

Aktueller Stand der Transplantationsimmunologischen Diagnostik

PD Dr. med. Joannis Mytilineos
Prof. Dr. med. Christian Seidl
Dr. med. Gerd Holzberger
Dr. med. Xuan Duc Nguyen
Prof. Dr. med. Dorothee Wernet

Aktuelles zur Diagnostik und Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie

Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier
Dr. med. Britta Höchsmann
Dr. med. Sixten Körper
Prof. Dr. med. Jörg Schubert

In aller Kürze: Was ist neu (bzw. wichtig) in den neuen Richtlinien?

Jürgen Burkhart
Dr. med. Detlev Nagl

Die „Biobank der Blutspender“ – eine Initiative des BRK-Blutspendedienstes

Dr. Silke Martin
Dr. Stephan Rapp
Dr. med. Franz Weinauer

Deutsches Rotes Kreuz
DRK-Blutspendedienste





Impressum

Herausgeber:

Für die DRK-Blutspendedienste
Prof. Dr. med. Erhard Seifried,
Sandhofstr. 1,
60528 Frankfurt/M.

beteiligte und für die Regionalteile zuständige Blutspendedienste:

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg -
Hessen gGmbH, Mannheim

Blutspendedienst des Bayerischen
Roten Kreuzes, München

DRK-Blutspendedienst
Mecklenburg-Vorpommern gGmbH,
Neubrandenburg

DRK Blutspendedienst Nord gGmbH,
Lütjensee

Blutspendedienst der Landesverbände
des DRK Niedersachsen, Sachsen-
Anhalt, Thüringen, Oldenburg und
Bremen gGmbH, Springe

DRK-Blutspendedienst Ost gGmbH,
Dresden

DRK-Blutspendedienst West gGmbH,
Ratingsen

Redaktion (verantwortlich):

Dr. Detlev Nagl, Augsburg
Friedrich-Ernst Düppe, Hagen
Feithstraße 182, 58097 Hagen
Tel.: 0 23 31 / 8 07 - 0
Fax: 0 23 31 / 88 13 26
Email: f.dueppe@bsdwest.de

Redaktion:

Dr. Jürgen Erler, Baden-Baden;
Dr. Robert Deitenbeck, Hagen;
Ursula Lassen, Springe;
Jens Lichte, Lütjensee;
Dr. Markus M. Müller, Frankfurt/M.;
Dr. Detlev Nagl, Augsburg;
Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier, Ulm;
Prof. Dr. Sybille Wegener, Rostock.

Mit Autorennamen gekennzeichnete
Fachartikel geben die Meinung des
Autors wieder und müssen nicht
unbedingt die Meinung der Redaktion
und der Herausgeber widerspiegeln.
Der Herausgeber der „hämotherapie“
haftet nicht für die Inhalte der Fach-
autoren. Die Fachinformationen entbin-
den den behandelnden Arzt nicht, sich
weiterführend zu informieren.

Realisation:

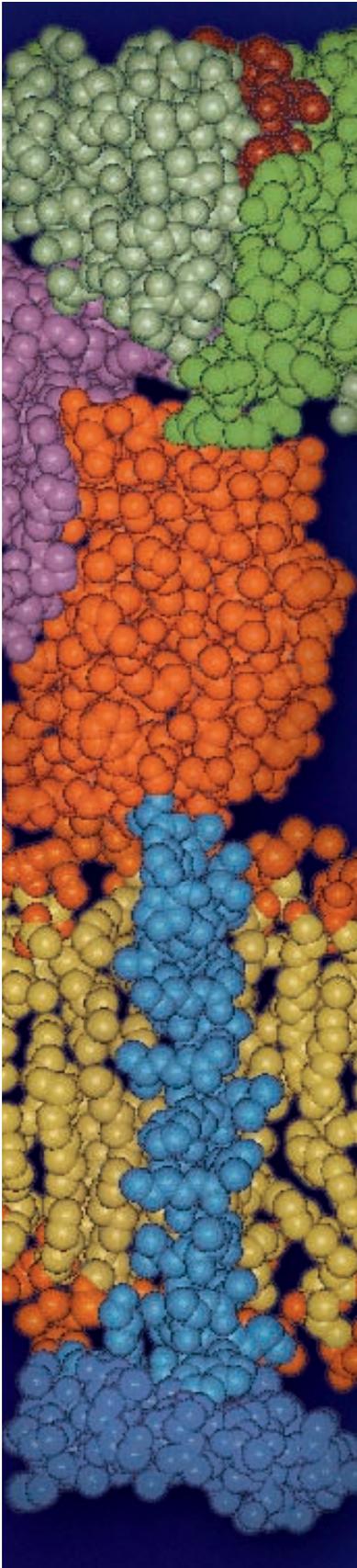
concept-design GmbH & Co. KG
deltacity.NET GmbH & Co. KG
SIGMA-DRUCK GmbH
www.deltacity.net

Auflagen:

Gesamtauflage: 32.000 Ex.
ISSN-Angaben auf der Rückseite

Zitierweise:

hämotherapie, 8/2006, Seite ...



Inhalt

Editorial 8/2006

Friedrich-Ernst Düppe

3

Aktueller Stand der Transplantationsimmunologischen Diagnostik

PD Dr. med. Joannis Mytilineos, Prof. Dr. med. Christian Seidl,
Dr. med. Gerd Holzberger, Dr. med. Xuan Duc Nguyen
Prof. Dr. med. Dorothee Wernet

4-16

Aktuelles zur Diagnostik und Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie

Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier, Dr. med. Britta Höchsmann
Dr. med. Sixten Körper, Prof. Dr. med. Jörg Schubert

17-26

++ REGIO-NEWS ++REGIO-NEWS ++REGIO-NEWS ++

In aller Kürze:

Was ist neu (bzw. wichtig) in den neuen Richtlinien?

Jürgen Burkhardt, Dr. med. Detlev Nagl

27-28

Die „Biobank der Blutspender“ – eine Initiative des BRK-Blutspendedienstes

Dr. Silke Martin, Dr. Stephan Rapp, Dr. med. Franz Weinauer

29-33

Forschungspreis für neue Erkenntnisse zu Krebstherapien mit Immunzellen

34-35

Alfred Nobel und die Preisträger

35-36

Leserbriefe

37-38

Antworten auf Fragen aus der Leserschaft

Seminare

39-41

Die Autoren

42-43



Sehr geehrte Leserin, sehr geehrter Leser,

Sie halten heute die achte Ausgabe unserer Zeitschrift „**hämotherapie – Beiträge zur Transfusionsmedizin**“ in Händen. Seit 2003 haben die DRK-Blutspendedienste gemeinsam auf über 300 Druckseiten für Sie aktuelle Informationen aus der Transfusionsmedizin aufbereitet. Alle an der Entstehung dieser Hefte Beteiligten freuen sich über das große Interesse, das wir mit den bisherigen Ausgaben und hoffentlich auch dem aktuellen Heft gefunden haben.

Die Herausgabe von acht Heften ist noch kein Grund, ein Jubiläum zu feiern, aber die Höhe der Druckauflage, je Ausgabe über 30.000 Exemplare, und die große Zahl an Downloads, die wir bislang registriert haben, verdeutlichen Ihr großes Interesse und sind Anlass für uns Danke zu sagen.

Wir danken Ihnen für Ihr Interesse, für Ihre Anregungen und Kritik und für Ihre Fragen, die wir redaktionell oder auch persönlich beantworten konnten. Der Kontakt mit Ihnen hilft uns bei der Planung der Themen zukünftiger Hefte. Senden Sie uns deshalb bitte auch zukünftig Ihre Fragen und Anregungen, wir gehen gerne darauf ein.

Im Jahr 2007 blicken die DRK-Blutspendedienste auf 55 Jahre Blutspende beim Roten Kreuz in Deutschland zurück. In dieser Zeit hat sich vieles verändert. Mit

den Beiträgen in unseren Heften geben wir einen kleinen Einblick in die aktuellen Entwicklungen der Hämotherapie. In den 55 Jahren Blutspende beim DRK ist aber eines geblieben: die Sicherstellung der Versorgung mit Blutpräparaten und Dienstleistungen rund um die Uhr an 365 Tagen im Jahr durch die DRK-Blutspendedienste. Über 3,8 Mio. mal jährlich vertrauen uns Menschen in Deutschland eine Spende ihres Lebenssaftes an. Dahinter steckt der immer wieder zum Ausdruck gebrachte Wille der Spenderinnen und Spender, kranken und verletzten Menschen helfen zu wollen. Darin ist nicht nur die Motivation für die Spender/innen zu sehen, sondern auch die Verpflichtung für uns, sorgfältig und nach den neuesten Kenntnissen von Wissenschaft und Technik mit dem gespendeten Blut umzugehen.

Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der DRK-Blutspendedienste sind sich dieser großen Verpflichtung bewusst, egal ob sie in der Forschung und Entwicklung, in der Tagesroutine von Herstellung und Präparation oder im Bereich der Service-Dienstleistungen tätig sind. Die Arbeit beim DRK-Blutspendedienst ist eine Arbeit für die Menschen, die auf Blutpräparate angewiesen sind.

Unter diesem Gesichtspunkt sind auch die Beiträge des vorliegenden Heftes zu sehen, die sich auf unterschiedlichem

Gebiet mit der Entwicklung von Therapie und Diagnostik in der Transfusionsmedizin beschäftigen. Wir wünschen Ihnen eine spannende Lektüre und hoffen – wie immer – auf Ihre Rückmeldungen und Fragen, die wir gerne beantworten. Im Namen der gesamten Redaktion grüßt Sie herzlich Ihr


Friedrich-Ernst Düppe

Pressesprecher

DRK-Blutspendedienst West

Feithstraße 182

58097 Hagen

f.dueppe@bsdwest.de



Aktueller Stand der Transplantationsimmunologischen Diagnostik

4

PD Dr. med. Joannis Mytilineos

Institut für Klinische Transfusionsmedizin
und Immunogenetik – Ulm

Prof. Dr. med. Christian Seidl

Institut für Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie – Frankfurt

Dr. med. Gerd Holzberger

Institut für Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie – Kassel

Dr. med. Xuan Duc Nguyen

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und
Immunologie – Mannheim

Prof. Dr. med. Dorothee Wernet

Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin
– Tübingen

Die Transplantationsmedizin ist heute ein nicht wegzudenkender Teil der modernen klinischen Versorgung. Eine fachlich und methodisch kompetente Labordiagnostik in diesem Feld ist von großer Bedeutung. Dieser Übersichtsartikel befasst sich mit aktuellen Aspekten der transplantationsimmunologischen Diagnostik. Molekularbiologische Verfahren dominieren zurzeit dieses Gebiet. Serologische Techniken sind jedoch nach wie vor erforderlich, um die humoralen Aspekte der Histokompatibilitätsdiagnostik abzudecken. Organ- und Stammzelltransplantation sind die Hauptdomänen der HLA-Diagnostik. Bei Krankheitsassoziationsstudien, in der Thrombozytensubstitutionsdiagnostik sowie in der Abstammungsbegutachtung werden jedoch weiterhin HLA-Testungen angefordert.

Transplantation medicine is one of the most important fields in modern clinical care. Appropriate laboratory service support in this area is therefore absolutely indispensable. This review describes the current state of the art diagnostics in immunogenetics and histocompatibility. In the last ten years molecular methods have been increasingly applied for HLA typing purposes although serological techniques are still being widely used, predominantly for humoral compatibility testing in organ transplantation. The main clinical applications for HLA-typing are organ and stem cell transplantation, however, platelet transfusion, disease association testing as well as forensics are still a part of the routine work in clinical HLA-laboratories.

Einleitung

Mehrere tausend Patienten verdanken ihr Leben den Erfolgen der modernen Transplantationsmedizin. Die Transplantation wurde zum lebensnotwendigen Therapieverfahren bei diversen Erkrankungen, die andernfalls für den Patienten den sicheren Tod bedeutet hätten. Im vergangenen Jahr wurden in der Bundesrepublik Deutschland 1.974 Nieren-, 355 Herz-, 779 Leber-, sowie insgesamt 400 Pankreas-, Lungen- und Dünndarm-Transplantationen durchgeführt (http://www.dso.de/main_bottom.html). Außerdem wurden insgesamt 2.615 autologe und 2.060 allogene hämatopoietische Stammzelltransplantationen vorgenommen (DRST-Jahresbericht, <http://www.drst.de/download/jb2005.pdf>). Zu den Erfolgen der Transplantationsmedizin hat die Entwicklung der modernen Immunologie und Immunogenetik einen wesentlichen Beitrag geleistet. Bundesweit gibt es mehrere Laboratorien, die heutzutage transplantationsimmunologische Diagnostik betreiben. 47 davon sind von der European Federation for Immunogenetics (EFI) akkreditiert.

Methodologie im transplantationsimmunologischen Labor

Die Diagnostik in der Transplantationsimmunologie hat sich seit der ersten Entdeckung der HLA-Merkmale durch Jean Dausset im Jahr 1958 stark weiterentwickelt. Hat man in den ersten Jahren ausschließlich mit serologischen Verfahren gearbeitet, so ist die klassische Serologie heutzutage in den Hintergrund getreten. Dafür werden zunehmend immer komplexere molekularbiologische Typisierungsverfahren eingesetzt. Der Durchbruch der molekularbiologischen Typisierung gelang Anfang der 90er Jahre. Zudem konnte eindeutig gezeigt werden, dass die molekularbiologischen Verfahren der konventionellen Serologie überlegen waren (Mytilineos et al., Tissue Antigens 1997, 50: 355-358). Inzwischen wird der überwiegende Anteil der HLA-Diagnostik mit molekularbiologischen Verfahren durchgeführt.

Bei der zeitgemäßen HLA-Typisierungsdiagnostik unterscheidet man zwei Ebenen der Auflösung: Eine niedrigauflösende HLA-Typisierung liegt dann vor, wenn nur die ersten zwei Ziffern der vierstelligen Zahl, aus der die

Bezeichnung eines HLA-Allels besteht (**Abbildung 1**), berichtet wird. Diese entspricht auch im weitesten Sinne der Nomenklatur, wie sie bisher für die Serologie eingesetzt wurde (z. B. serologisch HLA-A2, niedrigauflösend molekularbiologisch: HLA*02). Eine hochauflösende Typisierung liegt dann vor, wenn alle vier Ziffern, aus denen ein HLA-Allel besteht, be-

richtet werden (z. B. niedrige Auflösung: HLA-A*02, hohe Auflösung: HLA-A*0201). Je nach klinischer Notwendigkeit wird eine Typisierung niedrig- oder hochauflösend durchgeführt. Im Prinzip kann man sagen, dass für die SZ-Transplantation von nicht verwandten Spendern eher eine hochauflösende Typisierung erforderlich ist, während für alle anderen

Anwendungen eine niedrigauflösende Typisierung ausreichend ist.

Serologische Diagnostik

Das serologische Typisierungsverfahren heißt Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT). Bei diesem Test werden Lymphozyten zuerst



Abbildung 1

Die aktuelle Nomenklatur für die Faktoren des HLA-Systems (Marsh SGE et al., Tissue Antigens 2005, 65:301-368) sieht folgende Regeln vor:

- Bei der Benennung eines HLA-Antigens/Allels muss am Anfang immer das Wort „HLA“ stehen: **HLA**
- Es folgt der Name des Genortes oder des untersuchten Genproduktes, der vom Wort „HLA“ durch einen Bindestrich getrennt wird: **HLA-A**
- Wenn eine molekulargenetische Testung erfolgte, dann wird dies durch ein „*“-Zeichen signalisiert. Wenn nur das Genprodukt auf der Zelloberfläche getestet wurde (serologisch oder biochemisch), dann wird das Zeichen „*“ nicht aufgeführt: **HLA-A*** bzw. **HLA-A**
- Es folgt eine zweistellige Ziffer, die die „grobe“ Antigengruppe wiedergibt. Diese Gruppe kann sowohl molekularbiologisch als auch serologisch getestet werden (niedrige Auflösung): **HLA-A*29** bzw. **HLA-A29**
- Es folgen zwei weitere Ziffern, die spezifisch für jedes Allel sind. Diese Ziffern werden vom Nomenklaturkomitee nach der Reihenfolge der Entdeckung innerhalb einer Allelgruppe vergeben (hohe Auflösung). Das erste entdeckte Allel der Allelgruppe A*29, heißt demnach: **HLA-A*2901**
- Stumme Mutationen, also solche, die auf Nukleotidsequenzunterschiede hinweisen, die keine unterschiedliche Aminosäuresequenz bewirken, werden durch zwei weitere sequentielle Ziffern wiedergegeben. Demnach unterscheidet sich A*2901 01 von A*2901 02 in dessen Nukleotidsequenz. Die Aminosäuresequenz beider Allele ist jedoch identisch: **HLA-A*2901 01**
- Es folgt eine Ziffer für Polymorphismen innerhalb des Introns oder der regulatorischen Bereiche: **HLA-A*2901 01 02**
- Gelegentlich wird ein Buchstabe (N, S oder L) am Ende eines Allels eingefügt. Ein N bedeutet, dass das Genprodukt nicht exprimiert wird („Null“-Allel), ein S dass es nur in löslicher Form (Soluble) vorkommt und ein L, dass es eine niedrige (Low) Expression aufweist: **HLA-A*2901 01 02 N**



mit Antiseren und dann mit Komplement inkubiert. Finden die im Serum enthaltenen Antikörper ein entsprechendes Histokompatibilitätsantigen auf der Zelloberfläche der Lymphozyten, so binden sie dort. Dadurch wird Komplement aktiviert. Die im letzten Teil der Komplementkaskade auftretenden lytischen Produkte können die Zellmembran der Lymphozyten durchbohren. Es kommt zur Lyse der Zellen. Die Lyse der Lymphozyten kann durch Zugabe eines Vitalfarbstoffes wie Eosin sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff dringt in lysierte Zellen ein und färbt sie an, während er von intakten Zellen nicht aufgenommen wird. Abschließend wird mikroskopisch abgelesen, ob die Lymphozyten durch die verschiedenen Antiseren lysiert sind. Dabei beurteilt man, wie viel Prozent der Zellen in einer Kavität lysiert und wie viele intakt geblieben sind. Bei über 20 % lysierten Zellen zählt die Reaktion als positiv. Je nach Reaktionsmuster der Antiseren wird der HLA-Typ der Testperson festgelegt. Das serologische Verfahren wird gegenwärtig nur noch für die Bestimmung von HLA-Klasse I-Merkmalen eingesetzt.

Darüber hinaus wird der LCT auch für das lymphozytotoxische Antikörper-Screening sowie bei dem Crossmatch eingesetzt. Beim Ak-Screening wird das Serum des Patienten mit einer Reihe von HLA-typisierten „Panel“-Zellen inkubiert. In der Regel werden 30 bis 60 verschiedene Zellen eingesetzt. Die weiteren methodischen Schritte sind identisch wie bei der serologischen Typisierung. Aufgrund der Reaktivität mit den einzelnen Panel-Zellen, kann man den Prozentsatz positiv reagierender Panel-Zellen ermitteln. Dies ergibt den so genannten „PRA“-Wert (= Panel Reaktive Antikörper). Eine Spezifizierung erfolgt durch die Analyse der einzelnen Reaktionen. Aufgrund der Komplexität des Polymorphismus im HLA-System wird in der Regel hierfür eine Computersoftware benötigt. Wenn man die Antikörperklasse (IgG- oder IgM-Antikörper) differenzieren möchte, wird das Screening unter Zugabe von Dithiotreitol (DTT) wiederholt. DTT spaltet die Disulfidbrücken des IgM-Moleküls und inaktiviert somit IgM-Antikörper. Diese werden in der Transplantationsmedizin häufig als irrelevante Autoantikörper angesehen und deren Präsenz ist oft für die Interpretation des Antikörperstatus eines Patienten entscheidend.

Beim lymphozytotoxischen Crossmatch testet man das Serum des Patienten gegen Spenderlymphozyten, die entweder aus dem peripheren Blut oder aus Milz bzw. Lymphknoten des Spenders stammen. Komplementzugabe, Färbung und Ablesung sind identisch wie bei der Typisierung bzw. dem Ak-Screening. DTT-Zugabe kann auch hier zwischen IgG- und IgM-Antikörpern differenzieren. Als Zielzellen können ungetrennte Lymphozyten, bzw. getrennten T- und B-Lymphozyten aus peripherem Blut bzw. Milz eingesetzt werden. Bei nichtimmunisierten Patienten gilt der Crossmatch mit ungetrennten Zellen als klinisch relevant. Bei immunisierten oder retransplantierten Patienten wird jedoch dem B-Zell-Crossmatch eine größere Bedeutung beigemessen.

ELISA und weiteren alternativen Verfahren zum Ak-Screening

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass neben dem klassischen lymphozytotoxischen Ak-Screening (LCT) auch weitere Verfahren eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung von transplantationsrelevanten Antikörpern spielen. Von Süsal et al. wurde berichtet, dass bei Nierenempfän-



gern, die Antikörper gegen HLA-Klasse I- und II- Merkmale mittels ELISA aufweisen, ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben beobachtet werden kann als bei Patienten, die keine Antikörper bzw. nur Antikörper gegen eine der beide Merkmalsklassen tragen (Susal et al., Transplantation 2002, 73:1269-1273). ELISA-Techniken sind empfindlicher als der lymphozytotoxischer Test, allerdings scheint letzterer wiederum Antikörper zu detektieren, die von ELISA nicht erfasst werden und trotzdem transplantationsrelevant sind (Opelz, Lancet 2005, 365:1570-1576). Aus diesen Gründen wird empfohlen, dass beim Nierentransplantationscreening sowohl der LCT als auch der ELISA-Screening mindestens einmal jährlich parallel durchgeführt werden sollen. Anstatt des ELISA können auch weitere „Solid-phase“ Assays (Luminex, FACS) zum Ak-Screening eingesetzt werden.

PCR-SSO

Die Einführung der PCR als labortechnisches Werkzeug hat die HLA-Diagnostik revolutioniert. Die nachfolgend beschriebenen Verfahren (PCR-SSO, PCR-SSP und SBT) basieren auf dem Prinzip der PCR und haben in den letzten zehn Jahren Einzug in die HLA-Routine-diagnostik gehalten.

Die PCR-SSO Methode zeichnet sich dadurch aus, dass zunächst ein vollständiges Exon eines zu typisierenden HLA-Genortes amplifiziert wird. Das PCR-Produkt wird auf ein Trägermaterial (Nylonmembran oder Kunststoffplatte) übertragen und mit markierten Allel- oder Allelgruppen-spezifischen Oligonukleotiden hybridisiert („Dot-Blot-Verfahren“). Wenn die Oligonukleotide selbst bereits auf der Trägermatrix fixiert sind, spricht man von einem „Reverse Dot Blot“ (RDB). In diesem Fall

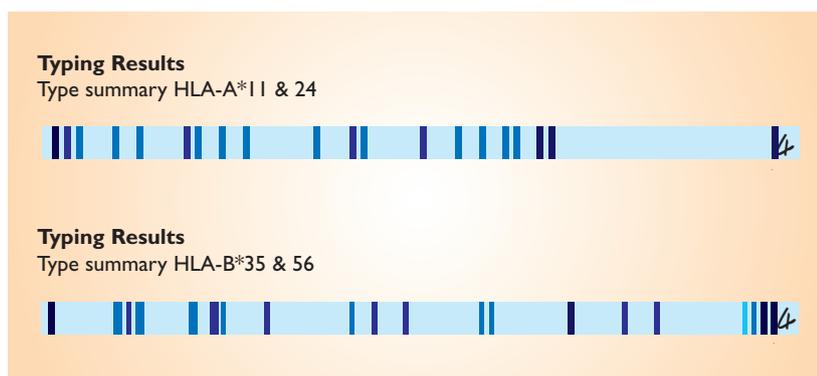
werden die fixierten Sonden mit dem während der PCR-Reaktion markierten Amplifikationsprodukt hybridisiert. Positiv verlaufende Hybridisierungsreaktionen werden über eine Färbereaktion sichtbar gemacht. Der RDB-Assay hat sich in vielen Laboren als ein hervorragend geeignetes Verfahren zur routinemäßigen Abarbeitung von Proben bewährt (*Abbildung 2*).

Die PCR-SSO-Methode erlaubt eine niedrig- bis hochauflösende Typisierung für HLA-Klasse I & II Merkmale. Eine hochauflösende Typisierung kann allerdings damit eher in wenigen Fällen erreicht werden. Die Auswertung der Typisierungsergebnisse erfordert den Einsatz speziell geeigneter Computersoftware, die in der Regel von den Kit-Herstellern zur Verfügung gestellt wird.



Abbildung 2

HLA-A-, -B-Typisierung mittels Reverse Dot Blot (Dynal-Reli). Jeder Strich auf dem Nitrozellulose-Membranstreifen entspricht einem positiven Hybridisierungssignal mit einem anderem Oligonukleotid. Das gescannte Bandenmuster wird automatisch interpretiert und das Ergebnis als niedrigauflösende Typisierung angegeben.





Eine Abwandlung des PCR-SSO-Verfahrens ist die Typisierung mittels der Luminex-Technologie. Für Typisierungsassays werden fluoreszierende Luminex Beads mit spezifischen Oligonukleotidsonden gekoppelt, die anschließend mit einem Biotin-markierten PCR-Produkt hybridisieren. Die Fluoreszenz der einzelnen Beads in Kombination mit dem Farbstoff eines Avidin-Biotin-PCR-Produktes ergibt ein Doppelsignal, das vom Luminex-FACS-Gerät detektiert und per Spezialsoftware ausgewertet wird.

PCR-SSP

1992 wurde von Olerup die PCR-Methode mittels sequenzspezifischer Primer (PCR-SSP) zur Identifizierung der HLA-DRB1 Merkmale publiziert (Olerup et al., Tissue Antigens 1992, 39:225-235). Diese Methode bietet ein schnelles und relativ unkompliziertes, jedoch spezifisches Verfahren zur HLA-Typisierung. Die PCR-SSP-Methode basiert auf einer PCR-Reaktion, bei der es durch Einsatz von sequenz-spezifischen Primern nur dann zu einer Ampli-

fikation der genomischer DNA kommt, wenn Zielsequenz und Primersequenz auf beiden DNA-Strängen komplementär sind, also das zu testende Individuum das entsprechende, durch die Primersequenzen definierte HLA-Allel aufweist. Die positive bzw. ausgebliebene Amplifikationsreaktion wird durch eine Agarosegelelektrophorese nachgewiesen und mittels Polaroidfotografie dokumentiert (**Abbildung 3**).

Die PCR-SSP-Methode ist von den hier beschriebenen das am leichtesten durchzuführende Verfahren und eignet sich vor allem für die schnelle Typisierung von HLA-Merkmalen. Man erhält innerhalb von 2-3 Stunden vom Zeitpunkt der Blutentnahme ein Ergebnis, das auch manuell leicht zu interpretieren ist. Daher hat

sich dieses Verfahren für den routinemäßigen Einsatz in der Diagnostik weitgehend durchgesetzt. Auch ist dieses Verfahren das einzige DNA-gestützte Verfahren, das wegen seiner Geschwindigkeit für den Einsatz im Rahmen der Organspendertypisierung im Rufbereitschaftsdienst eingesetzt werden kann. Mittels der PCR-SSP-Methode können sämtliche HLA-Genorte typisiert werden. Auch andere immungenetischen Parameter, wie KIR-Rezeptorengene bzw. Zytokingene werden mittels dieses Verfahrens getestet. Die PCR-SSP-Technik erzielt eine variable Auflösung, je nach der Zahl der eingesetzten Primer-Kombinationen. Ein Nachteil ist, dass für eine hohe Auflösung viele PCR-Reaktionen gleichzeitig eingesetzt werden müssen. Dies führt zu einem relativ hohen DNA-Verbrauch.

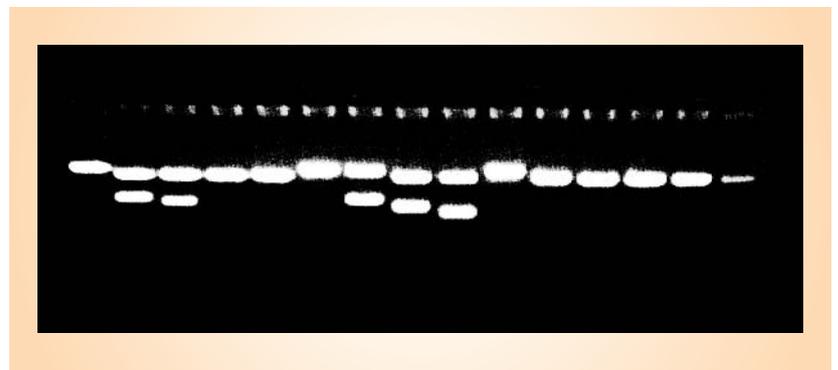


Abbildung 3

HLA-DRB1*04 Subtypisierung mittels PCR-SSP. Die punktförmigen Stellen auf der Oberkante des Fotos stellen die Auftragsstellen der PCR-Produkte dar. Die Banden, die ungefähr an einer Linie liegen, sind die Kontrollamplifikationen. Die kürzeren fünf Amplifikate, sind die spezifischen Banden.



Abbildung 4

Hochdurchsatzsequenzierer mit 48 Kapillaren für die hochauflösende HLA-Klasse I Diagnostik mittels SBT (links) HLA-B exon2, reverse-Sequenz eines BC-Motiv-Amplifikats mit den H-Seq-ABC Sequenzierkit des IKT Ulm (rechts)

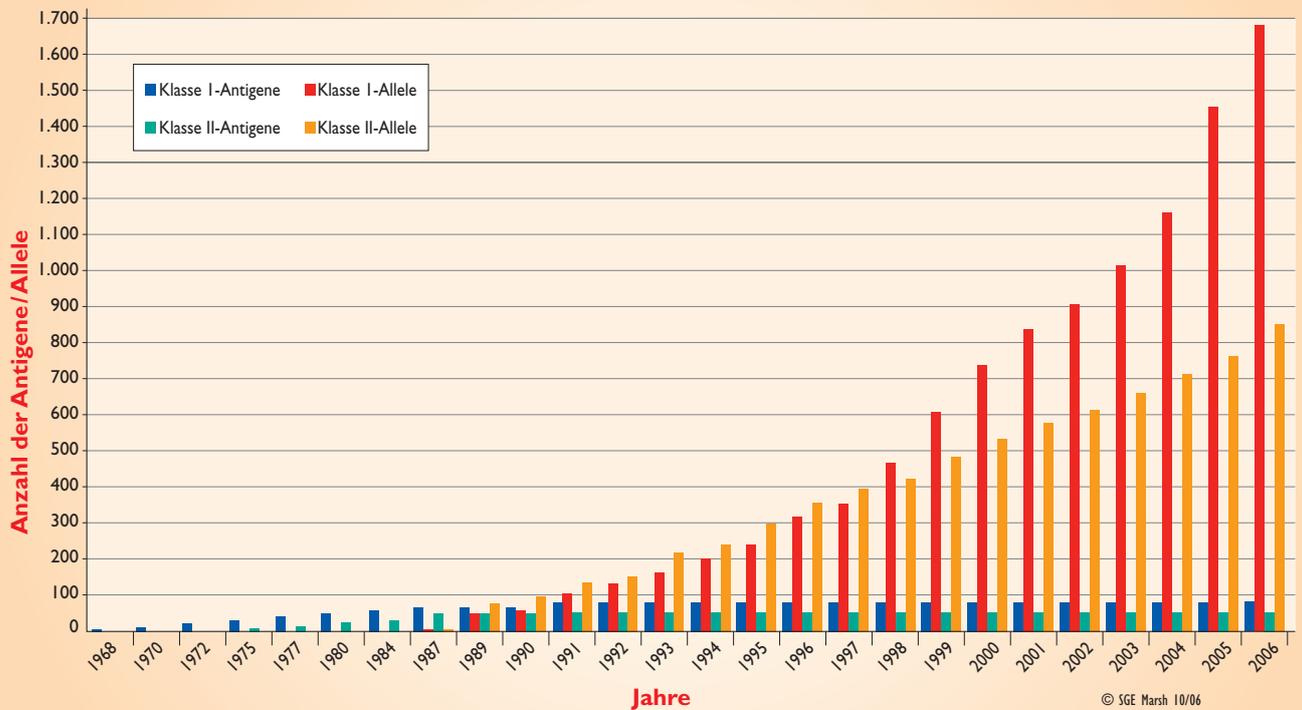
HLA-Sequenzierung (SBT)

Pere Santamaria beschrieb 1993 die direkte Sequenzierung als eine Alternative zu den bisher angewandten molekularbiologischen Verfahren der HLA-Klasse II-Typisierung (Santamaria et al. Hum Immunol 1993, 37:39-50). Mittlerweile gibt es zahlreiche Sequenzierungsstrategien, die bei der HLA-Typisierung eingesetzt werden. Bei der SBT-Technik startet man mit der Amplifizierung des zu typisierenden Genortes. Da der polymorphe Bereich, der für die Typisierung von Interesse ist, in den Exonen liegt, konzentriert man sich hauptsächlich auf die Amplifizierung der Exone 2 und 3 für HLA-Klasse I-Gene und des Exon 2 für HLA-Klasse II-Gene. Nach der PCR wird eine Sequenzierungsreaktion nach Sanger (Sanger et al. Nature 1977, 265:687-695) durchgeführt. Hierbei wird das

Produkt der Sequenzierungsreaktion, also ein weiteres Amplifikat, markiert. Heute werden hierfür Fluoreszenzmarkierten ddNTP's eingesetzt. Für jedes der ddNTP's wird ein anderer Farbstoff genutzt, so dass man am Schluss die Abfolge der eingebauten Nukleotide anhand der fluoreszierenden Farben unterscheiden kann. Nach einer Reinigung des Sequenzierproduktes, bei der die nicht eingebauten ddNTP's entfernt werden, kann die Auswertung in einem Sequenzierautomaten erfolgen (**Abbildung 4**). Dies geschieht mittels einer Kapillargelelektrophorese und des in dem Automaten eingebauten Laser/Detektor Konstrukts, das die unterschiedlichen Farben der markierten ddNTP's erfasst und über eine Software ein Diagramm und die entsprechende Sequenzabfolge zeichnet (**Abbildung 4**). Die Sequenzabfolge wird anschließend mittels einer weiteren Software mit allen vorhandenen HLA-

Allelsequenzen verglichen. Als Ergebnis erhält man die Allelkombination, die am besten zur ermittelten Testsequenz passt.

Die Sequenzierung ist die eleganteste aller beschriebenen Methoden. Obwohl sie technisch anspruchsvoll ist und entsprechend geschultes Personal sowie teure Ausrüstung (Sequenzierer) erfordert, liefert sie zweifelsohne die höchstmögliche Auflösung. In Anbetracht der ständig wachsenden Zahl von neuen HLA-Allelen (**Abbildung 5 – Tabelle 1**) erscheint dieses Verfahren von allen oben erwähnten am interessantesten. Auch das Potential für eine Automatisierung dieses Verfahrens ist gegeben, womit ein verhältnismäßig hoher Durchsatz zu gewährleisten wäre.



© SGE Marsh 10/06

Abbildung 5

HLA-Antigene und -Allele, die seit 1968 jährlich registriert wurden. Anfang der 90er Jahren sind die ersten molekularbiologischen Verfahren zur HLA-Typisierung eingeführt worden. Ende der 90er wurde die direkte Sequenzierung in die HLA-Diagnostik eingeführt. (Grafikquelle: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/>).

Klinische Unterteilung der transplantations-immunologischen Leistungen

Die transplantationsimmunologische Diagnostik bedient zwei große Patientengruppen: zum einen die Knochenmark (KM)-/Blutstammzelltransplantations (PBSZ)-Diagnostik, zum anderen die Diagnostik im Rahmen der Or-

gantransplantation. Die forensische Diagnostik, sowie Untersuchungen im Zusammenhang mit Thrombozytensubstitution gehören eben-

falls zum Spektrum der immunge-netischen Diagnostik. Schließlich ist die Bestimmung von HLA-Markern, die mit diversen Krankheiten

>
Tabelle I

Aktuelle Anzahl der HLA-Klasse I- und II-Allele, Stand 10/06
(www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html)

HLA-Genort	Anzahl der Allele	Anzahl Proteine	Anzahl NULL-Allele
A	489	390	36
B	830	711	27
C	266	210	6
DRB	545	451	7
DQBI	78	57	1
DQAI	34	25	1
DPBI	125	112	2



assoziiert sind (z. B. HLA-B27 mit Morbus Bechterew), eine weitere Domäne der transplantationsimmunologischen Labore. Aus Platzgründen wird in diesem Bericht nur auf die transplantationsrelevante Diagnostik eingegangen.

KM- bzw. Stammzelltransplantation

Bei einer KM- oder einer PBSZ-Transplantation handelt es sich um ein Therapieverfahren zur Behandlung maligner Erkrankungen oder angeborener bzw. erworbener Defekte der Lymphohämopoese. Meistens geht einer Stammzelltransplantation eine Hochdosis-Chemotherapie voraus. Die anschließend durchzuführende Transplantation von KM bzw. PBSZ kann entweder autolog oder allogene sein. Im Jahr 2005 wurden mehr als 60 % der allogenen Ersttransplantationen von unverwandten Spendern durchgeführt. Da mittlerweile in Deutschland 85 % aller Transplantationen hämatopoietischer Stammzellen durch die Übertragung von PBSZ erfolgen (der Rest durch die Gabe von KM-DRST-Jahresbericht, <http://www.drst.de/download/jb2005.pdf>), wird in diesem Bericht der Einfachheit halber von Stammzell

(SZ)-Transplantation und SZ-Spendern die Rede sein, obwohl damit sowohl die KM- als auch die PBSZ-Transplantation gemeint ist.

Bei einer KM-Transplantation ist eine möglichst vollkommene HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger anzustreben. Schon geringe Differenzen können bewirken, dass die Immunzellen des Spenders, die sich aus dem Transplantat entwickeln, eine starke Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) bewirken, die beim Patienten je nach Stärke auch zum Tode führen kann.

Die Diagnostik im Bereich der SZ-Transplantation wird in drei Gruppen unterteilt:

- Diagnostik im Rahmen einer Suche nach einem kompatiblen Spender innerhalb der Familie
- Diagnostik im Rahmen einer Suche nach einem nicht-verwandten, allogenen SZ-Spender
- Diagnostik im Rahmen der Rekrutierung von freiwilligen, nicht-verwandten SZ-Spendern

KM-/PBSZ-Transplantation von verwandten Spendern

Bei der Diagnostik im Rahmen der allogenen-verwandten Stamm-

zelltransplantation erfolgt (möglichst vor Einleitung einer Chemotherapie) die Bestimmung der Gewebemerkmale HLA-A, -B, -DRB1 und -DQB1 des Patienten. Eine Bestimmung dieser Merkmale auf einem niedrigen Auflösungs-niveau ist in dieser Phase vollkommen ausreichend. Zusammen mit der Blutprobe des Patienten sollte auch das Blut von allen direkten Verwandten (Eltern, Geschwister, Kinder) untersucht werden. Dies ermöglicht zum einen die Identifizierung von voll kompatiblen potentiellen Spendern, zum anderen die Darstellung von Haplotypen, die häufig die Unterscheidung einer genotypischen Identität von einer „Scheinidentität“ (phänotypische Identität) ermöglicht (**Abbildung 6**). Vor einer geplanten Transplantation müssen Patient und Spender erneut für die gleichen Genorte typisiert werden (Bestätigungstestung). Die Bestätigungstestung soll sicherstellen, dass dem Patienten nicht auf Grund einer Fehltypisierung das falsche KM übertragen wird. Gibt es keinen kompatiblen Spender innerhalb der Kernfamilie, so ist es empfehlenswert, für Patienten kaukasischer Herkunft möglichst zeitnah die Einleitung der Suche nach einem nicht-verwandten Spender vorzunehmen, falls die



	Mutter		Vater	
HLA-A	1	29	2	3
HLA-B	8	35	8	60
HLA-Cw	7	4	3	7
HLA-DRB1*	0701	0301	1301	0801
HLA-DQA1*	0201	0501	0103	0401
HLA-DQB1*	0303	0201	0603	0402
HLA-DPBI*	0901	0401	0401	1501

	Kind 1		Kind 2	
HLA-A	29	3	1	3
HLA-B	35	60	8	60
HLA-Cw	4	7	7	7
HLA-DRB1*	0301	0801	0701	0801
HLA-DQA1*	0501	0401	0201	0401
HLA-DQB1*	0201	0402	0303	0402
HLA-DPBI*	0401	1501	0901	1501

	Kind 3		Kind 4	
HLA-A	29	3	1	2
HLA-B	35	60	8	8
HLA-Cw	4	7	7	3
HLA-DRB1*	0301	0801	0701	1301
HLA-DQA1*	0501	0401	0201	0103
HLA-DQB1*	0201	0402	0303	0603
HLA-DPBI*	0401	1501	0901	0401

Abbildung 6

Beispiel einer Familientypisierung mit 4 Haplotypen. Die Typisierung der HLA-Klasse I-Merkmale ist serologisch durchgeführt worden, während die HLA-Klasse II-Merkmale molekularbiologisch bestimmt wurden. Die Kinder 1 und 3 haben von den Eltern die gleichen HLA-Haplotypen geerbt und sind demnach HLA-identisch. Kind 4 hat auf dem Genort HLA-B das gleiche Merkmal (B8) von beiden Elternteilen geerbt und ist daher für dieses Merkmal homozygot.

Indikation für eine Stammzelltransplantation von einem unverwandten Spender gegeben ist. Bei nicht-kaukasischen Patienten, bzw. bei Patienten mit seltenen Gewebemerkmale, bei denen innerhalb der Kernfamilie sowie in den internationalen Registern kein kompatibler Spender gefunden werden kann, wäre eine erweiterte Familienspendersuche denkbar. Hierbei versucht man aus dem erweiterten Verwandtenkreis einen möglichst phänotypisch identischen Spender ausfindig zu machen.

KM-/PBSZ-Transplantation von nicht-verwandten Spendern

Die Diagnostik im Rahmen der Suche nach einem nicht-verwandten SZ-Spender wird in dem „DGI-DAG-KBT Konsensus-Paper“ geregelt. (http://www.immunogenetik.de/data/Konsensus_Version_AugustFinal_2005.pdf). Das aktuelle Prozedere sieht vor, dass vor Einleitung einer Suche der Patient ein zweites Mal typisiert wird. Diesmal handelt es sich um eine hochauflösende Typisierung für alle untersuchten Genorte (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1). Ist die Typisierung der Zweittestung mit dem Ergebnis der Ersttestung identisch, kann mit der Einleitung der Suche fortgefahren werden. So genannte

Sucheinheiten sind Service-Einrichtungen, meistens assoziiert mit HLA-Laboren, in denen speziell geschulte Mitarbeiter die Aufgabe haben, Kontakt zu den nationalen und internationalen Spender-Datenbanken aufzunehmen und somit unter den inzwischen über zehn Millionen weltweit registrierten, nicht-verwandten freiwilligen SZ-Spendern einen passenden für den aktuellen Patienten ausfindig zu machen. Mittlerweile wird für über 80% der Patienten, für die eine nicht-verwandte Stammzellspender-Suche eingeleitet wird, ein passender Spender gefunden. Im Rahmen der nicht-verwandten SZ-Spender-Suche werden nach der Identifizierung von potentiellen kompatiblen Spendern Blutproben aus den jeweiligen Dateien/Registern angefordert. Sobald diese Proben im Labor der Sucheinheit eintreffen, wird eine HLA-Testung vorgenommen, die Bestätigungstypisierung oder confirmatory typing (CT) heißt. In der nicht-verwandten Situation wird im Rahmen der CT-Testung, ähnlich wie bei der Retypisierung des Patienten, eine hochauflösende Klasse I- und Klasse II-Testung durchgeführt. Anders als bei der verwandten Situation, wird hier seit April 2005 regelmäßig auch der HLA-C-Genort untersucht.

Die aktuellen Kompatibilitätskriterien bei einer nicht-verwandten SZ-Transplantation sehen als Mindestanforderung vor, dass Spender und Empfänger für HLA-A und -B eine Kompatibilität auf niedrigauflösendem Niveau und für die HLA Klasse II-Merkmale (HLA-DRB1 und -DQB1) auf hochauflösendem Niveau aufweisen müssen. Die internationale Datenlage über den Einfluss einer hochauflösenden HLA Klasse I-Kompatibilität auf das Ergebnis der SZ-Transplantation wird gegenwärtig widersprüchlich diskutiert. Die Mehrheit der Autoren geht jedoch von einem Einfluss der Kompatibilität auf der Allel-Ebene auf den Erfolg der Stamm-

zelltransplantation aus (Flomenberg et al., Blood 2004, 104:1923-1930; Ottinger et al., Transplantation 2004, 78:1077-1080) (**Abbildung 7**). Neuerdings wird auch der Kompatibilität von Spender und Empfänger bezüglich der Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen (KIR) und deren Liganden zunehmend Bedeutung zugemessen (Ruggeri et al., Transpl Immunol 2005, 203-206), weshalb viele der Transplantationskliniken eine solche Untersuchung bei den HLA-Laboren in Auftrag geben, sobald HLA-kompatible Spender identifiziert werden konnten.

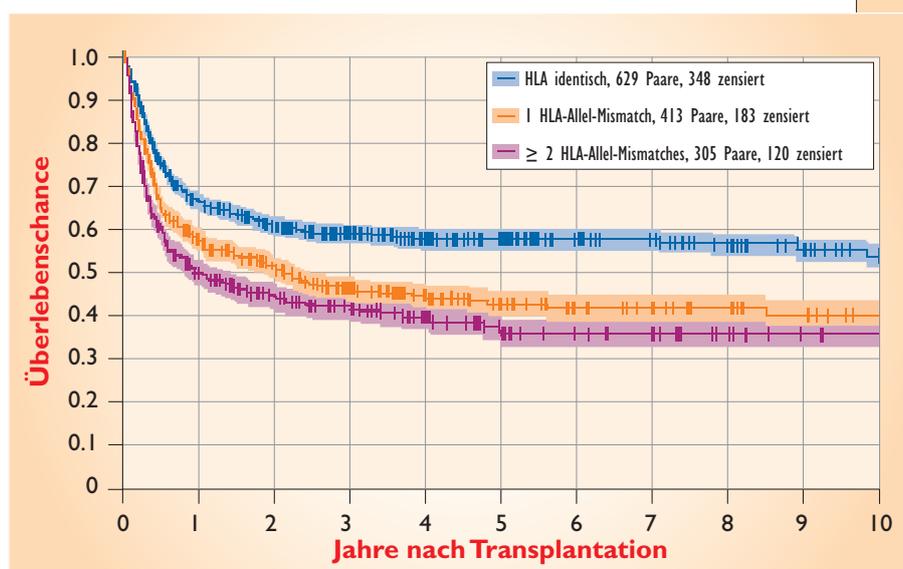


Abbildung 7

Einfluss der HLA-Kompatibilität auf das Überleben von Patienten nach allogener, nicht verwandter Stammzelltransplantation. Patienten mit vollkommener Identität für HLA-A-, -B-, -C-, -DRB1- und -DQB1-Allele (blaue Kurve) zeigen einen eindeutig besseren Verlauf als Patienten mit 1 oder mehr Allel-Mismatches (www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc/MHC).



Für Patienten, für die weder ein verwandter noch ein nicht-verwandter, kompatibler Spender gefunden werden konnte, werden vereinzelt Inkompatibilitäten in Kauf genommen. Bei bestimmten Krankheitsbildern ist es sogar möglich, eine halb-identische Spender/Empfänger-Kombination zu akzeptieren. Dies ist vor allem bei pädiatrischen Patienten mit einem SCID (angeborenen Immundefekt) der Fall. In allen inkompatiblen Spender-Empfänger-Fällen, wird in der Regel auch ein lymphozytotoxischer Crossmatch durchgeführt, um Spender-spezifische Antikörper des Patienten auszuschließen.

Diagnostik im Rahmen der Registrierung von freiwilligen, nicht-verwandten SZ-spendern

Nicht-verwandte, freiwillige SZ-Spender werden durch die Presse und die Medien mobilisiert und im Rahmen von „Spende-Aktionen“ registriert. Eine Typisierung von nicht verwandten SZ-Spendern zur Aufnahme in eine Spenderdatei sieht in erster Linie eine HLA-A, -B-Testung vor. Zu einem späteren Zeitpunkt kann eine prospektive Typisierung von HLA-DRB1 durchgeführt werden. Je höher der Prozentsatz von HLA-DR-typisierten

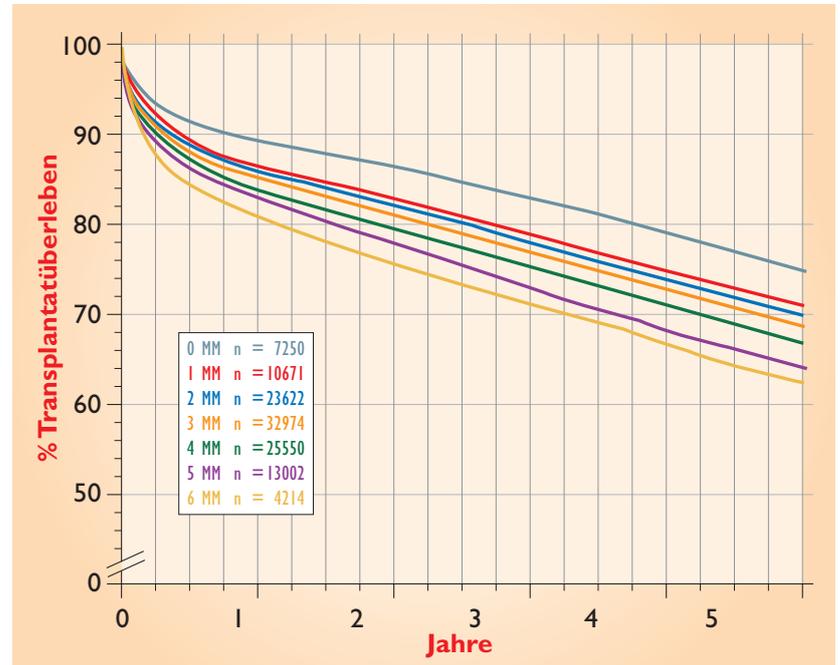


Abbildung 8

Einfluss der Gewebekompatibilität auf das Überleben von Leihnierentransplantaten bei ersttransplantierten Patienten. Berücksichtigt wurden für diese Grafik die Gewebemerkmale HLA-A, -B und -DR. Je größer die Zahl der Inkompatibilitäten (Mismatches = MM), desto schlechter das Transplantatüberleben. Die Auswertung stammt aus der Datenbank der Collaborative Transplant Study (www.ctstransplant.org CTS-K-21101-0805).

Spendern in einer Datei ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Spender aus dieser Datei für eine tatsächliche Spende herangezogen werden. Abgesehen von den Hochdurchsatztypisierungen für HLA-A, -B und (nachgeschaltet) für -DRB1 ergeben sich bei der Spenderdatei-Diagnostik gelegentlich HLA-Typisierungsaufträge für sämtliche HLA-Genorte und Auflösungsgrade, die mit gezielten Anfragen verschiedener Sucheinheiten zusammenhängen.

Organtransplantation

Der zweite wichtige Pfeiler der transplantationsimmunologischen Diagnostik befasst sich mit Untersuchungen im Rahmen von Organtransplantationen. Die überragende Zahl dieser Eingriffe betrifft die Transplantation von Nieren. Anders als bei der SZ-Transplantation ist bei einer Nierentransplantation die Kompatibilität nicht so streng zu bewerten. Selbst eine vollkommene Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger stellt bei der Organtransplantation keine Kontraindikation dar. Zwar

gibt es eine eindeutige Korrelation zwischen dem Erfolg einer Nierentransplantation und dem Grad der Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger (**Abbildung 8**), jedoch zwingen klinische Gründe zu der Entscheidung, nicht immer auf das optimale Organangebot zu warten, sondern teilweise einen sofort verfügbaren, jedoch vollkommen inkompatiblen Spender vorzuziehen. Gegenwärtig konzentriert sich die (Organ-)transplantationsimmunologische Diagnostik fast ausschließlich auf die Nierentransplantation, da eine Kompatibilitätsvorgabe für Herz- und Lebertransplantationen (sowie für Lunge, Darm und Hornhaut) nicht existiert. Lediglich bei immunisierten Pankreastransplantationskandidaten wird ein prospektiver Crossmatch gefordert.

In Deutschland wird die Organtransplantation und die Verteilung von Organen durch die Organisation EURORTRANSPLANT (ET) koordiniert, die in Leiden/Niederlande lokalisiert ist. Die Aufgabe von ET ist es, verfügbare Organe aus Deutschland, den Benelux-Staaten, Österreich und Slowenien an den jeweils kompatibelsten Empfänger innerhalb dieses Einzugsbereiches zu vergeben (Organallokation). Hierfür gibt es ein

ausgeklügeltes Punktesystem, das außer der Kompatibilität zum gegebenen Spender auch die Wartezeit des Patienten auf der Transplantationsliste, die Häufigkeit des HLA-Typs des Patienten und dessen Immunisierungsstatus berücksichtigt (de Meester et al., Transplantation 1998, 66:1154-1159). Der Patient, der für einen bestimmten verfügbaren Spender die höchste Punktzahl erreicht hat, erhält das Organ.

Die immungenetische Diagnostik im Rahmen der Organtransplantation befasst sich zum einen mit der Untersuchung des Patienten vor der Transplantation, und zum anderen mit der Untersuchung des Spenders. Ein weiterer Aspekt befasst sich mit dem Immun-Monitoring nach der Transplantation, das in verschiedenen Transplantationszentren, zunehmend verlangt wird.

Diagnostik beim Organtransplantationsempfänger

Für die Aufnahme eines Organtransplantationspatienten in die Transplantationswarteliste ist die Bestimmung seiner Gewebemerkmale, insbesondere HLA-A, -B und -DRB1 erforderlich. Die Typisierung wird mit niedriger Auflösung

durchgeführt. Abgesehen von der Bestimmung der HLA-Gewebemerkmale ist bei Nieren und Pankreasempängern eine regelmäßige Überwachung der lymphozytotoxischen Antikörper von Bedeutung. Das Antikörper-Screening wird in 3-monatigen Abständen durchgeführt. Patienten, bei denen lymphozytotoxische Antikörper detektiert wurden, bekommen zusätzliche Punkte bei der Organallokation. Besonders wichtig ist es auch, bei vorhandenen Antikörpern diese möglichst gut zu spezifizieren, da dadurch das Angebot eines Organs vermieden wird, gegen das der Patient spezifische Antikörper haben könnte. Seren von immunisierten Nieren- bzw. Pankreaspatienten werden an alle HLA-Labore, die Organspender-Diagnostik innerhalb des ET-Verbundes durchführen, versendet, damit bei einem eventuellen Organ-Angebot für diese Patienten im Spenderzentrum eine lymphozytotoxische Kreuzprobe durchgeführt werden kann. HLA-Labore, in denen nur Empfängerdiagnostik betrieben wird, versenden darüber hinaus eine Serumprobe jedes Nierenpatienten der lokalen Transplantationswarteliste an die Regionallabore (s. unten).



Organspenderdiagnostik

Die Organisation der Organspende innerhalb von Deutschland wird von der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) durchgeführt. Die DSO hat das Bundesgebiet in sieben Transplantationsregionen unterteilt (Bayern, Baden-Württemberg, Mitte, Nordrhein-Westfalen, Nord, Nord-Ost, Ost) und innerhalb jeder Region 1-2 Gewebetypisierungs-Labore unter Vertrag genommen (= Regionallabore), deren Aufgabe es ist, eine adäquate Organspenderdiagnostik auf 24-Stunden Basis sicherzustellen. Für eine erfolgreiche Organtransplantation müssen entnommene Organe möglichst schnell (innerhalb von 48 Stunden für Nieren bzw. 8 Stunden für Herz, Leber, Pankreas und Lunge) an den Patientenkreislauf angeschlossen werden. Regionallabore müssen im Falle eines verstorbenen (hirntoten) Organspenders eine Gewebetypisierung des Spenders für die HLA-Merkmale A, B und DR möglichst schnell durchführen, und die Ergebnisse an das DSO-Regionallbüro bzw. das Zentral-Transplantationsbüro von ET melden. Anhand einer Rangliste, die von ET an das Regionallabor gesendet wird, müssen anschließend lymphozytotoxische

Crossmatches für alle Patienten, die in der entsprechenden Region als beste Empfängerkandidaten in Frage kommen, durchgeführt werden. Auch für immunisierte Patienten aus anderen Regionen, die ebenfalls als mögliche Empfänger berücksichtigt werden müssen, werden im Regionallabor, das die Spenderdiagnostik durchführt, Crossmatches angesetzt. Ein positiver Crossmatch stellt eine Kontraindikation zur Nierentransplantation dar. Wenn der potentielle Empfänger in einer anderen Region als der Spenderregion registriert ist bzw. seit dem letzten Antikörper-Screening ein immunisierendes Ereignis stattgefunden hat (z. B. Bluttransfusionen, Transplantationen, Schwangerschaft etc), muss der Crossmatch im Empfänger-Regionallabor wiederholt werden. Die Organe werden an die punkthöchsten, crossmatch-negativen Empfänger innerhalb des gesamten ET-Verbundes vergeben. Die Kriterien für die Freigabe eines Organ-Transplantats sind mittlerweile von der DGI reguliert worden. Eine entsprechende Richtlinie ist von der ständigen Kommission Organtransplantation der Bundesärztekammer verabschiedet worden (Deutsches Ärzteblatt 2005, 102:C2360-C2367).

Bei geplanten Lebendspendetransplantationen wird neben einer Bestimmung der Blutgruppen- und HLA-Merkmale von Spender und Empfänger dem Crossmatch eine besondere Bedeutung beigemessen, um zu vermeiden, dass die Niere einer gesunden, verwandten Person, durch eine (möglicherweise vorhersehbaren) Abstoßung vergeudet wird.