren. Dies wird zukünftig eine stärkere Berücksichtigung auch dieser Merkmale bei der Zuordnung von Spendernieren nach sich ziehen. Im Vergleich zum LCT werden durch die neuen Verfahren zusätzliche HLA-Antikörper erkannt, für die sich statistisch eine klinische Relevanz für das Transplantatüberleben und für das Risiko von Rejektionen abzeichnet. Die klinische Relevanz ist bisher jedoch nicht für jeden Einzelfall erkennbar, was eine differenzierte Betrachtungsweise erforderlich macht. Der LCT wird nach wie vor als Goldstandard für die Beurteilung der immunologischen Verträglichkeit von Organen gesehen, während sich die neueren Methoden in der fortgeschrittenen Evaluationsphase befinden und zur Zeit ergänzend durchgeführt werden. (Wortzahl 250)

Schlüsselwörter: Nierentransplantation; HLA-Antigene; HLA-Antikörper; HLA-Crossmatch

Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie, Universitätsklinikum Münster

Immunological Compatibility Testing in Kidney Transplantation – An Update

Kelsch R, Weber D (2010) Immunologische Verträglichkeitsdiagnostik bei der Nierentransplantation: ein Update. Tx Med 22: 111-116

The discovery of the immunological principles of transplant rejection provided a substantial progress in transplantation medicine. In kidney transplantation the ABO blood groups and the Human Leucocyte Antigens (HLA) are the most important transplantation

antigens. The present article gives a survey of the HLA-system and summarizes the current standard procedures of HLA-antibody and HLA-crossmatch testing according to the German guidelines with a special focus on new developments. HLA-antigens are major targets for the cellular and humoral immunity in transplantation. In kidney transplantation matching of HLA-A, -B and -DR antigens of organ donors and recipients and the consideration of HLA specific antibodies is important. HLA-antibody diagnostics have been improved by the introduction of solid phase assays (ELISA assays, bead immunoassays) in addition to the complement-dependent cytotoxicity assay (CDC). Besides the detection of antibodies against HLA-A or HLA-B, which had been well detectable by CDC already, the specification of antibodies against HLA-Cw and HLA-Class II (HLA-DR, -DQ and -DP) has become more accurate. This will encourage the use of additional HLA-loci for matching of kidneys in future. The new methods detect HLA antibodies with a higher sensitivity and frequency, and first studies show that CDC-negative antibodies have a negative effect on transplant survival and rejection risk in a high proportion of patients, too. However, conclusions as to the clinical application of the results have to be drawn carefully, since an effect is not assured for all patients yet. The CDC assay is still seen as the gold standard for compatibility testing in kidney transplantation. The new methods provide essential and valuable information and should be used supplementary.

Key words: kidney transplantation, HLA antigens, HLA antibodies, HLA crossmatch

Dank großer Fortschritte in der Transplantationsmedizin ist heutzutage die Nierentransplantation das Nierenersatzverfahren, welches die höchsten Patientenüberlebensraten garantiert. Die erste erfolgreiche Nierentransplantation gelang im Jahr 1954 dem Chirurgen J.E. Murray in den USA. Der Patient erhielt eine Niere von seinem eineiigen Zwilingsbruder, wobei die Monozygotie der Zwillinge durch immunologische Untersuchung damals bekannter Blutgruppenmerkmale und eine probatorische Hauttransplantation im Vorfeld geprüft wurde (1). Es wurde klar, dass aus immunologischer Sicht für eine erfolgreiche Übertragung von Organen sowohl die ABO-Blutgruppe als auch möglichst ähnliche Gewebeeigenschaften wichtig sind.

Der erste Antikörper gegen ein Gewebeanantigen MAC (später HLA-A2) wurde 1958 durch Jean Dausset beschrieben (2), der damit die Entdeckung der humanen Leukozytenantigene (HLA-Antigene) eingeleitet hat. (Die

HLA-Antigene befinden sich auf gleichnamigen HLA-Proteinen). Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen ist eine möglichst große Ähnlichkeit in den HLA-Merkmalen von Spender und Empfänger anzustreben. Aktuell wird die möglichst gute Übereinstimmung der HLA-A, -B und -DR-Merkmale von Spender und Empfänger bei der Organvermittlung berücksichtigt, während HLA-Cw, HLA-DQ und HLA-DP aktuell nur in speziellen Fällen Berücksichtigung finden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Vorimmunisierung gegen HLA-Antigene durch Schwangerschaften, Transfusionen oder Transplantationen mit der Bildung von Antikörpern gegen HLA-Klasse I- oder -Klasse-II-Merkmale. Präformierte HLA-Antikörper wurden früh als hohes Risiko für akute Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen erkannt (3). Dies führte zur Einführung des lymphozytären Crossmatch als Pflichttest vor Nierentransplantation, zur Entwicklung der HLA-Antikörperdiagnostik

und den Regeln zur immunologischen Diagnostik vor Organtransplantation. Neben den ABO-Blutgruppen und HLA-Antigenen gibt es weitere Gewebemerkmale, die im Rahmen von Nierentransplantationen eine Rolle spielen können, die jedoch momentan noch keinen Einzug in den klinischen Routinealltag gefunden haben (zur Übersicht siehe (4)).

Angesichts der Wirksamkeit der heute zur Verfügung stehenden immunsuppressiven Medikamente stellt sich die Frage, ob sich die Verträglichkeit der HLA-Gewebemerkmale von Spender und Empfänger nach wie vor auf das Transplantatüberleben bei der Nierentransplantation auswirkt. Eine zu dieser Fragestellung kürzlich veröffentlichte Studie von Opelz und Döhler (5) aus Daten der Collaborative Transplant Study konnte durch den Vergleich der 5-Jahres-Transplantatüberlebensraten bei Nierentransplantationen für die Zeiträume 1985 bis 1994 und 1995 bis 2004 zeigen, dass sich in neuerer Zeit unter verbesserter Immunsuppression das mittlere Transplantatüberleben mit einer Steigerung von ca. 10% verbessert hat. Nach wie vor ist jedoch noch ein deutlicher Effekt der HLA-Verträglichkeit sowohl auf die Transplantatüberlebensrate als auch auf das Überleben des Patienten nachweisbar, dessen relativer Einfluss sich nicht verändert hat. Beide Parameter verschlechtern sich mit steigender Anzahl der HLA-A-, -B- oder -DR-Mismatches, wobei der relative Anteil der pro Mismatch zusätzlich verlorenen Organe in etwa gleich geblieben ist. Neben der immunologischen Verträglichkeit von Spender und Empfänger gibt es weitere wichtige Faktoren wie die kalte Ischämiezeit, das Alter von Organspender oder Organempfänger und die Todesursache des Organspenders, die über die Organqualität die Transplantatüberlebenszeit beeinflussen. Eine im Jahr 2002 publizierte amerikanische Studie von Su et al. (6) wies für die Population des Network of Organ Sharing (UNOS) für den Zeitraum von 1994 bis 2001 mit ca. 33.000 Transplantationen einen sinkenden Einfluss des HLA-Matching auf das Transplantatüberleben zugunsten von nicht-HLA-bedingten Faktoren aus. Die Daten der Collaborative Transplant Study (5) mit Einschluss von ca. 135.000 Transplantationen und der Auswertung längerer Zeiträume weisen jedoch deutlich in eine entgegengesetzte Richtung.

Das HLA-System

Die HLA-Antigene wurden ähnlich wie die ABO-Blutgruppen über agglutinierende Eigenschaften von Seren entdeckt. In Seren enthaltene HLA-spezifische Antikörper führten zu einer Agglutination von Leukozyten der Zellspender, die für das passende HLA-Merkmal positiv waren. Später wurde diese Technik aufgrund ihrer mäßigen Reproduzierbarkeit durch den Mikrolymphozytotoxizitätstests (LCT) von Terasaki (7) ersetzt. Serologisch und mit Hilfe von Lymphozytenstimulationstests wurden Merkmalsgruppen herausgearbeitet, die als HLA-A, -B, -C (HLA-Klasse-I-Merkmalsgruppen), oder HLA-DR, -DQ oder HLA-DP (HLA-Klasse-II-Merkmalsgruppen) bezeichnet werden. Serologisch definierte Allele innerhalb der Merkmalsgruppen wurden meist nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit Ziffern bezeichnet. Jeder Mensch besitzt jeweils zwei serologische HLA-Merkmale für jede Merkmalsgruppe.

HLA-Klasse-I-Merkmale sind auf nahezu allen Körperzellen zu finden, während HLA-Klasse II-Antigene regulär nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) vorkommen. Unter bestimmten Voraussetzungen können HLA-Klasse-II-Antigene auch auf anderen Zellen, z.B. Endothelzellen oder T-Lymphozyten erscheinen. Von Bedeutung für die Nierentransplantation ist, dass HLA-DR-Antigene auch auf tubulären Zellen (8) und HLA-DR, -DQ und -DP auf mikrovaskulären Endothelzellen der Niere nachgewiesen werden konnten (9, 10).

Die HLA-Antigene bzw. die Antigen-tragenden HLA-Proteine sind auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 kodiert. Hier befindet sich der Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) mit mehr als 100 verschiedenen Genen und Pseudogenen, auf dem neben den HLA-Proteinen noch viele andere Proteine mit speziellen Funktionen im Immunsystem kodiert sind. HLA-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer hoch-variablen α -Kette und einem kleinen konstanten β_2 -Microglobulin-Anteil. Die α -Kette der HLA-A-, B- und C-Moleküle bildet 3 Domänen und enthält die gesamte Antigenität und Proteinstruktur zur Antigen-präsentation. In der MHC-Klasse-I-Region befindet sich für jeden Proteintyp

Serologisch definierte HLA-Spezifitäten					
HLA-A	HLA-Klasse I		HLA-Klasse II		
	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ	
A1	B5	B51(5)	Cw1	DR1	DQ1
A2	B7	B5102	Cw2	DR103	DQ2
A203	B703	B5103	Cw3	DR2	DQ3
A210	B8	B52(5)	Cw4	DR3	DQ4
A3	B12	B53	Cw5	DR4	DQ5(1)
A9	B13	B54(22)	Cw6	DR5	DQ6(1)
A10	B14	B55(22)	Cw7	DR6	DQ7(3)
A11	B15	B56(22)	Cw8	DR7	DQ8(3)
A19	B16	B57(17)	Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)
A23(9)	B17	B58(17)	Cw10(w3)	DR9	
A24(9)	B18	B59		DR10	
A2403	B21	B60(40)		DR11(5)	
A25(10)	B22	B61(40)		DR12(5)	
A26(10)	B27	B62(15)		DR13(6)	
A28	B2708	B63(15)		DR14(6)	
A29(19)	B35	B64(14)		DR1403	
A30(19)	B37	B65(14)		DR1404	
A31(19)	B38(16)	B67		DR15(2)	
A32(19)	B39(16)	B70		DR16(2)	
A33(19)	B3901	B71(70)		DR17(3)	
A34(10)	B3902	B72(70)		DR18(3)	
A36	B40	B73			
A43	B4005	B75(15)		DR51	
A66(10)	B41	B76(15)		DR52	
A68(28)	B42	B77(15)		DR53	
A69(28)	B44(12)	B78			
A74(19)	B45(12)	B81			
A80	B46	B82			
	B47				
	B48				
	B49(21)				
	B50(21)				

Abb. 1: Darstellung heute bekannter serologisch definierter HLA-Antigene (Tabelle) mit Beispielen für die Bezeichnung zugehöriger molekularbiologisch definierter Allele (umgebende Textfelder). HLA-Bw4 oder -Bw6 sind als besonders immunogene Epitope auf vielen HLA-Proteinen der Merkmalsgruppen HLA-A und HLA-B vorhanden (Zuordnung über Graustufen). Bei HLA-DR1 bis DR18 aufgrund genetischer Kopplung zusätzlich vorhandene HLA-Klasse-II-Proteine mit den Spezifitäten HLA-DR51, -DR52 oder -DR53 sind ebenfalls durch Zuordnung über Graustufen gekennzeichnet (erstellt nach "HLA-Dictionary 2008" (24)).

jeweils ein Gen für die α -Ketten von HLA-A, -B oder -C. Im Gegensatz zu den HLA-Klasse-I-Proteinen setzen sich die funktionell wichtigen Bestandteile der HLA-Klasse-II-Moleküle aus zwei etwa gleich großen Polypeptidketten, einer α -Kette mit geringer Variabilität und einer β -Kette mit hoher Variabilität zusammen. Sie werden in der MHC-Klasse-II-Genregion kodiert. Die Gene für die α -Ketten werden als HLA-DRA, -DQA oder -DPA, für die β -Ketten als HLA-DRB, -DQB und -DPB bezeichnet. Für HLA-Klasse-II-Proteine existieren mehrere α - und β -Ketten-Gene, die nicht in jedem Fall bei jedem Individuum vorhanden sein müssen. Die HLA-DR-Antigene DR1 bis DR18 (Abb. 1) enthalten eine konstante α -Kette und eine β -Kette vom Typ β_1 (der zugehörige Genort lautet DRB1). Die β_1 -Ketten weisen interindividuell eine sehr hohe Variabilität auf und bilden die Grundlage für die serologischen Spezifitäten HLA-DR1 bis DR18. Die Antigene HLA-DR51, DR52 oder DR53 enthalten statt der β_1 -Kette eine β_3 , β_3 - oder β_4 -Kette (die entsprechenden Gene

werden als DRB5, DRB3 oder DRB4 bezeichnet) und sind bei Vorliegen bestimmter Antigene DR1 bis DR18 durch genetische Kopplung zusätzlich vorhanden. Ein Individuum, welches beispielsweise HLA-DR4, DR7 oder DR9 trägt, ist durch die enge genetische Kopplung mit HLA-DRB4 Genen daher bis auf seltene Ausnahmen immer auch positiv für HLA-DR53.

Die molekularbiologische Charakterisierung der HLA-Antigene hat ergeben, dass jeweils eine serologische Spezifität durch mehrere molekularbiologische Subtypen repräsentiert ist. Für die serologische Spezifität HLA-A2 sind mittlerweile über 100 verschiedene molekularbiologische Subtypen mit unterschiedlichen Gensequenzen bekannt. Molekularbiologische Bezeichnungen für HLA-Allele werden im Gegensatz zu serologischen Bezeichnungen mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die ersten zwei Ziffern kodieren die serologische Merkmalsgruppe, während die 3. und 4. Ziffer die fortlaufende Allelnummer beinhalten. Beispielsweise ist HLA-A*0235 das Allel mit der Num-

mer 35 aus der serologischen Gruppe HLA-A2. Es hat sich eingebürgert, Unterschiede serologisch definierter HLA-Antigenspezifitäten als HLA-Antigenmismatches zu bezeichnen, während Unterschiede im molekularbiologischen Subtyp einer serologischen Spezifität als Allelmismatches bezeichnet werden.

Funktion der HLA-Proteine

Die wahrscheinlich wichtigste Funktion der HLA-Moleküle ist die Präsentation körpereigener oder körperfremder Antigene an T-Zellen. Körpereigene oder körperfremde Antigene werden intrazellulär in Peptide gespalten und in HLA-Moleküle eingelagert. HLA-Peptidkomplexe auf Zelloberflächen von Körperzellen (HLA-Klasse I) oder antigenpräsentierenden Zellen (HLA-Klasse II) werden von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor erkannt und lösen immunologische Folgereaktionen aus. Somit haben die HLA-Proteine eine wesentliche Funktion im Rahmen der spezifischen Antigenerkennung durch das Immunsystem.

HLA-Antigene sind starke Transplantationsantigene, eine Tatsache, die zu ihrer Entdeckung beigetragen hat. Sie werden daher als Haupt-Histokompatibilitätsantigene bezeichnet. Bei der Transplantation von Gewebe von einem Spender auf einen genetisch nicht identischen Empfänger wird das Gewebe vom Empfänger als fremd erkannt und durch immunologische Mechanismen zerstört. Die Stärke der Abstoßungsreaktion hängt in erster Linie davon ab, inwieweit sich Empfänger und Transplantat in den Gewebemerkmalen unterscheiden. Somit spielen HLA-Antigene eine zentrale Rolle bei der Definition des immunologischen „Selbst“ oder „Nicht-Selbst“ eines Organismus. Immunreaktionen gegen fremde HLA-Proteine haben eine zelluläre und eine humorale Komponente. Noch im Jahr 1990 glaubte man, dass, abgesehen von der hyperakuten Abstoßung bei präformierten HLA-Antikörpern, allein die T-Zellen für die immunologischen Abstoßungsvorgänge bei Rejektionen verantwortlich sind und Antikörper bei nicht vorimmunisierten Patienten keine Rolle spielen (11). HLA-Proteine sind jedoch bevorzugte Ziele auch der humoralen Immunität. Bedingt durch die Weiterentwicklung der HLA-Antikörperdiag-

nostik hin zu empfindlicheren und spezifischeren Methoden und letztendlich die Entdeckung der Folgeprodukte der Wirkung von HLA-Antikörpern in Form des Komplementabbauprodukts C4d in Nierentransplantatbiopsien durch Feucht et al. (12, 13) ist die Bedeutung der antikörpervermittelten Transplantatabstoßung nicht nur bei hyperakuten Abstoßungen, sondern auch bei akuten und chronischen Organabstoßungen weiter in den Vordergrund gerückt (14). Die vermehrte Bedeutung der antikörpervermittelten Immunität hat schließlich auch zu einer vermehrten Berücksichtigung der humoralen Abstoßung in der Banff-Klassifikation zur Beurteilung von renalen Biopsien (15, 16) geführt.

HLA-Antikörperdiagnostik

Das erste Testsystem, welches sich für die Erkennung und Spezifizierung von HLA-Antikörpern eignete, war der von Terasaki entwickelte Mikrolymphozytotoxizitätstests (LCT) (7), der auch heute noch breite Verwendung für die serologische HLA-Typisierung und für die HLA-Antikörperdiagnostik in jedem HLA-Labor findet. Die Reaktivität des Antikörpers mit der Zelle wird bei diesem Test nicht über die reine Bindung detektiert, sondern über die Funktion der Aktivierung von Komplement, welches dem Test zugesetzt wird. Zellgebundener Antikörper kann Komplement aktivieren und die Zielzelle wird abgetötet, was mit einer Farbstoffreaktion sichtbar gemacht werden kann. Die funktionelle Detektion der Antikörper über den Komplementaktivierungseffekt hat zur Folge, dass nur komplementbindende Antikörper der Immunglobulinklassen IgM, IgG1 und IgG3 erkannt werden können. Der LCT gilt heute noch als goldener Standard für die serologische HLA-Typisierung und HLA-Antikörperdiagnostik. Mit sehr geringen Materialmengen ist es möglich, ein unbekanntes Antiserum gegen viele Testlymphozyten mit bekannten HLA-Merkmalen zur Erkennung der HLA-Antikörperspezifität auszutesten. Die Verwendung der LCT-Technik ist zwingend vorgeschrieben bei der Durchführung des lymphozytären Crossmatch vor Nierentransplantation, da LCT-reaktiven „zytotoxischen“ HLA-Antikörpern auch heute noch die größte Relevanz für Abstoßungsreak-

tionen bei Transplantationen zugesprochen wird (17).

Bedingt durch den funktionellen Detektionsmechanismus ist der Antikörpernachweis mittels LCT-Technik relativ unempfindlich. Als Zielzellen werden Lymphozyten verwendet, die neben einer Kombination von HLA-Antigenen des Spenders auch andere antigene Strukturen enthalten. Für die Spezifizierung von HLA-Antikörpern sind aufgrund der Vielzahl der bekannten HLA-Merkmale große Zellpanel erforderlich. Der Nachweis von HLA-Klasse-II-Antikörpern mit LCT-Technik ist erschwert, da sich HLA-Klasse-II-Merkmale im peripheren Blut auf B-Lymphozyten finden, die sehr instabil sind und häufig nur eine geringe HLA-Klasse-II-Expression aufweisen.

Es gibt humorale Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen, bei denen keine zytotoxischen HLA-Antikörper nachgewiesen wurden oder das lymphozytäre Crossmatch negativ war. Dies hat die Weiterentwicklung von empfindlicheren Tests für den Nachweis von HLA-Antikörpern vorangetrieben. Sie werden unter dem Oberbegriff „Ligandenbindungstests“ zusammengefasst. Nachgewiesen wird bei diesen Tests nicht die komplementaktivierende Eigenschaft des gebundenen Antikörpers, sondern seine reine Bindung an die Zielstruktur HLA. Im Wesentlichen stehen zwei Testsysteme zur Verfügung, HLA-Antikörper-spezifische ELISA-Tests und Partikel-basierte Immunoassays, die über eine durchflusszytometrische Analyse ausgewertet werden (18). Die in den Testsystemen verwendeten HLA-Antigene werden entweder aus Zellmaterial als Antigenmische gewonnen oder können auch rekombinant hergestellt werden. In erster Linie werden HLA-Antikörper vom Typ IgG detektiert, denen die größte Relevanz im Rahmen von Transplantationen zugesprochen wird. Der Nachweis ist für Antikörper gegen HLA-Klasse I und -Klasse II gesondert möglich. Die HLA-Spezifizierung der Antikörper innerhalb der HLA-Klassen ist mit sehr guter Reproduzierbarkeit möglich. Die Partikel-basierten Systeme bieten weiter den Vorteil, dass Beadarrays mit HLA-Einzelantigenen zur Verfügung stehen, mit denen man HLA-Antikörper nicht wie bisher gegen HLA-Antigenkombinationen, sondern gegen eine Vielzahl einzelner HLA-Allele testen und so eine viel genauere

Spezifizierung als bisher erreichen kann. Mittlerweile können mit den Testsystemen auch HLA-Kreuzproben durchgeführt werden. Sie werden in der Reihenfolge LCT, ELISA, Durchflusszytometrie, Partikelimmunoassay immer empfindlicher.

Nachteile der Ligandenbindungsassays sind neben den hohen Kosten möglicherweise die hohe Empfindlichkeit des Antikörpernachweises. Im Vergleich zur LCT-Technik werden je nach Testsystem bei bis zu 20-50% mehr Patienten HLA-Antikörper gefunden. Hier stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz der im Vergleich zum LCT zusätzlich detektierten Antikörper. Süsal und Opelz untersuchten in 2002 (19) transplantierte Patienten mit negativem LCT-Antikörperscreening und LCT-Crossmatch nachträglich im ELISA. Patienten mit positiven HLA-Klasse I- und Klasse II-Antikörpersuchtests zeigten ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben über 2 Jahre. Der negative Effekt auf das Transplantatüberleben konnte durch die Zuordnung von gut HLA-verträglichen Transplantaten aufgehoben werden. Auch der umgekehrte Fall, bei dem HLA-Antikörper-ELISAs negativ waren, aber im LCT eine Panelreaktivität von über 30 % bestand, zog ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben nach sich. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass der kombinierte Einsatz von LCT und HLA-Antikörper-ELISA-Tests bei Transplantationen sinnvoll ist.

Zur Relevanz von HLA-Antikörpern bei Transplantationen, die lediglich im Partikel-Immunoassay (Luminex-System), nicht aber in LCT-basierten Tests nachweisbar sind, gibt es zwei aktuelle Studien. Billen et al. (20) konnten zeigen, dass die 5-Jahres-Transplantat-Überlebensrate bei isoliert positivem HLA-Klasse-I-Luminex Crossmatch um ca. 30% niedriger ausfiel. Amico et al. (21) fanden bei LCT-Crossmatch-negativen Patienten mit donor-spezifischen HLA-Antikörpern (DSA) im Luminex eine um etwa 50% höhere Rate an Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktionen, die gleichzeitig eine um 20% geringere 5-Jahres-Transplantat-überlebensrate aufwies. Auf der anderen Seite jedoch hatten etwa die Hälfte der DSA-positiven Patienten keine Antikörper-vermittelten Rejektionsepisoden und eine normale Transplantat-überlebensrate. Die Daten zeigen, dass sich für die mit den neuen Methoden

nachgewiesenen Antikörper statistisch eine klinische Relevanz abzeichnet. Andererseits sind die Ergebnisse vorsichtig zu bewerten, wenn es um die Vorhersage von negativen Ereignissen wie akute Abstoßungsreaktionen oder Risiko eines Transplantatverlusts für den Patienten geht. Dies kann zur möglicherweise ungerechtfertigten Ablehnung von Organangeboten führen. Der große Wert der neuen Verfahren zur HLA-Antikörperdiagnostik liegt momentan vor allem in der Abklärung von unklaren Befunden der LCT-Diagnostik und der Überlegenheit der Methodik für die Spezifizierung von HLA-Antikörpern. Die neue Methodik erlaubt den sicheren Nachweis von Antikörpern auch gegen HLA-C, HLA-DQ und -DP, was bisher nur mit hohem Aufwand möglich war. Weiterhin können Antikörper gegen bestimmte molekularbiologische Subtypen von HLA-Merkmalen („allelspezifische Antikörper“) detektiert werden. Auf diese Weise können einzelne Epitope auf HLA-Antigenen bestimmt werden, gegen die sich die Antikörperspezifität richtet.

HLA-Diagnostik vor Nierentransplantation

Der Umfang der immunologischen Verträglichkeitsdiagnostik vor Nierentransplantation in Deutschland ist über Regularien von Eurotransplant (ET) und die Richtlinien zur Organtransplantation der Bundesärztekammer verbindlich festgelegt und soll hier kurz dargestellt werden. Mit der Eurotransplant-Stiftung bestehen Kooperationsverträge für die Vermittlung von Organen verstorbener Spender aus dem ET-Raum. ET gibt ein Handbuch heraus, welches ein eigenes Kapitel über den Umfang der Histokompatibilitätstestung vor Transplantationen enthält (22). Die Regeln sind in wesentlichen Teilen in die Richtlinien der deutschen Bundesärztekammer für die Organtransplantation (23) übernommen worden. Sie haben für Deutschland Gesetzescharakter.

Die immunologische Evaluierung von Organempfängern vor Nierentransplantation umfasst eine Typisierung mindestens der HLA-A, -B, und -DR-Antigene sowie eine Untersuchung auf transplantationsrelevante Antikörper. Sie sollte nach ET-Handbuch auch die Typisierung von HLA-C und HLA-DQ bein-

halten. Die Antikörperdiagnostik umfasst eine Untersuchung auf HLA-spezifische Antikörper mit dem Lymphozytotoxizitätstest (LCT) oder einer Methode mit mindestens vergleichbarer Sensitivität. Der LCT ist jedoch mindestens einmal pro Jahr als Methode einzusetzen. Das Serum wird gegen ein Panel von mindestens 50 verschiedenen Zellen oder HLA-Antigenkombinationen getestet und das Ergebnis als prozentuale Panelreaktivität (PRA-Wert) angegeben. Als Zellmaterial sollen vorzugsweise ungetrennte mononukleäre Zellen aus peripherem Blut, also ein Gemisch aus B- und T-Lymphozyten und einem geringen Teil an Monozyten verwendet werden. Bei positivem LCT ist zusätzlich ein Ansatz mit Dithiotreitol (DTT) durchzuführen. DTT inaktiviert Antikörper vom Typ IgM und ermöglicht die Erkennung von unterliegenden hochaffinen Antikörpern vom Subtyp IgG1 oder IgG3. Lymphozytäre Autoantikörper sind meist vom IgM-Typ und haben i.d.R. keine Relevanz für die Transplantation. Sie verursachen jedoch ein positives Crossmatch und sollen daher möglichst im Vorfeld erkannt werden. Bei Nachweis von Antikörpern gegen HLA-Merkmale ist die Spezifizierung erforderlich. Die Untersuchung auf HLA-Antikörper soll alle 3 Monate wiederholt werden, um Neuimmunisierungen oder Änderungen im Verlauf erkennen zu können. Patienten, für die das Datum des letzten Antikörperscreenings mehr als 150 Tage zurückliegt, bekommen nach ET-Regeln keine Organe zugeordnet. Nach Immunisierungsereignissen (Schwangerschaften, Transfusionen, Transplantationen) oder bei Funktionsverlust bzw. Entfernung eines Transplantats sollte lt. Richtlinien im Abstand von 2 und 4 Wochen ein HLA-Antikörperscreening durchgeführt werden. HLA-Antikörperspezifitäten sind an ET zu übermitteln und führen zum Ausschluss von Organangeboten mit HLA-Merkmalen, gegen die sich der Patient immunisiert hat. Die Serien des quartalsweisen Antikörperscreenings werden für die lymphozytären Kreuzproben bei Organangeboten verwendet. Das Gewebetypisierungslabor organisiert quartalsweise den Versand von Serumproben aller Patienten an die Regionallabore der Koordinierungsstelle sowie den Versand von Serumproben immunisierter Patienten an alle ET-Labore der Länder des ET-Verbunds.

Die immunologische Evaluierung von verstorbenen Organspendern umfasst ebenfalls die Typisierung der HLA-A, -B, und -DR-Merkmale, vorzugsweise auch der HLA-C- und DQ-Merkmale. Weiterhin ist eine lymphozytäre Kreuzprobe mittels LCT-Technik mit dem Serum des Empfängers und ungetrennten mononukleären Zellen aus peripherem Blut, Milz- oder Lymphknotengewebe des Spenders vorgeschrieben. Sind bei dem Empfänger lymphozytäre Autoantikörper vorbekannt, ist die Kreuzprobe zusätzlich mit DTT durchzuführen. Bei vorimmunisierten Patienten ist eine erweiterte Kreuzprobendiagnostik zur Erhöhung der Empfindlichkeit des Antikörpernachweises vorgeschrieben. Sie erfolgt z.B. als Kreuzprobenansatz getrennt mit B- und T-Lymphozyten. Sofern vorhanden werden weitere Serumproben von Zeitpunkten, an denen das Serum eine besonders hohe Reaktivität gegen HLA gezeigt hatte („Peak-Serum“) oder Seren nach immunisierenden Ereignissen für den Kreuztest verwendet. Die Feststellung und Mitteilung immunisierender Ereignisse sowie die Bereitstellung von aktuellem Serum mehr als 14 Tage nach diesem Ereignis obliegt dem behandelnden Arzt. Eine positive Kreuzprobe im LCT mit ungetrennten oder T-Lymphozyten des Spenders stellt nach wie vor eine Kontraindikation zur Transplantation dar. Ein positives Crossmatch, welches auf eine Reaktivität des Serums gegen B-Lymphozyten zurückgeführt werden kann, stellt keine absolute Kontraindikation zur Transplantation dar, und es muss eine individuelle Risikoeinschätzung für oder gegen die Transplantation erfolgen. Für Empfänger mit bekannten nicht-HLA-spezifischen lymphozytären Autoantikörpern muss zusätzlich ein Crossmatch mit DTT-Zusatz erfolgen.

Zusammenfassung

Wesentliche Neuerungen bei der Kompatibilitätsdiagnostik vor Nierentransplantationen haben sich vor allem bei der Diagnostik HLA-spezifischer Antikörper ergeben. Trotz der Verfügbarkeit dieser Methoden ist nach gültigen Richtlinien der Lymphozytotoxizitätstest nach wie vor der Goldstandard für die Kreuzproben- und Antikörperdiagnostik vor Nierentransplantationen. Die klinische Relevanz der mit den neuen Methoden nachweisbaren Antikörper

für das Outcome ist zzt. in der fortgeschrittenen Evaluationsphase. ELISA- oder Partikelimmunoassays sind jetzt schon unverzichtbar, wenn es um die Abklärung unklarer Befunde im LCT geht und wenn eine genaue HLA-Antikörperspezifisierung benötigt wird. Die neuen Methoden ermöglichen erstmals eine einfache Diagnostik auch von Antikörpern gegen HLA-C, HLA-DQ und HLA-DP sowie eine Erkennung von HLA-allelspezifischen Antikörpern und schaffen es so, ein komplettes Bild der humoralen Immunisierung eines Patienten gegen HLA zu vermitteln. Zur Erhöhung der Sicherheit sollten sie regulär bei Lebendtransplantationen zum Einsatz kommen. Das Acceptable Mismatch-Programm von Eurotransplant nutzt die Methoden u.a. mit Erfolg zur Definition von akzeptablen HLA-Antigenen bei hochimmunisierten Patienten, die ganz besonders von der Zuordnung eines HLA-kompatiblen Organs profitieren.

Auch im Zeitalter einer modernen Immunsuppression ist die Beachtung der HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger bei der Nierentransplantation wichtig, um das immunologische Abstoßungsrisiko nach Transplantation langfristig gering zu halten. Eine gute HLA-Verträglichkeit vermindert das Risiko für eine humorale Immunisierung und sorgt dafür, dass der Anteil vorimmunisierter Patienten auf unseren Wartelisten gering gehalten wird.

Literatur

1. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR (1956) Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* 160 (4): 277-282
2. Dausset J (1958) Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol* 20 (1-4): 156-166
3. Patel R, Terasaki PI (1969) Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 280 (14): 735-739
4. Dragun D (2008) Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation* 86 (8): 1019-1025
5. Opelz G, Dohler B (2007) Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. *Transplantation* 84 (2): 137-143
6. Su X, Zenios SA, Chakkera H, Milford EL, Chertow GM (2004) Diminishing significance of HLA matching in kidney transplantation. *Am J Transplant* 4 (9): 1501-1508
7. Terasaki PI, McClelland JD (1964) Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature* 204: 998-1000
8. Faull RJ, Starr RJ, Russ GR (1989) Vascular endothelial cell expression of adhesion molecules and HLA antigens in renal allografts. *Transplant Proc* 21 (1 Pt 1): 316-317

9. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK (2003) Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol* 14 (5): 1336-1348
10. Muczynski KA, Cotner T, Anderson SK (2001) Unusual expression of human lymphocyte antigen class II in normal renal microvascular endothelium. *Kidney Int* 59 (2): 488-497
11. Colvin RB (1990) Cellular and molecular mechanisms of allograft rejection. *Annu Rev Med* 41: 361-375
12. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G et al. (1993) Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 43 (6): 1333-1338
13. Feucht HE (2003) Complement C4d in graft capillaries – the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 3 (6): 646-652
14. Terasaki PI (2003) Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 3 (6): 665-673
15. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T et al. (1999) The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55 (2): 713-723
16. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE et al. (2007) Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7 (3): 518-526
17. Claas FHHJ, Doxiadis IIN (2009) Human leukocyte antigen antibody detection and kidney allocation within Eurotransplant. *Human Immunology* 70 (8): 636-639
18. Tait BD (2009) Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 21 (5): 573-577
19. Susal C, Opelz G (2002) Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 73 (8): 1269-1273
20. Billen EV, Christiaans MH, van den Berg-Loonen EM (2009) Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches: data from 165 renal transplants. *Tissue Antigens* 74 (3): 205-212
21. Amico P, Honger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S (2009) Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation* 87 (11): 1681-1688
22. Eurotransplant Foundation. Histocompatibility testing. *Eurotransplant Manual 2009; Chapter 10: www.eurotransplant.nl*
23. Deutsche Bundesärztekammer. Richtlinie zur medizinischen Beurteilung von Organspendern und zur Konservierung von Spenderorganen gemäß § 16 Abs. 1 S.1 Nr. 4 a) und b) TPG. 2005: www.bundesärztekammer.de
24. Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Nooren HJ, Kempenich JH et al. (2009) The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue Antigens* 73 (2): 95-170

Dr. Reinhard Kelsch
Institut für Transfusionsmedizin und
Transplantationsimmunologie
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 11
48149 Münster
kelsch@uni-muenster.de