

**Die Etablierung des MAILA  
im Rahmen einer  
Screening-Studie an Blutspenderinnen  
zur Prophylaxe der  
transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI)**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Eva-Maria Uta Link  
aus Hardheim

Gießen 2010

**Aus dem Institut für Klinische Immunologie  
und Transfusionsmedizin  
des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Direktor: Prof. Dr. G. Bein**

Gutachter: PD Dr. U. Sachs  
Gutachter: Prof. Dr. N Weißmann

Tag der Disputation: 03.05.2011

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Screening of multiparous women to avoid transfusion-related acute lung injury: a single centre experience. *Transfusion medicine* 2008;18(6):348-354

Für Matthias

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie und Bedeutung der TRALI .....	1
1.2	Histologische Befunde .....	4
1.3	Pathophysiologie .....	4
1.3.1	Passage des Lungenkapillarbettes .....	5
1.3.2	Auswanderung der aktivierten neutrophilen Granulozyten .....	6
1.3.3	Priming .....	6
1.3.4	Aktivierung der Endothelzelle im pulmonalen Kapillarbett .....	7
1.3.5	TRALI durch leukozytenreaktive Antikörper (immunogene TRALI) .....	8
1.3.6	TRALI durch andere Auslöser (nicht-immunogene TRALI) .....	10
1.3.7	Schwellenmodell .....	12
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1	Probensammlung und Probenaufbereitung .....	14
2.1.1	Spenderblut der mehrfach schwangeren Frauen .....	14
2.1.2	Gewinnung von Serum .....	14
2.2	Methoden zum Nachweis von granulozytenreaktiven Antikörpern .....	15
2.2.1	Isolierung von Granulozyten aus Spenderblut .....	15
2.2.2	Granulozytenimmunfluoreszenztest (GIFT) .....	16
2.2.3	Granulozytenagglutinationstest (GAT) .....	17
2.2.4	Monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigen assay (MAIGA) .....	17
2.3	Methoden zum Nachweis von HLA-Antikörpern .....	20
2.3.1	Isolierung von Lymphozyten aus Spenderblut .....	20
2.3.2	Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT) .....	20
2.3.3	Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von HLA-Antikörpern .....	21
2.3.4	Monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigen assay (MAILA (Standardprotokoll)) .....	22

---

2.4	Zellkultur .....	24
2.4.1	Herstellung Epstein-Barr-Virus-haltigen Kulturüberstandes .....	24
2.4.2	Isolierung mononuklearer Zellen aus peripherem Blut .....	24
2.4.3	EBV-Transformation .....	25
2.4.4	Auftauen .....	26
2.4.5	Kultivierung .....	27
2.4.6	Fixierung B-lymphoblastoider Zellen (Standardprotokoll).....	27
2.4.7	Kryokonservierung .....	28
2.5	Quantitative Bestimmung der Antigendichte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting) .....	29
2.6	Erfassung der TRALI-Fälle .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Screening der mehrfach schwangeren Spenderinnen .....	32
3.1.1	Ergebnisse der Screening-Tests .....	32
3.1.2	Tabellarische Erfassung des Screenings .....	34
3.1.3	Ergebnisse der Antikörper-Tests in der Kontrollgruppe .....	34
3.1.4	Kostenrechnung für das Screening .....	35
3.1.5	TRALI-Fälle .....	36
3.2	Etablierung des MAILA .....	39
3.2.1	Allgemeines zu den durchgeführten Versuchen .....	39
3.2.2	Antigenexpressionsrate auf EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen .....	41
3.2.3	Einsatz von INF $\gamma$ bzw. IL-4 .....	42
3.2.4	Änderung der Albuminkonzentration im MAINA-Waschpuffer .....	44
3.2.5	Konzentrationsänderung des sekundären Antikörpers .....	45
3.2.6	Konzentrationsreduktion des eingebrachten Antigen-Antikörper-Komplexes	48
3.2.7	Konzentrationsänderung des eingesetzten Testserums .....	51
3.2.8	Verwendung verschiedener Lysepuffer .....	53
3.2.9	Verwendung verschiedener Fixierungspuffer .....	55
3.2.10	Vergleich von Lysepuffer 4, Lysepuffer 5 und Standardlysepuffer .....	60
3.2.11	Vergleich des Standard-MAILA-Protokolls mit dem neuen MAILA-Protokoll .....	61

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1	Screening der mehrfach schwangeren Spenderinnen .....	64
4.2	Etablierung des MAILA .....	68
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
6.1	Zusammenfassung (deutsch) .....	83
6.2	Summary (englisch) .....	86
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>90</b>
8.1	Selbstständigkeitserklärung .....	90

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Meldungen und transfusionsassoziierte Todesfälle von 1996 bis 2008; SHOT.	1
Abbildung 2: Die Passage der neutrophilen Granulozyten durch das pulmonale Kapillarnetz. Quelle: Bux und Sachs, 2007. ....	5
Abbildung 3: Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten als TRALI-Schlüsselmechanismus. Quelle: Sachs und Bein, 2007. ....	10
Abbildung 4: Schwellenmodell nach Bux und Sachs, 2007. ....	12
Abbildung 5: Pipettierschema des ELISA .....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reaktionen im MAILA .....	23
Abbildung 7: Darstellung einer MAILA-Testplatte .....	23
Abbildung 8: Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse der HLA-Klasse-II-Antigendichte auf EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen .....	30
Abbildung 9: Tabellarische Erfassung der Screening-Ergebnisse .....	34
Abbildung 10: HLA-II-Expression auf EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen ....	41
Abbildung 11: Einsatz von INF-gamma bzw. IL-4 (Zelle #04) .....	43
Abbildung 12: Einsatz von INF-gamma bzw. IL-4 (Zelle #08) .....	43
Abbildung 13: Konzentrationsveränderungen des Albumins im MAINA-Waschpuffer (Zelle #04) .....	44
Abbildung 14: Konzentrationsveränderungen des Albumins im MAINA-Waschpuffer (Zelle #08) .....	45
Abbildung 15: Konzentrationsänderung des sekundären Antikörpers (Zelle #04) .....	46
Abbildung 16: Konzentrationsänderung des sekundären Antikörpers (Zelle #08) .....	47
Abbildung 17: Konzentrationsreduktion des Antigen-Antikörper-Komplexes (Zelle #04) ....	49
Abbildung 18: Konzentrationsreduktion des Antigen-Antikörper-Komplexes (Zelle #08) ....	50
Abbildung 19: Konzentrationsänderung des Testserums (Zelle #04) .....	51
Abbildung 20: Konzentrationsänderung des Testserums (Zelle #08) .....	52
Abbildung 21: Verwendung verschiedenen Lysepuffer (Zelle #04) .....	54
Abbildung 22: Verwendung verschiedenen Lysepuffer (Zelle #08) .....	55
Abbildung 23: Verwendung verschiedener Fixierungspuffer (Zelle #04) .....	58
Abbildung 24: Verwendung verschiedener Fixierungspuffer (Zelle #08) .....	59
Abbildung 25: Vergleich von LP4, LP5, und Standard-LP (Zelle #04) .....	60

Abbildung 26: Vergleich von LP4, LP5, und Standard-LP (Zelle #08) ..... 61

Abbildung 27: Vergleich Standard-MAILA-Protokoll / neues MAILA-Protokoll (Zellen #04)  
..... 62

Abbildung 28: Vergleich Standard-MAILA-Protokoll / neues MAILA-Protokoll (Zellen #08)  
..... 63

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CMV	Zytomegalievirus
C-PAP	continuous positive airway pressure
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EHN	European Haemovigilance Network
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
GAT	Granulozytenagglutinationstest
GIFT	Granulozytenimmunfluoreszenztest
GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes immunschwäche Virus
HLA	human leukocyte antigen
HNA	human neutrophil antigen
HPA	human platelet antigen
ICAM-1, -2	intercellular adhesion molecule -1, -2
IgA -G, -M	Immunoglobulin A, -G, -M
IL-8, -1 $\beta$ , -4	Interleukin -8, -1 $\beta$ , -4
IMDM	iscope's modified dulbecco's medium
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$

KHK	Koronare Herzkrankheit
-ko	Negativkontrolle
LIFT	Lymphozytenimmunfluoreszenztest
LP	Lysepuffer
LÜ	Lyseüberstand
LÜ-Lösung	Lyseüberstandslösung
MAIGA	Monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigen assay
MAILA	Monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigen assay
MAK	monoklonaler Antikörper
MEM	minimum essential medium
MTLA	Medizinisch technische Laborassistentin
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OPD	Ortho-Phenylenediamid Dihydrochlorid
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphate buffered saline
POD	Peroxidase
ROS	reactive oxygen species
sec. AK	sekundärer Antikörper
SHOT	Serious Hazards of Transfusion
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRALI	transfusion related acute lung injury; Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

# 1 Einführung

## 1.1 Epidemiologie und Bedeutung der TRALI

Ein nicht-kardiogenes Lungenödem als Folge einer Bluttransfusion wurde erstmals 1951 von Barnard beschrieben und durch weiterführende Arbeiten von Popovsky und Moore 1983 bzw. 1985 als distinkte klinische Entität definiert (Barnard, 1951; Popovsky et al., 1983; Popovsky et al., 1985). Der Begriff TRALI (transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz) etablierte sich. Diese, im damaligen Klinikalltag noch weitgehend unberücksichtigte Transfusionsreaktion, entwickelte sich in den folgenden Jahren in Großbritannien und den USA zu der häufigsten Ursache für eine Transfusionsreaktion mit Todesfolge (Holness et al., 2004; Stainsby et al., 2007). Das in den Köpfen der Patienten noch so fest verankerte Risiko einer Infektion mit HIV, HCV oder HBV durch kontaminierte Blutkonserven konnte durch die Einführung nukleinsäurebasierter Testverfahren stark reduziert werden. In Deutschland liegt das Risiko einer Virusinfektion mit HIV, HCV oder HBV durch Bluttransfusion derzeit deutlich unter 1:1.000.000 (Sachs und Bein, 2007). Da Zahlen zu Transfusionszwischenfällen in Deutschland nicht regelmäßig vom Paul-Ehrlich-Institut publiziert werden, beziehen sich die folgenden Zahlen auf die Angaben des Britischen Hämovigilanzregisters (Serious Hazards of Transfusion, SHOT), welche bereits seit 1996 jährlich veröffentlicht werden:

	Meldungen 1996 - 2008	Todesfälle 1996 - 2008
TRALI	236	40
Transfusion einer inkorrekten Blutkonserve (incl. ABO- und Anti-D-Inkompatibilität, nicht erforderliche Bluttransfusionen, Fehler in der Handhabung)	3726	26
Akute Transfusionsreaktion ohne Transfusion einer inkorrekten Blutkonserve	834	18
Graft-versus-Host Erkrankung	13	13
Transfusionsassoziierte Infektion (Viren, Bakterien, Pilze)	66	14
Verzögerte Transfusionsreaktion (Immunhämolyse)	396	11
Posttrasfusionspurpura	49	2

**Abbildung 1: Meldungen und transfusionsassoziierte Todesfälle von 1996 bis 2008; SHOT.**

Die mit 3726 hervorstechende Zahl gibt die Meldungen über die Transfusion einer inkorrekten Bluttransfusionen wieder (inklusive AB0- und Anti-D-Inkompatibilität, nicht erforderliche Transfusionen sowie Fehler in der Handhabung), was den Zahlen des SHOT nach der weitaus häufigste Transfusionszwischenfall in dem angegebenen Zeitraum war. Mit 0,7 % waren diese Transfusionszwischenfälle jedoch nur selten tödlich. Auch die Meldungen über eine akute Transfusionsreaktion, die nicht durch die Transfusion einer inkorrekten Blutkonserve hervorgerufen wurde, sowie die Meldungen über eine verzögerte Transfusionsreaktion lagen jeweils über den TRALI-Meldungen; aber auch hier lagen die damit assoziierten Todesfälle jeweils unter 2,8 %. Die Graft-versus-Host Erkrankung ist im angegebenen Zeitraum proportional zu Ihrem Auftreten die häufigste Transfusionsreaktion mit tödlichem Ausgang (100 % tödliche Ausgänge). Jedoch muss beachtet werden, dass die angegebenen Zahlen jeweils Summen der Meldungen bzw. Todesfälle der Jahre 1996 bis 2008 sind - und nach der letzten Meldung im Report 2000/2001 wurde vom SHOT keine Graft-versus-Host Erkrankung mehr verzeichnet. Demnach ist seit 2002 die TRALI sowohl in absoluten Zahlen (40 Todesfälle zwischen 1996 – 2008), als auch in Relation zu Ihrem Auftreten der häufigste Transfusionszwischenfall mit tödlichem Ausgang (16,95 % der aufgetretenen TRALI-Fälle endeten tödlich).

Im Jahre 2004 erarbeiteten das European Haemovigilance Network (EHN) und die Canadian Consensus Conference (Kleinman et al., 2004) eine Liste der Diagnosekriterien der TRALI:

- Akute Atemnot
- Hypoxämie ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$  oder  $\text{O}_2$ -Sättigung  $< 90 \%$  oder andere klinische Hinweise auf Hypoxie)
- Kein Hinweis auf zirkulatorische Überladung oder kardiogenes Lungenödem
- Beginn der Symptomatik während oder innerhalb der ersten sechs Stunden nach Abschluss der Transfusion
- Akute Lungeninsuffizienz nicht vorbekannt und keine alternativen Risikofaktoren für eine akute Lungeninsuffizienz vorliegend (v.a. Aspiration, Polytrauma, Pneumonie, Kardiopulmonaler Bypass, Verbrennungen, toxischer Inhalationsschaden, Pankreatitis, Überdosierung von Medikamenten oder Drogenabusus, Ertrinkungsunfall, Schock, schwere Sepsis)

Eine TRALI gilt demnach als „wahrscheinlich“, wenn alle diese Kriterien erfüllt sind. Beim Auftreten von Risikofaktoren, die zu einer akuten Lungeninsuffizienz anderer Genese führen können, ist die Diagnose TRALI als „möglich“ einzustufen. Als weitere klinische Symptome können Tachykardie, Fieber und Zyanose auftreten. Auskultatorisch kann ein abgeschwächtes Atemgeräusch oder ein Rasseln dominieren. Von Popovsky et al. (1985) sowie von Wallis et al. (2003) wurde publiziert, dass Symptome einer TRALI auch schon unmittelbar während einer Transfusion plasmahaltiger Blutkomponenten auftreten können.

Zusammengefasst kann man sagen, dass die Diagnose einer TRALI oft schwer zu stellen und bei Patienten mit zuvor bereits bestehender akuter Lungeninsuffizienz fast unmöglich ist. Dies rührt nicht zuletzt daher, dass es keinen wegweisenden Laborparameter zum endgültigen Nachweis einer TRALI gibt.

Eine Risikogruppe für die Erkrankung an einer TRALI stellen, klinischen Studien und epidemiologischen Daten nach, Patienten dar, die in den letzten 48 Stunden operiert wurden (Popovsky et al., 1985). Auch klinisch aktive Infektionen, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Leukämien werden als TRALI-Risikofaktor diskutiert (Silliman et al., 1997; Silliman, Bushkov et al., 2003; Holness et al., 2004). Diese Beobachtungen stimmen auch mit *in vivo* Studien überein, bei denen ein verstärktes „priming“ (siehe unten) bei neutrophilen Granulozyten bei Patienten nach chirurgischen Eingriffen und im Rahmen von aktiven Infektionen beobachtet wurde (Bass et al., 1986; Krause et al., 1988; Kawahito et al., 2000).

Die Behandlung der TRALI ist symptomatisch; die Sicherung der Atmung hat oberste Priorität. Bei etwa 30 % der Patienten reicht eine Sauerstoffgabe über Nasensonde aus, um die Sauerstoffsättigung des Blutes aufrecht zu erhalten. 70 % der an TRALI Erkrankten werden intubationspflichtig. Diese maschinelle Beatmung kann nach klinischer Stabilisierung bei drei Viertel der Patienten nach drei Tagen wieder aufgehoben werden (Silliman et al., 2005). Die häufig auftretende Hypotonie sollte durch eine Volumengabe behandelt werden; selten sind Katecholamine induziert. Die Wirksamkeit von Glukokortikoiden ist nicht gezeigt (Silliman et al., 2005).

## 1.2 Histologische Befunde

Ein histologisches Lungenschnittbild eines an einer TRALI verstorbenen Patienten ähnelt dem eines im Frühstadium an akutem respiratorischem Versagen (ARDS) Verstorbenen. Es dominiert neben einem interstitiellen und intraalveolären Lungenödem (Felbo und Jensen, 1962; Flury und Reutter, 1966; Kernoff et al., 1972; Wolf und Canale, 1976; Popovsky und Moore, 1985; Dry et al., 1999) eine Auswanderung von neutrophilen Granulozyten in das Interstitium der Lunge (Kernoff et al., 1972; Wolf und Canale, 1976; Silliman et al., 1997; Dry et al., 1999). Ebenso kann eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in den Pulmonalkapillaren und kleinen Pulmonalgefäßen beobachtet werden (Felbo und Jensen, 1962; Dry et al., 1999), sowie eine hyaline Membranentstehung und die Zerstörung des Lungengerüsts (Wolf und Canale, 1976; Silliman et al., 1997). In einer weiteren, elektronenmikroskopischen Detailaufschlüsselung werden neutrophile Granulozyten gesehen, die sich in engem fokalem Kontakt mit zerstörten Endothelzellen befinden und die als Folge der Aktivierung ihre Granula freigesetzt haben. Folglich kann man sagen, dass sich durch in der Transfusionskomponente enthaltene Mediatoren neutrophile Granulozyten in der Lungenstrombahn ansammeln, diese dort aktiviert werden und so einen Endothelschaden verursachen. Durch das dadurch entstandene Kapillarleck tritt ein Exsudat in das Lungengewebe aus und es entsteht ein Lungenödem, dem die Lungeninsuffizienz folgt. Bei schweren TRALI-Fällen wandern zusätzlich die Granulozyten selbst in das Lungengewebe aus und induzieren „vor Ort“ einen Gewebeschaden.

## 1.3 Pathophysiologie

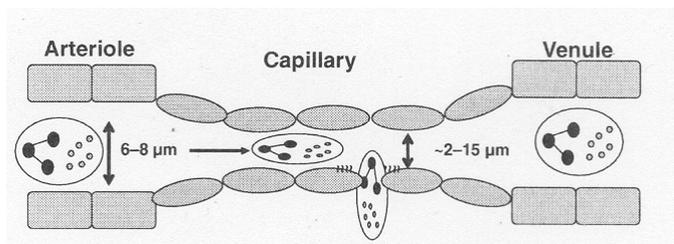
Die genauen pathophysiologischen Ursachen einer TRALI sind derzeit noch nicht vollständig erforscht. Fest steht jedoch, dass es ohne die Aktivierung und das „priming“ von neutrophilen Granulozyten im Lungenkapillarbett nicht zu einer TRALI kommen kann und dass diese somit die entscheidenden Faktoren sind (Silliman et al., 2005; Bux und Sachs, 2007). Diese Aktivierung kommt durch das Zusammenspiel von endogenen Auslösern wie einer Sepsis oder einer Operation und exogenen Faktoren, die durch eine Bluttransfusion übertragen werden können, zustande. Es wird diskutiert, ob die vorliegenden endogenen Auslöser der Grund sind, weshalb manche Risikogruppen prädisponiert sind, an einer TRALI zu erkranken.

Es werden derzeit zwei „Aktivierungs-Modelle“ diskutiert: das Zwei-Stufen-Modell nach Silliman et al. (2006 und 2007) und das Schwellenmodell (siehe Abb. 4) nach Bux und Sachs (2007).

Dem Zwei-Stufen-Modell nach entwickelt sich die TRALI durch die Verknüpfung von zwei Ereignissen (Stufen). Das erste Ereignis bildet die klinische Verfassung oder Grunderkrankung des Patienten, was die Aktivierung der pulmonalen Endothelzellen sowie die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten zur Folge hat. Das zweite Ereignis ist die Transfusion TRALI-auslösender Faktoren, was schließlich zum Endothelschaden und zur TRALI führt.

### 1.3.1 Passage des Lungenkapillarbettes

Innerhalb von 24 Stunden werden bei einem gesunden Erwachsenen mit einem Herz-Zeit-Volumen von 5 l/min 7.200 l Blut durch das pulmonale Kapillarbett gepumpt, wobei in jedem Liter Blut über  $10^9$  Leukozyten enthalten sind. Bei der Anreicherung der Erythrozyten mit Sauerstoff in der Lunge müssen auch diese Leukozyten auf dem Weg von der arteriellen zur venösen Seite das kapillare Lungenstrombett passieren. Da die neutrophilen Granulozyten einen Durchmesser von etwa 8  $\mu\text{m}$  haben, die kleinsten Kapillaren jedoch nur 2  $\mu\text{m}$  im Durchmesser aufweisen (siehe Abb. 2), müssen die neutrophilen Granulozyten die Eigenschaft haben, sich zu verformen. Infolge dieses zeitaufwändigen Prozesses sammeln sich in den rund 50 zu passierenden Alveolarkapillaren neutrophile Granulozyten an. Die Passage durch die Lungengefäße dauert bei einem Neutrophilen etwa 26 Sekunden, wohingegen ein Erythrozyt lediglich 1,4 bis 4,2 Sekunden benötigt (Gebb et al., 1995; Doerschuk, 1999).



**Abbildung 2: Die Passage der neutrophilen Granulozyten durch das pulmonale Kapillarbett. Quelle: Bux und Sachs, 2007. Abdruck mit freundlicher Genehmigung der Autoren.**

### 1.3.2 Auswanderung der aktivierten neutrophilen Granulozyten

Läuft im Körper eine Entzündung ab, wandern Lymphozyten durch Rolling, Adhäsion und Diapedese aus postkapillären Venolen aus und in das geschädigte Gewebe ein. Bei einem entzündlichen Vorgang in der Lunge ist dies anders; hierbei emigrieren die Lymphozyten aus dem Kapillarbett (Loosli und Baker, 1962; Downey et al., 1993; Lee und Downey, 2001). Der durch Entzündungsmediatoren aktivierte neutrophile Granulozyt wandert innerhalb der Lunge auch nicht durch Rolling, Adhäsion und Diapedese aus; es kommt vielmehr, unter anderem durch den Abfall der für die Verformung der Neutrophilen verantwortlichen Faktoren und durch so genanntes „priming“ zu einer Versteifung der Granulozytenmembran (durch intrazelluläre Polymerisation von Aktinfilamenten) und damit zum Verbleiben der Granulozyten in den kleinen Kapillaren (Doerschuk, 1999; Burns et al., 2003; Reutershan und Ley, 2004). Gleichzeitig werden die zuvor nicht-adhäsiven  $\beta_2$ -Integrine des Neutrophilen adhäsiv und verbinden sich mit den ICAM-2 Adhäsionsmolekülen der Kapillarmembran (Issekutz et al., 1999). So kann die Emigration der Granulozyten in das entzündliche Gewebe stattfinden.

### 1.3.3 Priming

Zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten müssen diese mit Entzündungsmediatoren (endogener Faktor) in Kontakt kommen. Zur endgültigen Aktivierung fehlt aber noch das „priming“ der Granulozyten. Das „priming“ kann also als Prozess verstanden werden, der die Immunantwort des aktivierten Granulozyten potenziert. Unter anderem wird dabei der NADPH-Oxidase-Komplex formiert, welcher während der Immunreaktion für die Bildung der reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) in den Granulozyten verantwortlich ist. Typische, das „priming“ auslösende Substanzen sind der Plättchen-aktivierende Faktor PAF (Vercellotti et al., 1988), Interleukin 8 (IL-8) (Daniels et al., 1992), Interferon  $\gamma$  (Tennenberg et al., 1993), Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (Berkow et al., 1987) und der Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor GM-CSF (Fleischmann et al., 1986). Ebenso können infektiöse Agentien wie Lipopolysaccharide (Guthrie et al., 1984) oder auch Viren wie das Influenza A Virus (Busse et al., 1991) zum „priming“ der Granulozyten führen. Auch HLA-Klasse-I-Antikörper (human leucocyte antigens) und HNA-Antikörper (human neutrophil antigens) sind als granulozytenaktivierende Faktoren bekannt (Sachs et al., 2004). Diese Stoffe können entweder durch eine vorbestehende Grunderkrankung des Patienten (Trauma, aktive

Infektion, KHK, Leukämie, chirurgischer Eingriff) vorliegen oder durch eine Bluttransfusion (exogener Faktor) in den Körper des Empfängers gelangt sein. Allerdings sind die meisten der genannten Stoffe nicht in der Lage, die Granulozyten zu aktivieren, sie können diese lediglich „primen“. Manche Substanzen jedoch, wie leukozytenreaktive Antikörper (Sachs et al., 2004; Sachs et al., 2006; Silliman et al., 2006) oder auch die Zytokine L-Selectin und CD18 (Waddell et al., 1994; Liles et al., 1995), sind in der Lage, die Granulozyten sowohl zu aktivieren als auch zu „primen“. *In vitro* Experimente mit humanen neutrophilen Granulozyten zeigten, dass dieser vollständig aktivierte Zustand der Granulozyten etwa 24 Stunden anhält. Danach bedarf es eines neuen „priming“-auslösenden Faktors (Ichinose et al., 1990). Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von Silliman et al. (1997) überein, die besagen, dass eine Operation, um als aktivierender Faktor in Betracht gezogen werden zu können, nicht länger als 48 Stunden zurück liegen darf.

Durch das durch „priming“ ausgelöste Versteifen der Granulozyten und das folglich Verbleiben dieser Zellen in der Lungenstrombahn (Worthen et al., 1989) sind diese den aktivierenden Faktoren stärker ausgesetzt. Es kommt durch eine verstärkte Immunreaktion zur vollständigen Aktivierung und zum Endothelschaden, der das Lungenödem zur Folge hat.

#### **1.3.4 Aktivierung der Endothelzelle im pulmonalen Kapillarbett**

Vielen klinischen und experimentellen Studien nach reichen jedoch aktivierte neutrophile Granulozyten nicht aus, um eine TRALI hervorzurufen. Zusätzlich bedarf es der Aktivierung der Endothelzellen im pulmonalen Kapillarbett durch Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder auch exogen zugeführte Lipopolysaccharide (Silliman et al., 1998; Silliman, Bjornsen et al., 2003) oder Antikörper. Die Endothelzellen regulieren dann die Expression ihrer Oberflächenrezeptoren hoch, sodass der aktivierte Granulozyt andocken kann. Dies sind vor allem L-Selectin-Rezeptoren (Spertini et al., 1991), P-Selectin- und ICAM-1-Rezeptoren (Gerritsen und Bloor, 1993; Klein et al., 1995; Scholz et al., 1996). Studien von Williams und Solomkin (1999) nach kann auch dieser „Andock-Prozess“ zum „priming“ der Granulozyten führen, da aktivierte Endothelzellen unter anderem PAF und IL-8 ausschütten.

### 1.3.5 TRALI durch leukozytenreaktive Antikörper (immunogene TRALI)

Leukozytenreaktive Antikörper (HLA- und HNA-Antikörper) sind in der Lage, neutrophile Granulozyten durch Kontakt mit deren Antigenen sowohl zu aktivieren als auch zu „primen“ und bergen somit ein hohes Risiko, eine TRALI auszulösen (Sachs et al., 2004; Sachs et al., 2006; Kopko et al., 2004; Silliman et al., 2007). In Verbindung mit ihren Arbeiten 1985 berichten Popovsky und Moore von 36 TRALI-Fällen, bei denen in 89 % der Blutspender-Seren Antikörper gegen Granulozytenantigene gefunden wurden (Popovsky und Moore, 1985). Auch anderen Studien nach wurden in 61 – 89 % der Seren von mit TRALI in Verbindung gebrachten Blutspendern solche granulozytenreaktive Antikörper nachgewiesen (Yomtovian et al., 1984; Nordhagen et al., 1986; Eastlund et al., 1989; Bux et al., 1996; Santamaria et al., 1998; Leger et al., 1999; Kopko et al., 2001; Davoren et al., 2003).

Die Blutkomponenten, die solche Antikörper enthalten, sind in der Regel plasmahaltige Blutkomponenten, die von mehrfach schwangeren Frauen stammen. In etwa 30 % der Fälle immunisieren sich schwangere Frauen gegen väterliche Antigene auf den Zellen des Fetus, vor allem gegen Klasse-I- und Klasse-II-Antigene des HLA-Systems (Clay et al., 1984). Im Britischen Hämovigilanzregister (SHOT) sind in der Zeit von 1999 bis 2005 49 TRALI-Fälle registriert, bei denen transfundiertes Plasma oder transfundierte Thrombozyten eindeutig der TRALI-auslösende Faktor war; und alle Spender waren Frauen (Chapman et al., 2006). Die Signifikanz von Spenderplasma mehrfach schwangerer Frauen wurde auch von Palfi et al. (2001) anhand einer prospektiven, randomisierten Studie belegt, in welcher die Transfusion dieses Plasmas zu einem signifikanten Abfall der Blut-Oxygenierung geführt hat, während bei der Transfusion plasmahaltiger Blutkomponenten von männlichen Spendern es in keinem Fall zu Symptomen einer TRALI kam.

Frauen können während ihrer Schwangerschaft auch Antikörper gegen neutrophilenspezifische Antigene ausbilden (Bux und Sachs, 2007). Zu diesen Antigenen gehört unter anderem der niedrig-affine Immunoglobulinrezeptor Fc- $\gamma$ RIIIb (CD16b, HNA-1a), der Adhäsionsrezeptor NB1 (CD177, HNA-2a) und das 5b-Antigen (HNA-3a). Seeger et al. publizierten 1990, dass der HNA-3a-Antikörper in der Lage ist, neutrophile Granulozyten zu aktivieren und zu „primen“; dies wurde durch *in vitro* Versuche belegt (Kopko et al., 2004; Silliman et al., 2007). Sachs et al. wiesen 2004 bzw. 2006 die Fähigkeit der HNA-4a und HNA-2a Antikörper nach, Granulozyten zu „primen“.

Treffen nun die über plasmahaltige Blutkomponenten transfundierten Antikörper auf die korrespondierenden Antigene (HLA-Klasse-I- und/oder HNA-Antigene) auf den

Granulozyten des Empfängers, so kann die Antigen-Antikörper Bindung allein zum „trapping“ der Granulozyten in der Lunge, zur Granulafreisetzung, zum Endothelschaden und damit zum transfusionsinduzierten Lungenödem (TRALI) führen. Es scheint sowohl die Konzentration des Antikörpers als auch dessen Spezifität, sowie die Erkrankung und deren Schwere eine Rolle zu spielen, ob nun eine TRALI ausgelöst wird oder nicht (siehe „Schwellenmodell“). So sind beispielsweise die Antikörper gegen HNA-3a Antigene besonders stark granulozytenaktivierend und bei schweren TRALI-Fällen nachzuweisen (Bux und Sachs, 2007).

Im Gegensatz zu den neutrophilenspezifischen HNA-Antigenen werden Antigene, die mit HLA-Klasse-I-Antikörper korrelieren, auch auf anderen, kernhaltigen Körperzellen wie beispielsweise Endothelzellen exprimiert. Einer tierexperimentellen Studie von Looney et al. (2006) nach können HLA-Klasse-I-Antikörper Granulozyten indirekt aktivieren. Diesen Versuchsergebnissen nach binden die HLA-Klasse-I-Antikörper zunächst an die HLA-Klasse-I-Antigene der Endothelzelle im pulmonalen Kapillarnetz. An den noch freien, herausragenden Fc-Teil der Antikörper binden dann die neutrophilen Granulozyten. Somit sind diese an die Endothelzelle der Kapillarmembran gebunden. Die Quervernetzung zwischen Granulozyten über den Fc-Rezeptor hat dann deren Aktivierung zur Folge.

Im Jahre 2001 veröffentlichten Kopko et al. eine Studie, nach der nun auch HLA-Klasse-II-Antikörper mit TRALI in Zusammenhang gebracht wurden. Es wurden 5 Fälle beschrieben, in denen HLA-Klasse-II-Antikörper und HLA-Klasse-I-Antikörper im Spenderserum nachgewiesen wurden, in zwei Fällen waren sogar nur HLA-Klasse-II-Antikörper im Spenderserum vorhanden. Der genaue pathophysiologische Mechanismus, über den die HLA-Klasse-II-Antikörper eine TRALI auslösen können, ist derzeit noch unklar. Die HLA-Klasse-II-Antigene werden weder auf Granulozyten noch auf Endothelzellen exprimiert (Gosselin et al., 1993); Antikörper gegen diese Antigene führten in Studien von Kao et al. (2003) trotzdem zu einer TRALI. Eine direkte oder indirekte Granulozytenaktivierung wäre demnach nur möglich, wenn die Granulozyten bereits in einem voraktivierten Zustand sind; aktivierte Granulozyten und Endothelzellen exprimieren HLA-Klasse-II-Antigene. Alternativ zu diesem Weg wurde von Kopko et al. (2003) die Bindung der transfundierten HLA-Klasse-II-Antikörper an Monozyten vorgeschlagen. Die dadurch freigesetzten Zytokine sollen dann die Aktivierung der Granulozyten und der Endothelzellen bewirken. Ob dieser Aktivierungsweg jedoch nicht zu unspezifisch und vor allem zu langsam ist, um die binnen Stunden auftretende TRALI-Reaktion zu erklären, ist derzeit umstritten (Bux und Sachs, 2007).

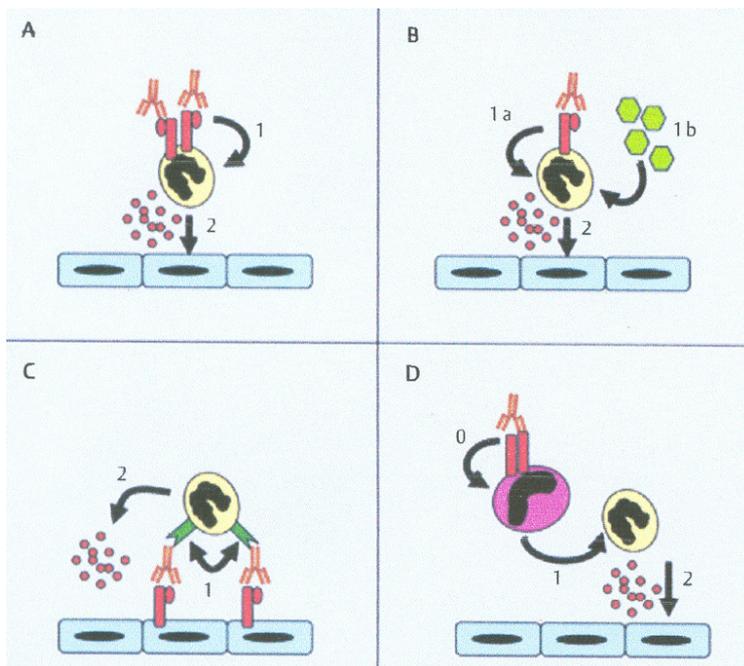


Abbildung 3: Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten als TRALI-Schlüsselmechanismus.

Die meisten TRALI-Reaktionen beruhen auf dem direkten „priming“ des neutrophilen Granulozyten durch den Antikörper (Bild A1 und B1a). Diese TRALI-Reaktion kann durch weitere Faktoren begünstigt werden (Bild B1b). Des Weiteren ist in experimentellen Studien nachgewiesen worden, dass HLA-Klasse-I-Antikörper indirekt zur Aktivierung des neutrophilen Granulozyten führen können, indem die Antikörper am Endothel der Lungenkapillare binden und über ihren freien Fc-Teil Granulozyten rekrutieren (Bild C1). Durch die Quervernetzung kommt es dann zur Aktivierung (Bild C2). Bild D zeigt die indirekte Wirkung durch HLA-Klasse-II-Antikörper. Diese aktivieren zunächst Monozyten (Bild D0), die dann ihrerseits den Granulozyten aktivieren (Bild D1).

Quelle: Sachs und Bein, 2007. Abdruck mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

### 1.3.6 TRALI durch andere Auslöser (nicht-immunogene TRALI)

In seltenen Fällen konnte beobachtet werden, dass eine TRALI auch durch transfundierte Blutkomponenten ausgelöst wurde, welche nur geringe Mengen an Plasma enthielten. So ist beispielsweise in Erythrozytenkonzentraten lediglich noch ein Plasmarestgehalt von 8 ml vorhanden. Auch sind TRALI-Fälle beschrieben, bei denen in Nachuntersuchungen alle plasmahaltigen transfundierten Blutkomponenten frei waren von leukozytenreaktiven Antikörpern. Diese Tatsachen legen den Verdacht nahe, dass noch andere Faktoren in der Lage sind, eine TRALI auszulösen.

Silliman et al. fanden 1998 durch tierexperimentelle Versuche heraus, dass auch Abbauprodukte von Membranproteinen, vor allem Lyso-Phosphatidylcholine, eine TRALI

induzieren können, indem sie über den PAF-Rezeptor die neutrophilen Granulozyten „primen“. Da Blutkomponenten lebende Zellen enthalten, entstehen diese Abbauprodukte während der Lagerung. Jedoch ist festzuhalten, dass diese Membranproteine nicht in der Lage sind, die Granulozyten zu aktivieren. Demnach muss bereits eine Grunderkrankung bei dem Patienten vorliegen, durch die die Granulozyten aktiviert sind. Nur auf diesem Wege kann durch Membranproteine eine TRALI ausgelöst werden.

Eine weitere Substanz, die über das „priming“ der Granulozyten über den CD40-Rezeptor eine TRALI auslösen kann, ist der CD40-Ligand (CD40L) (Khan et al., 2006). Dieser kann in Thrombozytenkonzentraten nachgewiesen werden und bedarf ebenfalls voraktivierter Granulozyten, um effektiv eine TRALI-Reaktion zu triggern.

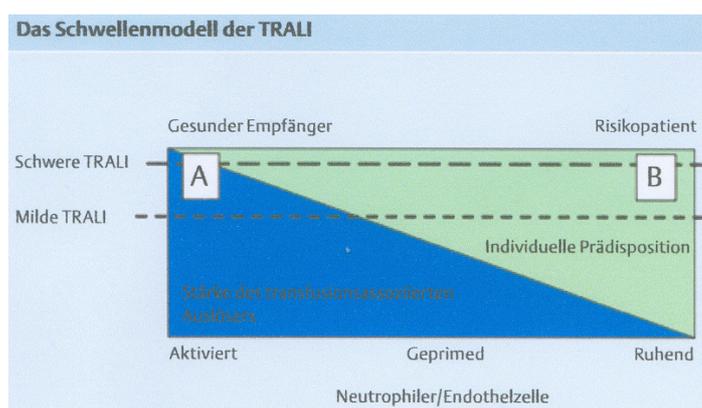
Die theoretische Möglichkeit, dass ein Patient selbst leukozytenreaktive Antikörper besitzt und diese Antikörper Restleukozyten in transfundierten Blutkomponenten aktivieren und „primen“ sollte in Deutschland nach der generellen Leukozytendepletion nicht mehr vorkommen. In Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten beträgt der Restleukozytengehalt  $< 1 \times 10^6$ /Einheit.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Daten zur klinische Relevanz dieser, als nicht-immunogene TRALI zusammengefassten (da nicht durch Antikörper ausgelöst) Fälle noch lückenhaft sind. Silliman et al. veröffentlichten 1997 eine Fall-Kontroll-Studie, nach der länger gelagerte Blutkomponenten mit vermutlich höherem Anteil an Membranabbauprodukten entgegen der Vermutungen kein höheres Risiko für das Auftreten einer TRALI darstellten. Auch liegt die Beatmungsquote bei Patienten mit nicht-immunogener TRALI mit 3 % weit unter der der immunogenen TRALI-Patienten (Beatmungsquote 70 %). Auch die Mortalität wird mit 1 % angegeben statt mit 6-20 % bei durch Antikörper ausgelöster TRALI (Silliman, Bushkov et al., 2003).

Da TRALI-Patienten aber mehreren auslösenden Faktoren ausgeliefert sein können, die sich gegenseitig potenzieren (siehe „Schwellenmodell“), wird derzeit der Einfluss nicht-immunogener Faktoren auf schwere TRALI-Fälle diskutiert.

### 1.3.7 Schwellenmodell

Um eine immunogene TRALI auszulösen, bedarf es einer bestimmten Menge an Antigen-Antikörper-Bindungen. Dies bestätigten tierexperimentelle Studien (Sachs et al., 2006). Demnach reichen kleine Mengen im transfundierten Serum enthaltener Antikörper nicht zum Auslösen einer TRALI aus; die Schwelle ist jedoch unbekannt. Wird im Experiment aber zu neutrophilen Granulozyten fMLP zugegeben, ein Tripeptid, das in der Lage ist, Granulozyten zu „primen“, so liegt die kritische Menge der zum Aktivieren nötigen leukozytenreaktiven Antikörper niedriger, als ohne die Zugabe von fMLP. Diese Beobachtungen stützen die Bedeutung der nicht-immunogenen TRALI und haben zur Entwicklung des Schwellenmodells geführt (Bux und Sachs, 2007). Diesem Modell nach korrelieren mit dem Schweregrad der TRALI (horizontale Linien) neben der Menge der aktivierten Granulozyten durch wenige bzw. viele Antigen-Antikörper-Bindungen auch die Stärke der transfusionsassoziierten Auslöser (dunkelblaues Feld) sowie die individuelle Prädisposition des Patienten (hellblaues Feld). Die Stärke des transfundierten Mediators ist abhängig von dessen Kapazität neutrophile Granulozyten und pulmonale Endothelzellen zu „primen“ oder zu aktivieren. Zu den individuellen Prädispositionen zählen genetische Faktoren sowie die Komorbidität des Patienten. Sind die neutrophilen Granulozyten stark genug aktiviert, so können diese selbst dann eine TRALI auslösen, wenn die individuelle Prädisposition gering ist (A). Ist die Menge der in der Bluttransfusion enthaltenen aktivierenden leukozytenreaktiven Antikörper hoch genug, könnte sogar in einem gesunden Empfänger eine TRALI ausgelöst werden (Brittingham, 1957; Dooren et al., 1998). Sind im Gegensatz dazu die pulmonalen Endothelzellen eines Patienten bereits durch dessen Vorerkrankung geschädigt beziehungsweise aktiviert, so reicht bereits ein geringes „priming“ der neutrophilen Granulozyten aus, um die Schwelle zu überschreiten und eine TRALI auszulösen (B).



**Abbildung 4: Schwellenmodell nach Bux und Sachs, 2007. Abdruck mit freundlicher Genehmigung der Autoren.**

#### **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

Um zu untersuchen, ob das serologische Screening des Bluts der mehrfach schwangeren Spenderinnen eine effektive und durchführbare Methode ist, TRALI-Fälle zu vermeiden, ohne dass Frauen aus der Plasma- und Thrombozytenspende ausgeschlossen werden müssen, wurde diese prospektive Studie am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen durchgeführt.

Um zusätzlich zum ELISA-Kit eine zweite Referenzmethode zum Nachweis von HLA-Klasse-II-Antikörpern etablieren zu können, sollte außerdem das Standard-MAILA-Protokoll verbessert und referenzfähig gemacht werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probensammlung und Probenaufbereitung**

#### **2.1.1 Spenderblut der mehrfach schwangeren Frauen**

Seit Januar 2003 gaben alle Blutspenderinnen am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen in einem Fragebogen die Anzahl ihrer bisherigen Schwangerschaften an. Waren es drei oder mehr Schwangerschaften gelangte eine Probe des von ihnen gespendeten Blutes in das Labor des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen zur Routinekontrolle auf Antikörper gegen Granulozyten- und Leukozytenantigene. Plasmareiche Blutkomponenten dieser Spenderinnen wurden nur dann zur Transfusion freigegeben, wenn das serologische Screening negativ ausfiel. Die Testergebnisse wurden archiviert und zur Auswertung kamen alle erfassten Spenderinnen von Januar 2003 bis Dezember 2006. Als Kontrollgruppe dienten Blutproben von 40 männlichen Spendern ohne Transfusionsanamnese. Von allen Spendern wurde eine Einwilligung gemäß der Ethik Kommission unterschrieben.

#### **2.1.2 Gewinnung von Serum**

Als Untersuchungsmaterial diente Serum oder EDTA-Plasma, im Folgenden „Probe“ genannt, der mehrfach schwangeren Blutspenderinnen.

Zur Gewinnung des Serums wurde die venöse Vollblutproben maximal 1 h nach der Blutentnahme für 5 min bei  $2500 \times g$  zentrifugiert, der abgenommene Serumüberstand aliquotiert und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Zur Gewinnung des EDTA-Plasmas wurde die mit EDTA ungerinnbar gemachte Vollblutprobe nach maximal 6 h bei  $2500 \times g$  für 5 min zentrifugiert und die Plasmaprobe bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

## 2.2 Methoden zum Nachweis von granulozytenreaktiven Antikörpern

### 2.2.1 Isolierung von Granulozyten aus Spenderblut

Die Methode zur Isolierung von Granulozyten durch Dichtegradientenzentrifugation basierte auf einer modifizierten Methode nach Böyum (1968).

Das Spenderblut stammte von Spendern mit definiertem, homozygotem Granulozyten-Antigenmuster aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen. Je Spender wurden zwei Polyröhrchen mit Vollblut angesetzt. Zu 10 ml maximal 2-3 h altem EDTA-Blut wurden zur Sedimentation der Erythrozyten 2,5 ml 5% Dextranlösung zugegeben und für 30 min bei 37 °C in 45° Schräglage inkubiert. Der Überstand wurde auf 2 × 2,5 ml Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aufgeschichtet und 20 min bei 250 × g zentrifugiert.

Im Sediment befanden sich nun die Granulozyten und ein Rest agglutiniertes Erythrozyten; als Zwischenschicht war die Ficoll Lösung sichtbar und darüber eine Phase, in der sich die Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten befanden. Zuoberst verblieb das nahezu zellfreie Plasma.

Nach dem Abnehmen des gesamten Überstandes wurde das Granulozyten-Erythrozyten-Sediment mit 2 ml Ammoniumchloridlösung (8,3 g Ammoniumchlorid, 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat und 0,037 g Titriplex in 1 Liter Aqua ad iniectabilia lösen, pH 7,0 – 7,4) zur Lyse der Erythrozyten durchmischt und 5 min im Eiswasserbad inkubiert. Zum Waschen wird mit 1 × DPBS (200 ml 10 × DPBS in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) aufgefüllt und 5 min bei 115 × g zentrifugiert. Die Granulozyten eines Spenders wurden nun zusammengegeben, der Waschschrift wiederholt und der Überstand verworfen.

Für den Agglutinationstest wurden die Granulozyten in 100 µl autologem Plasma aufgenommen.

#### 2.2.1.1 Granulozytenfixierung

Für den GIFT, den GAT und den MAIGA wurden die Granulozyten wie folgt fixiert:

Zu dem Granulozytenpellet wurden 2 ml 1% Paraformaldehyd zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der oben beschriebene Waschvorgang wurde 2-mal wiederholt und die Granulozyten in 200 µl 1 × DPBS aufgenommen.

Für den Agglutinationstest (GAT) und den Immunfluoreszenztest (GIFT) mussten die Granulozyten noch am selben Tag verwendet werden; für den MAIGA konnten die fixierten Granulozyten bis zu drei Tage bei  $4 \pm 2$  °C gelagert werden.

### 2.2.2 Granulozytenimmunfluoreszenztest (GIFT)

Der GIFT basiert auf der Nachweismethode eines indirekten Immunfluoreszenztests und wird zum Nachweis von Antikörpern gegen Antigene auf Granulozytenmembranen eingesetzt. Diese Methode wurde erstmals von Verheugt et al. (1978) beschrieben.

Als Untersuchungsmaterial diente Serum oder EDTA-Plasma.

Nach dem Auftauen der Proben und Kontrollen (Negativ- und Positivkontrolle) wurden diese 5 min bei  $13.000 \times g$  zentrifugiert und anschließend die Proben sowie die Negativkontrolle 1:2 mit  $1 \times DPBS$  (200 ml  $1 \times DPBS$  in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) verdünnt. In eine 96-Loch-Rundbodenmikrotiterplatte wurden jeweils  $4 \times 40 \mu\text{l}$  verdünnte Probe,  $40 \mu\text{l}$  verdünnte Negativkontrolle und  $10 \mu\text{l}$  unverdünnte Positivkontrolle pipettiert. Nun gab man je Well  $40 \mu\text{l}$  Granulozyten ( $2,0 \times 10^5$  Zellen) zu, welche zuvor aus Spenderblut isoliert wurden. Es wurden vier verschiedene Spendergranulozyten mit unterschiedlichen, bekannten homozygoten Antigenmustern (HNA-1a, HNA-1b, HNA-4a und HNA-5a) eingesetzt, weshalb zuvor jeweils ein Vierfachansatz von Probe, Negativ- bzw. Positivkontrolle pipettiert wurde. Die Inhalte der Wells wurden auf dem Rüttler gemischt und 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Waschen wurden anschließend  $120 \mu\text{l}$   $1 \times DPBS$  je Well zugegeben, 30 sec bei  $160 \times g$  in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zurück blieb ein Granulozyten-Pellet. Dieser Schritt wurde mit  $200 \mu\text{l}$   $1 \times DPBS$  zwei weitere Male wiederholt. Nun erfolgte die Zugabe von  $40 \mu\text{l}$  (1:40 mit  $1 \times DPBS$  verdünnt) fluoreszierendem Kaninchen-F(ab')<sub>2</sub>-anti-Human-IgG, -IgA oder -IgM (DAKO, Hamburg, Stammlösung: 1 mg/ml) je Vertiefung. Dies wurde auf dem Rüttler vermischt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Die Waschschrte wurden wie beschrieben wiederholt. Anschließend wurde zu jedem Granulozytenpellet ein Tropfen Glycerin/PBS (30 ml Glycerin mit 10 ml  $1 \times DPBS$  gemischt) zugegeben,  $100 \mu\text{l}$  des Gemischs auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zur Beurteilung der Fluoreszenzstärke am Fluoreszenzmikroskop, und damit der Bewertung der Proben als negativ oder positiv, wurden die Objektträger im Dunkeln gelagert.

### 2.2.3 Granulozytenagglutinationstest (GAT)

Dieser Agglutinationstest dient zum Nachweis freier agglutinierender Antikörper im Serum gegen Antigene auf Granulozytenmembran.

Die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proben und Kontrollen wurden nach dem Auftauen 5 min bei  $13.000 \times g$  zentrifugiert und anschließend Proben und Negativkontrolle 1:2 mit  $1 \times \text{DPBS}$  (200 ml  $10 \times \text{DPBS}$  in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) verdünnt. Jede Probe, Positiv- und Negativkontrolle wurde mit vier verschiedenen, aus Spenderblut isolierten Granulozyten unterschiedlicher homozygoter Antigenmuster (HNA-1a, HNA-1b, HNA-4a und HNA-5a) angesetzt. In zwei Terasaki-Mikrotiterplatten wurden je Vertiefung  $2\text{ }\mu\text{l}$  unfixierte Granulozyten, eingestellt auf  $5 \times 10^3$  Zellen, unter Paraffinöl pipettiert und je  $6\text{ }\mu\text{l}$  Probe bzw. Kontrolle zugegeben. Die eine Platte wurde nach 2 h Inkubationszeit bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter dem Durchlicht-Mikroskop (Auflicht) abgelesen und die zweite nach 12 h Inkubation bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Je nach Anzahl der agglutinierten Zellen war eine Probe als negativ (keine Agglutination) oder positiv (ca. 60 % agglutinierte Zellen) zu werten.

### 2.2.4 Monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigen assay (MAIGA)

Dieses Testverfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Antigene auf Granulozytenmembranen beruht auf der Basis eines glykoproteinspezifischen Enzym-Immunoassays und wurde von Bux et al. (1993) entwickelt. Dabei binden ausgewählte glykoproteinspezifische monoklonale Antikörper der Maus an das Glykoprotein der Granulozytenmembran. Der Antikörper aus dem Patienten-Serum oder -Plasma kann, wenn vorhanden, an einem anderen Epitop desselben Glykoproteins binden. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird durch Lyse der Granulozyten aus der Membran herausgelöst und über einen sekundären Antikörper an die Wandung einer Flachbodenmikrotiterplatte fixiert. Ein Peroxidase-markierter Tertiärantikörper bindet an den humanen Antikörper. Durch Oxidation des Substrats Ortho-Phenylendiamin wird ein Farbumschlag nach gelb sichtbar. Die Substratumsetzungsreaktion wird mit  $4\text{ M H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt.

Zur Inkubation über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde eine Mikrotiterflachbodenplatte folgendermaßen am Vortag beschichtet: 10 ml Coating-Puffer (0,3975 g Natriumcarbonat, 0,7325 g Natriumhydrogencarbonat, 0,05 g Natriumazid in 250 ml Aqua dest. gelöst und auf pH 9,6 eingestellt) wurden mit  $20\text{ }\mu\text{l}$  Fc $\gamma$ -Fragment spezifischem Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova,

Hamburg, Stammlösung: 1,8 mg/ml) gemischt und davon 100 µl je Well pipettiert; die Konzentration betrug 3 µg/ml.

Am ersten Tag wurden zuerst 50 µl der Proben, sowie der Positiv- und Negativkontrollen (Positiv- und Negativkontrollen stammten von getesteten Spendern aus der Blutbank der Universität Gießen), welche nach dem Auftauen für 5 min bei  $13.000 \times g$  zentrifugiert wurden, mit 100 µl Granulozytensuspension aus fixierten Granulozyten ( $10 \times 10^3$  Zellen je µl PBS/BSA 0,2% (0,2 g BSA (fraction V) in 100 ml  $1 \times$  DPBS gelöst)) auf einer Rundbodenmikrotiterplatte gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Mal gewaschen, indem je Well 50 µl PBS/BSA 0,2% zugegeben, 30 sec bei  $160 \times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Zu den Zell-Pellets wurden dann jeweils 50 µl PBS/BSA 2% (2 g BSA (fraction V) in 100 ml  $1 \times$  DPBS gelöst) und 10 µl des entsprechenden monoklonalen Antikörpers (in der Konzentration von 0,02 mg/ml) zugegeben, kurz gerüttelt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die Frage beantworten zu können, ob der nachzuweisende Antikörper in der Probe gegen HNA-1a, -1b oder -1c gerichtet ist, wurde der monoklonale Antikörper (MAK) CD 16, Klon 3G8 (Beckman Coulter, Krefeld) sowie der MAK CD16, Klon BW209 (Behring, Schwalbach) verwendet. Gegen HLA-Klasse-I wurde der Zellüberstand W6/32, gegen HNA-2a der Überstand 7D8 eingesetzt (Stroncek et al., 1996). Beide Zellüberstände mit den darin enthaltenen monoklonalen Antikörpern stammten aus dem Labor von Dr. D. F. Stroncek und L. T. Clement, Minneapolis, USA sowie Organon Teknika/Biotechnology Research Institute, Rockville, USA und wurden unserem Labor freundlicherweise von Dr. Stroncek zur Verfügung gestellt. Zum Nachweis des Antikörpers gegen HNA-4 bzw. -5 standen die monoklonalen Antikörper MAK CD 11b, Klon BEAR 1, CD 11a, Klon 25.3 und CD 18, Klon 7E4 (MAKs von Beckman Coulter, Krefeld) zur Verfügung. Für jeden Antikörper wurden ebenfalls eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt.

Nach 30 min Inkubationszeit wurde erneut drei Mal gewaschen, indem die Wells der Rundbodenmikrotiterplatte mit PBS/BSA 0,2% aufgefüllt, 30 sec bei  $160 \times g$  abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde zu jedem Pellet 100 µl Lysepuffer (2,4 g Tris, 8,76 g Natriumchlorid, 9,5 ml Triton-X 100, 1,86 g Tritriplex in 1 l Aqua dest. gelöst und auf pH 7,4 eingestellt) mit Proteaseinhibitor (950 µl Lysepuffer mit 50 µl Protease-Inhibitor-Cocktail) gegeben, auf dem Rüttler kurz gemischt und in Eppendorfhütchen

überführt. Diese wurden zuerst bei 4 °C 30 min inkubiert und anschließend bei 4 °C 30 min bei 13.000 × g zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde die am Vortag gecoatete Flachbodenplatte ausgeklopft, mit 200 µl PBS/BSA 0,2% je Well gefüllt und bei 4 °C 1 h inkubiert. Neue Eppendorfhütchen wurden mit 180 µl MAINA-Waschpuffer (1,21 g TRIS, 9,5 ml Triton-X 100, 4,5 ml Tween 20, 0,0725 g Calciumchlorid-Dihydrat in 1 l isotonischer Kochsalzlösung lösen und auf pH 7,4 einstellen) mit 0,2 % BSA gefüllt und bei 4 °C etwa 1 h inkubiert.

Nach dem Zentrifugieren wurden 70 µl des Überstandes in die mit 180 µl MAINA-Waschpuffer/0,2 % BSA gefüllten Eppendorfhütchen überführt und gemischt. Davon wurden anschließend je 2 × 100 µl auf die gecoatete Flachbodenplatte gegeben (Doppelbestimmung), welche zuvor 5 × mit PBS/Tween 20 0,05% (100 ml 1× PBS mit 50 µl Tween 20) gewaschen wurde.

Als Leerwert wurde MAINA-Waschpuffer/0,2 % BSA verwendet. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde die Mikrotiterplatte 5 × mit PBS/Tween 20 0,05% gewaschen, indem in jede Vertiefung 200 µl pipettiert wurden, das PBS/Tween 20 0,05% anschließend abgekippt und die Platte ausgeklopft wurde. Pro Well wurden dann 100 µl Sekundärantikörper (2,5 µl Ziege-anti-Human-IgG Fcγ-Fragment spezifisch Peroxidase markiert (Dianova, Hamburg, Stammlösung: 0,8 mg/ml) in 10 ml MAINA-Waschpuffer/0,2 % BSA zugegeben, 2 h bei 4°C inkubiert und erneut 6 × mit PBS/Tween 20 0,05% gewaschen. Danach wurden je Well 100 µl Substratpuffer (3 ml Aqua ad iniectabilia, eine Tablette OPD (DAKO, Hamburg) und 1,25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt) zugegeben und bei Raumtemperatur 15 min im Dunkeln inkubiert.

Die Substratumsatz-Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und am Plattenphotometer bei 492 nm gemessen.

## 2.3 Methoden zum Nachweis von HLA-Antikörpern

### 2.3.1 Isolierung von Lymphozyten aus Spenderblut

Das frisch entnommene Spenderblut stammte von Spendern aus der Blutbank des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen.

Bis zur Auftrennung der Blutbestandteile nach Dichtegradient wurde die Isolierung der Lymphozyten (Böyum, 1968) genauso durchgeführt wie die Isolierung der Granulozyten. Nach dem Zentrifugieren wurde der Lymphozytenring mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Die Lymphozyten wurden anschließend mit  $1 \times$  DPBS (200 ml  $10 \times$  DPBS in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) 10 min bei  $450 \times g$  gewaschen. Der zweite Waschschrift erfolgte für 5 min bei  $245 \times g$ . Nach Abkippen des Überstandes wurden die Lymphozyten vorsichtig aufgeschüttelt.

#### 2.3.1.1 Lymphozytenfixierung

Durch Zugabe von 2 ml 1% Paraformaldehyd wurden die Zellen für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert. Das Paraformaldehyd wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit  $1 \times$  DPBS bei  $245 \times g$  (5 min) entfernt. Das Pellet wurde in 200 – 400  $\mu$ l (je nach Zellmenge)  $1 \times$  DPBS aufgenommen. Die fixierten Lymphozyten wurden bei 2 – 8 °C gelagert und noch am selben Tag im LIFT eingesetzt.

### 2.3.2 Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT)

Diese Methode dient dem Nachweis von Antikörpern im Spenderplasma gegen HLA-Klasse-I -Antigene auf Lymphozytenmembranen. Das Nachweisprinzip ist ein indirekter Immunfluoreszenztest.

Die Durchführung des LIFT verläuft gleich der Durchführung des GIFT, mit dem Unterschied, dass statt 40  $\mu$ l verdünnter Probe und Negativkontrolle beim LIFT 20  $\mu$ l eingesetzt werden und auch die eingesetzte Zellzahl und Zellart variiert. Beim LIFT werden 40  $\mu$ l Lymphozyten mit einer Konzentration von  $15 \times 10^3$  Zellen/  $\mu$ l je Vertiefung eingesetzt. Nach dem letzte Waschschrift wird jedes Lymphozytenpellet mit 100  $\mu$ l PBS versetzt, in ein Röhrchen zur Messung am Durchflusszytometer (FACS) überführt und bis zur Auswertung im Dunkeln aufbewahrt.

### 2.3.3 Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von HLA-Antikörpern

Die in den Proben vorhandenen IgG-Antikörper gegen HLA-Klasse-I- oder HLA-Klasse-II-Antigene binden an das Antigen in den Kavitäten der Mikrotiterplatte. Nichtgebundene Antikörper werden durch Waschprozesse entfernt. Zur Darstellung der gebundenen Antikörper wird mit einem enzymmarkierten Anti-Human-IgG (Konjugat) inkubiert. Dieses katalysiert anschließend in Kombination mit dem entsprechenden Substrat eine Farbreaktion. Nach dem Abstoppen der Reaktion wird diese photometrisch gemessen (Ruder et al., 1984; Zachary et al., 2001).

Verwendet wurden Testkits der Firma Biotest, Dreieich. Zur Verfügung standen AbScreen-Kits zum Screenen der Proben, bei denen hochgereinigte HLA-Klasse-I bzw. Klasse-II-Antigene eines großen Pools humaner Thrombozyten bzw. Lymphozyten auf den Testplatten aufgebracht waren. Ebenso wurden AbIdent-Kits mit verschiedenen spezifischen HLA-Klasse-I- bzw. Klasse-II-Antigenmustern je Kavität zur Identifizierung der Subklasse des in der Probe enthaltenen HLA-Antikörpers verwendet.

Die Methodendurchführung war für alle Kits (AbScreen HLA-Klasse-I ELISA Kit, AbScreen HLA-Klasse-II ELISA Kit, AbIdent HLA-Klasse-I ELISA Kit und AbIdent HLA-Klasse-II ELISA Kit) gleich. Das Pipettierschema richtete sich nach dem im Kit mitgelieferten Schema.

In jede Kavität wurden 250 µl Waschpuffer (Waschpufferkonzentrat 1:10 verdünnt) gegeben und 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschpuffer wurde anschließend durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Die Proben bzw. Kontrollen wurden nach folgendem Schema verdünnt:

	(Menge je Platte) AbScreen HLA-I bzw. HLA-II	(Menge je Probe) AbIdent HLA-I	(Menge je Probe) AbIdent HLA-II
Probe	60 µl Probe + 60 µl Verdünnungspuffer	550 µl Probe + 1650 µl Verdünnungspuffer	425 µl Probe + 1275 µl Verdünnungspuffer
Positiv-Kontrolle	60 µl Positivkontrolle + 60 µl Verdünnungspuffer	20 µl Positivkontrolle + 60 µl Verdünnungspuffer	50 µl Positivkontrolle + 150 µl Verdünnungspuffer
Negativ-Kontrolle	110 µl Negativkontrolle + 110 µl Verdünnungspuffer	60 µl Negativkontrolle + 180 µl Verdünnungspuffer	75 µl Negativkontrolle + 225 µl Verdünnungspuffer

**Abbildung 5: Pipettierschema des ELISA**

Die Platte wurde nach dem im Testkit mitgelieferten Pipettierschema mit 50 µl je Kavität der Proben- bzw. Kontrollverdünnung beschickt. Die für den Leerwert vorgesehenen Vertiefungen blieben frei. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit Folie abgedeckt und 40-45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte 4 × mit je 250 µl ELISA-Washer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift gut auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Je Kavität, mit Ausnahme der Leerwerte, wurden 50 µl verdünnter Konjugatlösung (Konjugat 1:100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt) zugegeben, die Platte mit Folie abgedeckt und bei 37 °C erneut 40-45 min inkubiert. Die Platte wurde danach erneut 4 × mit je 250 µl ELISA-Washer gewaschen.

Der Inhalt eines Substrat-Fläschchens wurde in 500 µl Aqua dest. gelöst und 1:100 mit Substratverdünnungspuffer verdünnt. Von der fertigen Substrat-Gebrauchslösung wurden je Kavität, mit Ausnahme der Blanks, 100 µl pipettiert und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Stopp-Lösung je Vertiefung (auch in die Blanks) zugegeben.

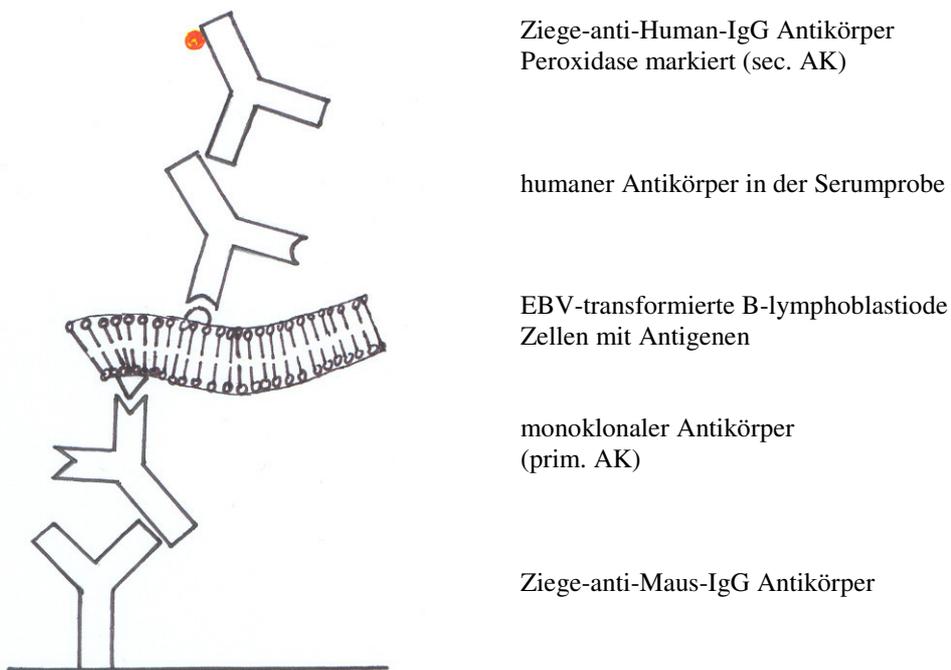
Die photometrische Messung erfolgte bei 405 (bzw. 410) nm / Referenzwellenlänge 490 (bzw. 492) nm innerhalb 15 min nach dem Abstoppen.

#### **2.3.4 Monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigen assay (MAILA (Standardprotokoll))**

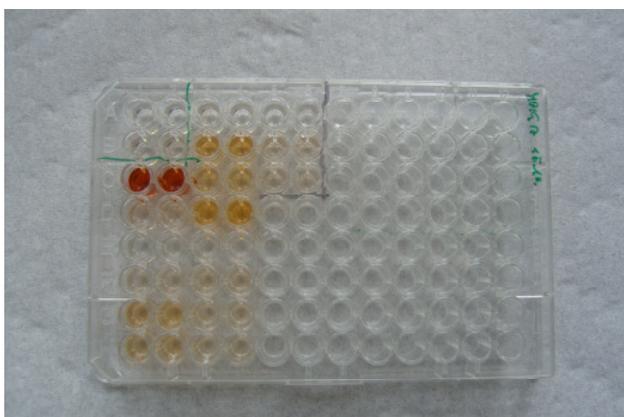
Da das MAILA-Standardprotokoll aus dem MAIGA-Protokoll entstand, ähneln sich die Protokolle der beiden Antikörper-Nachweisverfahren. Bei dem MAILA wurden als Antigenkomponente fixierte EBV-transformierte (Epstein-Barr-Virus-transformierte) B-lymphoblastoide Zellen aus unserer Zellkultur (siehe „Fixierung der B-lymphoblastoiden Zellen (Standardprotokoll)“) verwendet, welche in einer Konzentration von 50 µl ( $10 \times 10^3$  Zellen je µl PBS/BSA 0,2% (0,2 g BSA (fraction V) in 100 ml 1 × DPBS gelöst)) je 50 µl Probe eingesetzt wurden.

Zum Coaten der Flachbodenplatte wurde ein Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova, Hamburg, Stammlösung: 1,8 mg/ml) eingesetzt. Als monoklonaler, primärer Antikörper wurden zu den Proben und der Negativkontrolle je 10 µl Maus-anti-Human-HLA-DR Antikörper Klon G46-6 (BD Biosciences, Heidelberg, Stammlösung: 0,5 mg/ml) in der Konzentration 0,02 mg/ml auf 50 µl PBS/BSA 0,2% verwendet; der monoklonale Antikörper bei der

Positivkontrolle war der Zellüberstand W6/32. Als sekundärer Antikörper wurde ein Ziege-anti-human-IgG POD Antikörper (Dianova, Hamburg, Stammlösung: 0,8 mg/ml) in der Verdünnung 2,5 µl / 10 ml MAINA verwendet. Die Konzentrationen glichen den entsprechenden Konzentrationsangaben beim MAIGA.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Reaktionen im MAILA**



**Abbildung 7: Darstellung einer MAILA-Testplatte**

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 Herstellung Epstein-Barr-Virus-haltigen Kulturüberstandes

Die zur EBV-Transformation benötigte Zelllinie des Krallenaffen *Sanguinis oedipus* (Callitrichidae) B95-8 (ATCC, Rockville, Maryland, USA), die als Virus-Quelle diente, wurde in 40 ml-Zellkulturflaschen 3-6 Wochen bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) im Brutschrank kultiviert. Alle vier bis sechs Tage wurde das IMDM-Kulturmedium gewechselt (IMDM mit Glutamax I (Gibco/BRL, Eggenstein), 4 % MEM alpha Medium mit L-Glutamin, Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden (PAA Laboratories, Cölbe), 15 % FCS, 0,5 % Penicillin/Streptomycin 7,7 mM Insulin, 1,15 Oxalacetat), welches bei -20 °C gelagert wurde.

Zur Ernte des EBV-haltigen Kulturüberstandes wurden die Zellen in ihrem Medium resuspendiert und in einem Blue-cap bei -20 °C für 2 h eingefroren. Dadurch wurde die Zellmembran zerstört und das intrazelluläre EBV-Genom freigesetzt. Durch Zentrifugieren bei 4000 × g für 30 min in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge wurde der Zelldetritus vom Überstand getrennt und verbliebene Membranreste durch einen 0,45 µm Filter aus dem Überstand entfernt. Dieser EBV-Genom-haltige Überstand wurde bis zum Gebrauch in 2 ml Aliquots bei -70 °C gelagert (Santoso et al., 2002).

### 2.4.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Ausgangsmaterial zur EBV-Transformation ist steriles, mit EDTA antikoaguliertes Vollblut von Spendern mit phänotypisierten HLA-Antigenmustern. Diese Spender stammten aus der Spenderdatei der Blutbank des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen.

In Blue-caps wurden je 20 ml Ficoll-Paque Research Grade (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) vorgelegt, auf die durch Schräghalten des Röhrchens je 20-30 ml verdünntes Vollblut (je 40-60 ml des Vollblutes wurden unter sterilen Umgebungsbedingungen mit der doppelten Menge phosphatgepufferter Kochsalzlösung verdünnt) steril geschichtet wurde. Nach 35minütigem Zentrifugieren, basierend auf dem Prinzip der Trennung nach Dichtegradienten, bei 570 × g bildeten nun die Erythrozyten als dichteste zelluläre Bestandteile des Blutes die Bodenschicht; darüber befanden sich die Granulozyten. Über der

Ficoll-Paque ordneten sich Lympho-, Mono- und Thrombozyten als voneinander getrennte Interphasen an, während das Plasma die oberste Phase bildete. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde dann der Interphasering abgenommen und in ein 50 ml Blue-cap überführt. Das anschließende 3malige Waschen der Zellen mit 45 ml 1 × DPBS (200 ml 10 × DPBS in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) bei 10minütigem Zentrifugieren bei  $570 \times g$  diente dem Reinigen der Zellen von evtl. noch vorhandenen Plasma- oder Ficollresten. Die Zellen wurden dann in 45 ml 1 × DPBS aufgenommen und bei  $120 \times g$  für 20 min zentrifugiert. So sedimentierten die Lymphozyten, während die Thrombozyten im Überstand verblieben und abgesaugt werden konnten. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml RPMI-1640-Medium (mit L-Glutamin und 2 % FCS; PAA Laboratories, Cölbe) resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen mit RPMI-1640-Medium (mit L-Glutamin und 2 % FCS; PAA Laboratories, Cölbe) auf eine Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.4.3 EBV-Transformation

Zu 1 ml der aus Vollblut isolierten Lymphozyten ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) (in RPMI-1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe) und 2 % FCS) wurden in einem 50 ml Blue-cap 150  $\mu$ l immunsuppressives H-Leucyl-L-Leucin-Methylester-Hydrobromid (Bachem, Heidelberg; 9,4 mg in 55,3  $\mu$ l Methanol lösen und zu 11,06 ml RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin zugeben) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das H-Leucyl-L-Leucin-Methylester-Hydrobromid wirkt in dieser Konzentration toxisch gegenüber NK-Zellen, T-Lymphozyten und Monozyten, die so eliminiert wurden (Thiele et al., 1986). Durch Auffüllen des Blue-cap mit RPMI-1640-Medium (mit L-Glutamin und 2 % FCS; PAA Laboratories, Cölbe) und anschließendes Zentrifugieren für 12 min bei  $350 \times g$  wurde die Reaktion abgestoppt. Das Medium wurde verworfen und die Zellen zwei Mal mit RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe) / 2 % FCS gewaschen (Zentrifugation bei  $350 \times g$  für 12 min). Anschließend wurde das B-Lymphozytenpellet in 2 ml gerade aufgetautem EBV-haltigem Überstand aufgenommen, in eine sterile PetriPerm-Schale überführt und für 2 h bei 37 °C unter CO<sub>2</sub> Begasung im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml IMDM-Wachstumsmedium (IMDM mit Glutamax I (Gibco/BRL, Eggenstein), 4 % MEM alpha

Medium mit L-Glutamin, Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden (PAA Laboratories, Cölbe), 15 % FCS, 0,5 % Penicillin/Streptomycin 7,7 mM Insulin, 1,15 Oxalacetat) folgte eine Inkubationszeit von 16 h bei 37 °C unter CO<sub>2</sub> Begasung im Brutschrank (Sugden, 1982).

Danach wurden die angehefteten Zellen mit 2 ml frischem IMDM-Wachstumsmedium resuspendiert, in eine 40 ml Zellkulturflasche überführt und diese stehend im Brutschrank bei 37 °C unter CO<sub>2</sub> Begasung für 10 Tage inkubiert. Zeigte das Medium frühzeitig einen Farbumschlag von rot nach gelb durch die Anreicherung von saueren Stoffwechselprodukten, wurde 0,5 ml IMDM-Wachstumsmedium zugegeben.

Die Zellen wurden weitere vier bis sechs Wochen kultiviert und bei Farbumschlag des Mediums wurde dieses unter vorsichtigem Abnehmen gewechselt.

Danach war die Zelldichte so hoch, dass die Zellaggregate durch Resuspendieren getrennt und auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt werden konnten.

Nach weiteren vier bis sechs Wochen Kultivierung wurden die Zellen eingefroren.

#### **2.4.4 Auftauen**

Die eingefrorenen Zellen wurden sofort nach der Entnahme aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, anschließend in ein Blue-cap überführt und langsam 8 ml RPMI-Wachstumsmedium (RPMI-1640-Medium mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt) zugegeben. Dann wurde bei 160 × g 5 min zentrifugiert und der Mediumüberstand verworfen (das mit den Zellen in Kontakt gekommene Medium musste anschließend sterilisiert werden). Die Zellen wurden in 5 ml frischem, bei 37 °C vorgewärmtem RPMI-Wachstumsmedium aufgenommen, in eine Kulturflasche überführt und stehend bei 37 °C und CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert.

### **2.4.5 Kultivierung**

Die Zellen wurden immer bei 37 °C und CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert. Ein nach drei bis vier Tagen zunehmender Farbumschlag des im RPMI-Medium (RPMI-1640-Medium (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt) enthaltenen Phenolrots von rot nach gelb wies die Anreicherung von sauren Stoffwechselprodukten nach. Je nach Färbung wurde überständiges angesäuertes Medium mit einer sterilen Pipette unter sterilen Umgebungsbedingungen abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt oder nur 2-4 ml frisches, bei 37 °C vorgewärmtes RPMI-Medium zugegeben.

B-lymphoblastoide Zellen wachsen in Suspension und haben die Eigenschaft zu verklumpen. Nach etwa drei Tagen sind bereits kleine Zellaggregate unter dem Mikroskop zu erkennen, sodass etwa ein Drittel der Zellen zu Versuchszwecken entnommen werden konnten. Dazu wurden die Zellaggregate vorsichtig resuspendiert und ein Drittel der Zellsuspension in ein Blue-cap überführt. Die in der Kulturflasche verbliebenen Zellen wurden mit 5 ml frischem RPMI-Medium versetzt und weitere Tage kultiviert.

### **2.4.6 Fixierung B-lymphoblastoider Zellen (Standardprotokoll)**

Die aus der Zellkultur entnommenen Zellen wurden in einem Polyröhrchen 5 min bei 160 × g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1.500 µl 1 × DPBS (200 ml 10 × DPBS in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) sowie 500 µl 4% Paraformaldehydlösung (Sigma-Altrich, Steinheim) resuspendiert. Die Zellen inkubierten 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Zugabe von 6 ml 1 × DPBS wurde 5 min bei 160 × g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das Zellpellet wurde in etwa 200 µl PBS/BSA 0,2% (0,2 g BSA (fraction V) in 100 ml 1 × DPBS gelöst) aufgenommen.

Anschließend wurden die fixierten Zellen im MikroZellcounter CC-130 (Sysmex, Colara Messtechnik, Lorch) gezählt und auf 1 × 10<sup>4</sup> Zellen je µl PBS/BSA 0,2% eingestellt.

### **2.4.7 Kryokonservierung**

Etwa zwei bis vier Tage nach Entnahme der für die im MAILA verwendeten Zellen konnten die übrigen Zellen aus der Kultur eingefroren werden. Dazu wurden alle Zellen nach vorsichtigem Resuspendieren einschließlich des RPMI-Mediums entnommen, in ein Blue-cap überführt und bei  $160 \times g$  5 min zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen und die Zellen in 800  $\mu$ l frischem RPMI-Wachstumsmedium (RPMI-1640-Medium (PAA Laboratories, Cölbe) mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt) aufgenommen. Anschließend wurden 800  $\mu$ l Einfriermedium (RPMI-Wachstumsmedium mit 20 % Dimethylsulfoxide) zugegeben und alles in ein Cryo-Tube überführt. Die Zellen wurden dann einen Tag bei  $-70$  °C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.5 Quantitative Bestimmung der Antigendichte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting)

Grundlage der durchflusszytometrischen Zellanalyse (FACS) ist eine Antigen-Antikörperreaktion mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Durch Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau angehoben, um nachfolgend wieder zurückzufallen auf das Ursprungsniveau. Das erfasste Fluoreszenz- und Streulicht steht für eine bestimmte Charakteristik der Zellen (Zellgröße, Granularität u.a.). Das Fluoreszenzlicht besitzt je nach Art des verwendeten Fluorochroms des jeweiligen Antikörpers eine bestimmte Wellenlänge (Varis et al., 2001).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Durchflusszytometer (FACSCalibur) der Firma BD Biosciences, Heidelberg zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten verwendet.

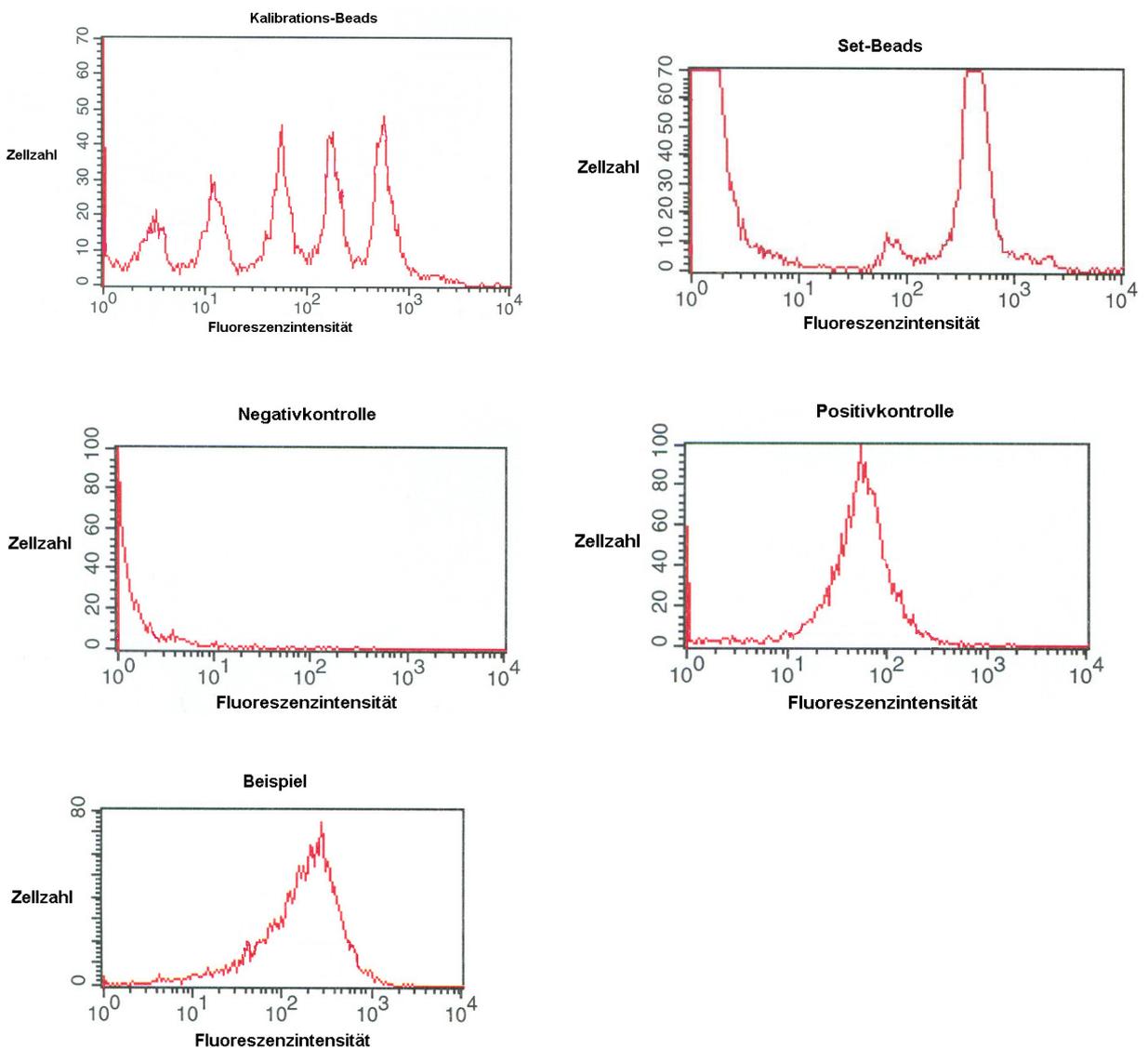
Die aus der Zellkultur entnommenen Lymphozyten wurden nach dem Fixieren und Einstellen auf  $10 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$  (s.o.) auf eine Rundbodenmikrotiterplatte aufgebracht. Je Well 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurde mit 10  $\mu\text{l}$  primärem monoklonalem Maus-anti-Human-HLA-DR Antikörper Klon G46-6 (BD Biosciences, Heidelberg, Stammlösung: 0,5 mg/ml) in der Konzentration von 0,02 mg/ml versetzt. Bei der Negativkontrolle wurden zu 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension 10  $\mu\text{l}$  Maus-IgG1 Kulturüberstand (Konzentration 0,02 mg/ml) (DAKO, Hamburg) zugegeben; als Positivkontrolle wurden 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 10  $\mu\text{l}$  BW4/W6 – Antikörper (BAG Health Care, Lich) eingesetzt. Nach kurzem Mischen auf dem Rüttler wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen, indem je Well 150  $\mu\text{l}$  1  $\times$  DPBS (200 ml 10  $\times$  DPBS in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) zugegeben wurden, die Platte bei 160  $\times$  g 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Dies wurde 2-mal wiederholt.

Von Kalibrations- und Set-Beads (DAKO, Hamburg), welche zur Erstellung einer Eichkurve dienten, wurden 100  $\mu\text{l}$  in einem FACS-Röhrchen mit 5 ml 1  $\times$  DPBS versetzt und 5 min bei 210  $\times$  g zentrifugiert.

Die folgenden Schritte geschahen bei gelöschtem Deckenlicht und ohne direkte Sonneneinstrahlung. Nach dem Waschen der Lymphozyten wurden je Probe und zur Negativkontrolle 40  $\mu\text{l}$  FITC-makierter Kaninchen-anti-Maus Antikörper (DAKO, Hamburg) 1:40 mit 1  $\times$  DPBS verdünnt zugegeben. 100  $\mu\text{l}$  desselben sekundären Antikörpers wurden zu den Kalibrations- und Set-Beads zugegeben. In die Vertiefung mit der Positivkontrolle wurde

Kaninchen-anti-Human-IgG (DAKO, Hamburg) in der Verdünnung 1:40 zugegeben. Sowohl die Platte mit den Proben als auch die Kalibrations- und Set-Beads wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde alles dreimal mit  $1 \times$  DPBS wie oben beschrieben gewaschen. Die Lymphozytenpellets wurden jeweils in  $100 \mu\text{l}$   $1 \times$  DPBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Kalibrations- und Set-Beads-Pellets wurden in  $350 \mu\text{l}$   $1 \times$  DPBS aufgenommen.

Bis zur Messung am Durchflusszytometer innerhalb der nächsten 2 h wurden die Proben im Dunkeln gelagert. Zur Auswertung wurde das Programm „Cell-Quest“ (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.



**Abbildung 8:** Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse der HLA-Klasse-II-Antigendichte auf EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen

## **2.6 Erfassung der TRALI-Fälle**

Alle Fälle im Universitätsklinikum Gießen, bei denen es zu Transfusionszwischenfällen kam, wurden dem diensthabenden Arzt des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen mitgeteilt und ein Bericht über die klinischen Symptome geliefert. Deuteten diese klinischen Befunde auf einen TRALI hin, wurden sowohl das Spenderblut als auch das Empfängerblut auf die Anwesenheit von leukozytenreaktiven Antikörpern hin untersucht. Zusätzlich wurde die HLA- und HNA-Genotypisierung mit der DNA des Empfängers verglichen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Screening der mehrfach schwangeren Spenderinnen

#### 3.1.1 Ergebnisse der Screening-Tests

In den vier Jahren der Studie wurden in der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen jedes Jahr im Durchschnitt 21.172 Vollblut- und 813 Thrombozytenspenden durchgeführt. Diese Blutkomponenten stammten durchschnittlich von 11.316 verschiedenen Spendern jährlich; 47 % (8.832 der 11.316 Spender) waren Frauen. Der Anteil der Frauen, die drei oder mehr Schwangerschaften auf ihrem Fragebogen angaben, betrug 2,6 % (229 der 8.832 Spenderinnen).

Die Seren dieser mehrfach schwangeren Spenderinnen wurden auf die Anwesenheit von granulozytenreaktiven Antikörpern im Allgemeinen (im GIFT und im GAT), sowie speziell auf HLA-Antikörper (im LIFT und im ELISA) getestet. Reagierte ein Serum positiv auf granulozytenreaktive Antikörper, zeigte im LIFT jedoch keine Anwesenheit von HLA-Antikörpern, so wurde diese Serum im MAIGA getestet, um diese granulozytenreaktiven Antikörper gegebenenfalls als HNA-Antikörper zu spezifizieren. Mit Hilfe des ELISA konnten HLA-Klasse-I-Antigene von HLA-Klasse-II-Antigenen differenziert beziehungsweise HLA-Klasse-II-Antigenen erstmals nachgewiesen werden, da im LIFT ausschließlich HLA-Klasse-I-Antigene reagieren (siehe „Tabellarische Erfassung des Screenings“).

Im Gesamten reagierten innerhalb der vier Jahre 37 Seren (40 % der in mindestens einem Test positiv gestesteten Seren) positiv im LIFT, was auf die Anwesenheit von HLA-Antikörpern hindeutet. Im HLA-Klasse-I/-II spezifischen ELISA reagierten 31 der 37 Seren positiv.

26 Seren (29 %) reagierten ausschließlich positiv im GIFT und/oder GAT und waren im HLA-Screening negativ. Von diesen 26 Seren reagierten elf mit einer oder zwei der vier in den Tests eingesetzten Spendergranulozyten (mit unterschiedlichem, bekanntem homozygoten Antigenmuster); 14 Seren reagierten mit drei oder vier Spendergranulozyten positiv. Drei dieser 26 Seren reagierten ausschließlich mit den Granulozyten im GAT. Um die nachgewiesenen granulozytenreaktiven Antikörper weiter zu spezifizieren, wurden die 26

---

Seren im MAIGA auf die Anwesenheit von Alloantikörpern gegen HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-4a und HNA-5a getestet. Jedoch zeigte keines der Seren eine spezifische Reaktion mit einem dieser Antigene; demnach konnten die im GIFT und/oder GAT nachgewiesenen granulozytenreaktiven Antikörper keiner spezifischen Subklasse zugeordnet werden.

In 19 % der Fälle (17 Seren) fiel parallel zu einem negativen Ergebnis im GIFT, im GAT sowie im LIFT ein HLA-Screening erst mit Hilfe des sensitiveren ELISA positiv aus. Zusätzlich konnten in 12 % der Fälle (elf Seren) nach einer positiv-Reaktion im GIFT und/oder GAT spezifische Antikörper des HLA-Klasse-I und/oder -II-Systems nachgewiesen werden; im LIFT blieben diese elf Seren jedoch negativ.

Zusammenfassend reagierten somit von allen 59 Seren, bei denen HLA-Klasse-I- und/oder HLA-Klasse-II- Antikörper im ELISA nachgewiesen werden konnten, 31 Seren (53 %) ebenfalls im LIFT positiv. 11 Seren (19 %) reagierten zusätzlich zum ELISA im GIFT und/oder GAT positiv. Demnach konnten 17 (28 %) Seren allein durch den sensitiveren ELISA als HLA-positiv herausgefiltert werden.

### 3.1.2 Tabellarische Erfassung des Screenings

Anzahl der getesteten Seren	Gesamtanzahl der in mindestens einem Test positiv getesteten Seren	Anzahl der Seren, die positiv reagierten im ...			
		LIFT	GIFT u/o GAT, jedoch nicht im LIFT und nicht im ELISA	ELISA und im GIFT u/o GAT, jedoch nicht im LIFT	ELISA, jedoch nicht im LIFT und nicht im GIFT/GAT
229	91 (100 %)	37 <sup>*</sup> (40 %)	26 (29 %)	11 (12 %)	17 (19 %)
			GIFT + GAT 23	HLA-I 3	HLA-I 4
			nur GAT 3	HLA-II 4	HLA-II 10
				HLA-I und -II 4	HLA-I und -II 3

\*31 der 37 Seren reagierten positiv im ELISA, 6 negativ

Abbildung 9: Tabellarische Erfassung der Screening-Ergebnisse

### 3.1.3 Ergebnisse der Antikörper-Tests in der Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe diente Serum von 40 männlichen Blutspendern ohne Transfusionsanamnese, sodass davon ausgegangen werden kann, dass im Serum dieser Spender keinerlei leukozytenreaktive Antikörper vorhanden sind. Diese Seren wurden ebenfalls allen im Screening enthaltenen Antikörper-Tests unterzogen.

Es reagierte ein Serum mit einer von vier eingesetzten Testzellen im GIFT und war damit schwach positiv in diesen Test; ein Serum reagierte im GAT schwach positiv (mit einer von vier Testzellen). Im LIFT und/oder im HLA-Klasse-I-ELISA war keines der 40 Seren positiv. Zusätzlich zeigten vier Seren ein positives Ergebnis im HLA-Klasse-II-ELISA. Alle in diesem Screening verwendeten Tests haben eine hohe Spezifität von über 97 % beim Nachweis von HLA-Klasse-I-Antikörpern. Für den Nachweis von HLA-Klasse-II-Antikörpern liegt die Spezifität des ELISA jedoch nur bei 90 % und so scheint das Naheliegendste, dass die Positiv-Reaktionen in der Kontrollgruppe falsch positive Ergebnisse

sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zu mindest einige der Positiv-Reaktionen wahre Reaktionen sind, da der ELISA allein nicht ausnahmslos die Anwesenheit von HLA-Klasse-II-Antikörpern beweisen oder ausschließen kann (Monien et al., 2006).

### 3.1.4 Kostenrechnung für das Screening

Das Screening der mehrfach schwangeren Spenderinnen beläuft sich insgesamt auf 28,81 € je Spenderserum (Allgemeinkosten des Labors unberücksichtigt). Dieser Betrag setzt sich zusammen aus Reagenz-/Materialkosten und Personalkosten.

Die Reagenz-/Materialkosten für den GIFT betragen 1,18 € für eine Spenderprobe, für den GAT 0,21 € je Spenderprobe und für den LIFT betragen diese Kosten 1,17 € pro Spenderserum (jeweils kalkuliert für eine Probenmenge von 18 Proben je Testansatz). Für das HLA-Klasse-I- und das HLA-Klasse-II-Screening zusammen belaufen sich die Reagenz-/Materialkosten auf 15,00 € je Serum bei einer Probenmenge von 40 Seren pro Testplatte.

Die Screening-Tests GIFT, GAT und LIFT können zeitlich parallel durchgeführt werden, was die Personalkosten reduziert. Gleiches gilt für den HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-ELISA. Somit ergibt sich bei einer Arbeitszeit von umgerechnet 22 min/Spenderserum (bei einer Probenmenge von 18 Seren je Testansatz und einer Arbeitszeit von durchschnittlich 6 h 36 min je Testansatz) sowie Gehaltskosten von 0,45 € / min / MTLA ein Betrag von 9,90 € Personalkosten für das Screening eines Spenderserums im GIFT, GAT und LIFT. Basierend auf den 0,45 € / min / MTLA Gehaltskosten belaufen sich die Personalkosten für das HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Screening auf 1,35 € je Spenderserum bei einer Arbeitszeit von 3 min/Serum (errechnet aus durchschnittlich 2 h Arbeitszeit für 40 Seren).

Aus diesen Zahlen lassen sich Screeningkosten von 12,46 € für das Screening eines Serums einer mehrfach schwangeren Spenderin im GIFT, GAT und LIFT sowie 16,35 € für das Screening im HLA-ELISA errechnen. Daraus ergibt sich ein Gesamtbetrag von 28,81 € für das Screening eines Spenderserums auf leukozytenreaktive Antikörper (Allgemeinkosten des Labors unberücksichtigt).

Basierend auf den Zahlen der Jahre 2003 – 2006 (229 mehrfach schwangere Spenderinnen und Gesamtscreeningkosten von 6.597,49 €) ergeben sich jährliche Screeningkosten von 1.649,37 € (Allgemeinkosten des Labors unberücksichtigt), wobei durchschnittlich 40 % der gescreenten Frauen für die Spende plasmahaltiger Blutkomponenten gesperrt werden müssen.

### 3.1.5 TRALI-Fälle

Während der vier Jahre der Studie kam es im Universitätsklinikum Gießen in drei Fällen zu einem transfusionsinduzierten akutem Lungenödem. Diese Patienten wurden alle einem Spezialisten für Transfusionsmedizin des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen vorgestellt, und alle drei erfüllten nach der European Haemovigilance Network (EHN) und der Canadian Consensus Conference (Kleinman et al., 2004) die Kriterien eines TRALI.

#### Fall 1:

Ein 42 Jahre alter Patient wurde mit Ösophagusvarizenblutung bei Leberzirrhose in die Universitätsklinik Gießen eingeliefert. Bei der Einlieferung in die Klinik wies er aktive Blutungen auf, hatte einen erniedrigten Hämatokrit, eine niedrige Thrombozytenzahl und eine verlängerte Prothrombinzeit. Als initiale Behandlung erhielt der Patient vier Erythrozytenkonzentrate, vier Frischplasmen, sowie ein Thrombozytenkonzentrat. Während der Transfusion des vierten Blutplasmas fiel die periphere Sättigung des Patienten plötzlich ab, und gelblicher Schaum kam aus Mund und Nase. Er entwickelte rasch ein pulmonales Ödem und er wurde zunehmend hypotensiv und tachykard. Dies steigerte sich bis zur Intubations- und Beatmungspflichtigkeit des Patienten. Im Röntgenbild konnten bilateral alveoläre Verschattungen nachgewiesen werden. Ein Myokardinfarkt als Ursache des pulmonalen Ödems konnte ausgeschlossen werden, und auch die Echokardiographie zeigte keine Anzeichen einer linksventrikulären Dysfunktion. Der Patient blieb beatmet auf einer Intensivstation bis er drei Tage nach Aufnahme verstarb. Der Arzt der Intensivstation berichtete, dass der Tod auf Grund eines Multi-Organversagens eintrat, welches aus dem schweren, TRALI-bedingten pulmonalen Ödem resultierte.

Serologische Untersuchungen ergaben, dass eines der Plasmakonzentrate HLA-Klasse-II-Antikörper der Spezifität HLA-DR4 enthielt. Auf Blutzellen des Patienten konnten die entsprechenden Antigene nachgewiesen werden, nach denen der Patient HLA-DR4 positiv war. Demnach hat die schwere Vorerkrankung zusammen mit dieser Antigen-Antikörperreaktion die neutrophilen Granulozyten in der Lungenstrombahn aktiviert und den TRALI ausgelöst.

Das Blut, aus dem das Plasmakonzentrat gewonnen wurde, stammte von einer mehrfach schwangeren Spenderin vor der generellen Einführung des Screenings auf HLA-Klasse-II-Antikörper mit dem ELISA.

## Fall 2:

Auf Grund der Verschlechterung ihrer Grunderkrankung erhielt eine 40 jährige Patientin zwei Erythrozytenkonzentrate. Die Frau litt an einem systemischen Lupus erythematoses und durch eine begleitende autoimmunhämolytische Anämie vom Wärmetyp war ihr Hämatokrit unter die kritische Grenze gefallen. Während der Transfusion der zweiten Konserve bekam sie plötzlich akute Dyspnoe, entwickelte eine Zyanose und wurde tachykard. Schließlich fiel die Sauerstoffsättigung der Patientin rapide ab, und sie entwickelte ein schweres Lungenödem. Das Röntgenbild zeigte ein komplette Verschattung beider Lungenflügel. Die Patientin wurde intubiert und auf eine Intensivstation verlegt, wo sie weiter beatmet werden musste. Auch bei dieser Frau konnten klinisch und echokardiographisch keine Anzeichen für eine kardiologische Ursache des Lungenödems gefunden werden. Nach drei Tagen konnte die Patientin extubiert werden und sie erholte sich rasch.

Die beiden von Frauen gespendeten, transfundierten Blutkonserven wurden zum zweiten Mal einem Screening-Verfahren unterzogen. Es stellte sich jedoch heraus, dass beide Konserven von leukozytenreaktiven Antikörpern frei waren. Auch im Blut der Patientin konnten keine leukozytenreaktiven Antikörper nachgewiesen werden. Der Mechanismus, durch den sich hier eine TRALI entwickeln konnte, bleibt unklar. Eine nicht-immunogene TRALI wäre zu diskutieren.

## Fall 3:

In die Notaufnahme wurde eine 40 jährige Patientin mit schwerer akuter Thrombozytopenie, Hämolyse und wechselnden neurologischen Symptomen auf Grund einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) eingeliefert. Daraufhin wurde sie einem Plasmaaustausch unterzogen. Insgesamt erhielt die Patientin 120 Frischplasmen innerhalb von fünf Tagen. Zusätzlich erhielt sie eine hohe Dosis Cortison. Die Therapie schlug anfänglich mit gutem Erfolg an. Als die Patientin zwei Tage später doch rückfällig wurde, wurden erneut Plasmaaustauschbehandlungen vorgenommen, unter denen sie plötzlich akute Dyspnoe und ein pulmonales Ödem entwickelte. Nach der Verlegung auf die Intensivstation wurde sie mit C-PAP beatmet. Kurze Zeit später wurde sie bradykard und hypoton. Die Patientin wurde reanimationspflichtig; Intubation und Beatmung waren weiterhin erforderlich, Katecholamine und ein externer Schrittmacher wurden eingesetzt, da in der Echokardiographie eine schwere kardiale Dysfunktion sichtbar war. Die Patientin verstarb während der Reanimationsmaßnahmen. Der Arzt der Intensivstation berichtete, dass die Patientin durch die

Kombination des TRALI-induzierten Lungenödems und der Thrombosierung coronarer Venen (ausgelöst durch die TTP) mit resultierendem Herzversagen verstarb.

Die serologischen Untersuchungen der Plasmakonzentrate ergaben das Vorhandensein von HLA-Klasse-I- sowie HLA-Klasse-II-Antikörpern mit der Spezifität HLA-A2 bzw. HLA-DR4. Wie durch weitere Bluttests festgestellt werden konnte, war die Patientin HLA-A2 und HLA-DR4 positiv.

Das Plasma stammte von Blutspenden einer Frau, die nur eine Schwangerschaft angegeben hatte und demnach nicht auf HLA-Antikörper gescreent worden war.

## 3.2 Etablierung des MAILA

Der MAILA (Monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigen assay) dient dem Nachweis von Antikörpern, die gegen Antigene des HLA-Systems gerichtet sind. Ziel der folgenden Versuche war es, einen optimalen, standardisierten Test mit möglichst guter Sensitivität und Spezifität zu entwickeln, der über die Verwendung EBV-transformierter Zellen unabhängig von frischen Spenderzellen ist.

### 3.2.1 Allgemeines zu den durchgeführten Versuchen

Die verwendeten Testseren stammten von Spendern aus der Spenderdatei der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und wurden mit Hilfe des ELISA-Testkits auf das Vorhandensein bzw. das Fehlen von spezifischen HLA-Klasse-II-Antikörpern getestet. Es wurden für alle Versuche nur die spezifischen HLA-DR1 und HLA-DR52 Antikörper bzw. Antigene betrachtet.

Das Serum, das im Folgenden die Bezeichnung anti-DR1+/DR52- erhält, wies im ELISA Antikörper gegen HLA-DR1-Antigene auf, war aber anti-HLA-DR52 negativ. Das Testserum mit der Bezeichnung anti-DR1-/DR52+ war demnach anti-HLA-DR1 negativ, enthielt aber Antikörper gegen HLA-DR52-Antigene. Die Negativkontrolle (-ko) war frei von jeglichen Antikörpern gegen Antigene des HLA-Systems. Des Weiteren wurde bei jedem Versuch ein Ansatz ohne Testserum mitbestimmt, um die Reduktion des Hintergrundsignals zu verdeutlichen.

Die spezifischen Antigene auf den verwendeten EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen wurden bereits vor der Transformation genotypisch bestimmt. Demnach exprimierten die Zellen mit der Bezeichnung #04 zwar HLA-DR1-Antigene, jedoch keine Antigene der Spezifität HLA-DR52. Die Zellen, die im Folgenden mit #08 bezeichnet werden, waren HLA-DR1 negativ und HLA-DR52 positiv.

Da immer beide Testseren je Zellgruppe eingesetzt wurden, erhielt man im Ergebnis eine zusätzliche Negativkontrolle („interne Negativkontrolle“), da beispielsweise die Zelle #04 nicht mit dem Serum anti-DR1-/DR52+ reagieren kann.

Die jeweils neuen Erkenntnisse aus einem Versuch wurden in den Folgeversuchen umgesetzt. Auch der jeweilige Referenzwert der Versuche passte sich dieser „Erneuerung“ des Protokolls an, um Veränderungen der Extinktionswerte im neuen Versuch beurteilen zu können.

Alle durchgeführten Experimente wurden mit  $n = 3$  Versuchen wiederholt und jeweils der Mittelwert angegeben.

*Eckdaten des Standard-MAILA-Protokolls:*

**Coating-Puffer:** 0,3975 g Natriumcarbonat, 0,7325 g Natriumhydrogencarbonat, 0,05 g Natriumazid in 250 ml Aqua dest. gelöst und auf pH 9,6 eingestellt. Zu 10 ml 20  $\mu$ l Fc $\gamma$ -Fragment spezifischem Ziege-anti-Maus-IgG (Dianova, Hamburg, Stammlösung: 1,8 mg/ml). Je Well 100  $\mu$ l Coating-Puffer.

**Fixierung der Zellen:** 1 %ige Paraformaldehydlösung, 5 min bei Raumtemperatur im Dunkelt inkubiert.

**Zellzahl je Well:** 500.000 / 50  $\mu$ l Testserum.

**Primärer, monoklonaler Antikörper:** 10  $\mu$ l Maus-anti-human-HLA-DR Antikörper Klon G46-6 (BD Biosciences, Heidelberg, Stammlösung: 0,5 mg/ml) in der Konzentration 0,02 mg/ml auf 50  $\mu$ l PBS/BSA 0,2%.

**Lysepuffer:** Je Well 100  $\mu$ l Lysepuffer (2,4 g Tris, 8,76 g Natriumchlorid, 9,5 ml Triton-X 100, 1,86 g Titriplex in 1 l Aqua dest. gelöst und auf pH 7,4 eingestellt) mit Proteaseinhibitor (950  $\mu$ l Lysepuffer mit 50  $\mu$ l Protease-Inhibitor-Cocktail). Inkubation für 30 min bei 4 °C.

**Eingesetzter Lyseüberstand:** 70  $\mu$ l / 180  $\mu$ l MAINA-Waschpuffer. Je Well 100  $\mu$ l der Verdünnung.

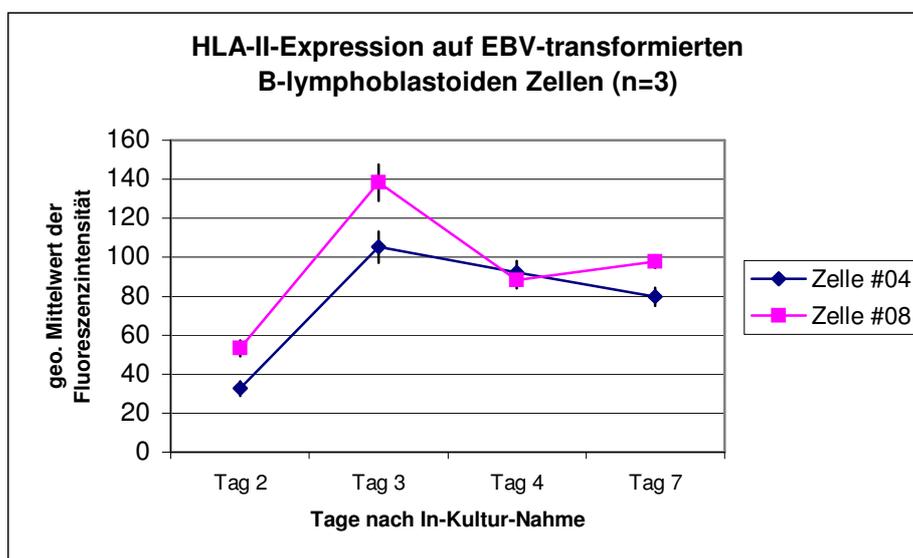
**Sekundärer Antikörper:** Ziege-anti-human-IgG POD Antikörper (Dianova, Hamburg, Stammlösung: 0,8 mg/ml) in der Verdünnung 2,5  $\mu$ l / 10 ml MAINA.

**Substratpuffer:** 3 ml Aqua ad iniectabilia, 1 Tablette OPD (DAKO, Hamburg) und 1,25  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt. 100  $\mu$ l je Well, Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

### 3.2.2 Antigenexpressionsrate auf EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen

Um zu erkennen, an welchem Kulturtag die beiden Zellgruppen mit den verschiedenen Antigen-Mustern die größte Dichte an HLA-Klasse-II-Antigenen auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, wurden die Zellen am Tag Null in Kultur genommen, und nach 48 h, 72 h, 96 h und 168 h (Tag -2, -3, -4, -7) wurde mit Hilfe der FACS-Methode über den geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität die Antigendichte relativ bestimmt.

Wir kamen zu dem Ergebnis, dass die Zellen drei Tage nach In-Kultur-Nahme mit einem geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 105,3 bei den #04-Zellen bzw. 138,38 bei den #08-Zellen die größte Dichte an HLA-Antigenen aufweisen.



geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität	Tag-2	Tag-3	Tag-4	Tag-7
Zelle #04	32,62 ± 3,68	105,3 ± 8,02	92,18 ± 6,13	79,68 ± 4,64
Zelle #08	53,23 ± 4,01	138,38 ± 9,31	88,2 ± 4,26	97,76 ± 3,26

Abbildung 10: HLA-II-Expression auf EBV-transformierten B-lymphoblastoiden Zellen

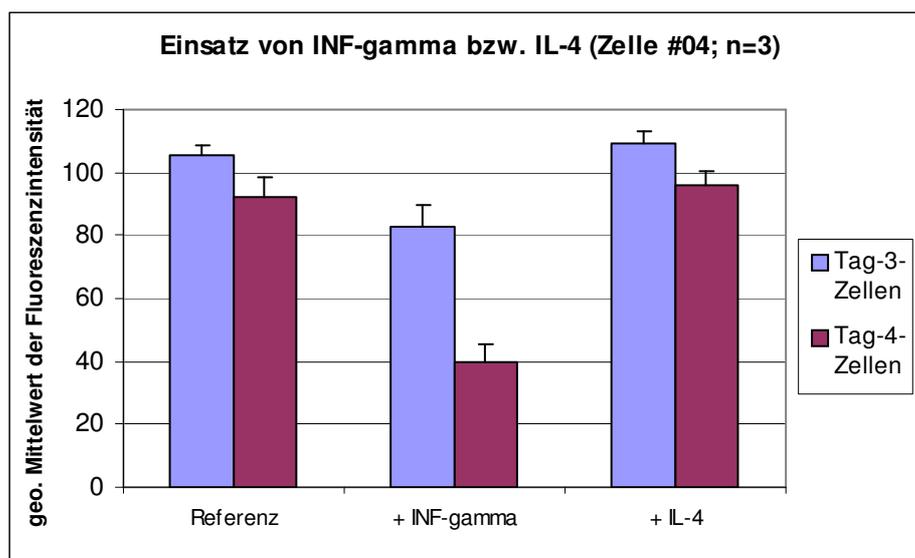
Auf Grund dieser Ergebnisse wurden bei allen folgenden Versuchen ausschließlich drei Tage alte EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zellen eingesetzt (Tag-3-Zellen). So konnte die Antigendichte nicht nur maximal hoch, sondern auch konstant gehalten werden.

### 3.2.3 Einsatz von INF $\gamma$ bzw. IL-4

Um die Expressionsrate der HLA-Antigene auf den Lymphozyten zu erhöhen, wurden beide Substanzen in der Konzentration von 500 U/ml Kulturmedium (5 ml Medium) in verschiedenen Zellkulturflaschen zu den Zellen gegeben. Dies geschah 24 h nach In-Kulturnahme. Da die Zellen anschließend 48 h dem Reagenz ausgesetzt sein sollten, wurde die erste FACS-Messung an Tag-3 durchgeführt, die zweite Messung an Tag-4. Die Fluoreszenzintensität der Tag-7-Zellen wurde nicht bestimmt, da zwischenzeitlich das Kulturmedium gewechselt werden musste und eine erneute Zugabe von INF  $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) bzw. IL-4 (Interleukin-4) kein repräsentatives Ergebnis zur Folge gehabt hätte.

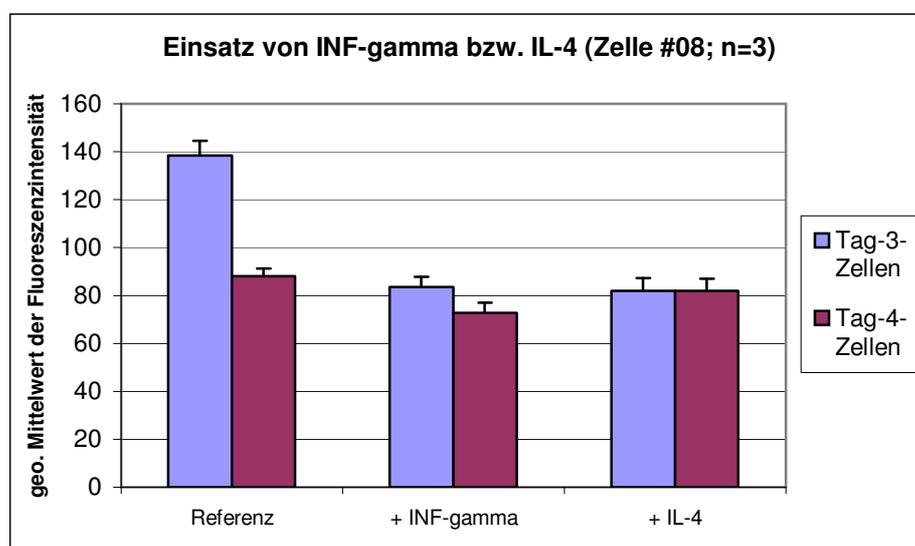
Wie aus den Grafiken zu erkennen ist, erbrachte die Zugabe von INF  $\gamma$  bei beiden Zellgruppen nicht den erwünschten Erfolg. Die Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsrate von HLA-Klasse-II-Antigenen verringerte sich sowohl auf den Tag-3-Zellen als auch auf den vier Tage alten Zellen. Bei den #08-Zellen verringerte sich die Fluoreszenzintensität an Tag-3 sogar um 40 %.

Auch die Zugabe von IL-4 zu den wachsenden Zellen regte diese nicht signifikant zur vermehrten Expression von HLA-Klasse-II-Antigenen an. Auf den #04-Zellen wurden im FACS an beiden Tagen eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität bestimmt wie bei der Kontrollgruppe; bei den #08-Zellen verringerte sich diese sogar.



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	Referenz	+ INF-gamma	+ IL-4
Tag-3-Zellen	105,30 ± 3,61	82,88 ± 6,62	109,48 ± 3,45
Tag-4-Zellen	92,18 ± 6,53	39,74 ± 5,45	95,75 ± 4,46

Abbildung 11: Einsatz von INF-gamma bzw. IL-4 (Zelle #04)



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	Referenz	+ INF-gamma	+ IL-4
Tag-3-Zellen	138,38 ± 6,21	83,63 ± 4,26	82,10 ± 5,16
Tag-4-Zellen	88,20 ± 3,23	72,81 ± 4,14	81,98 ± 4,96

Abbildung 12: Einsatz von INF-gamma bzw. IL-4 (Zelle #08)

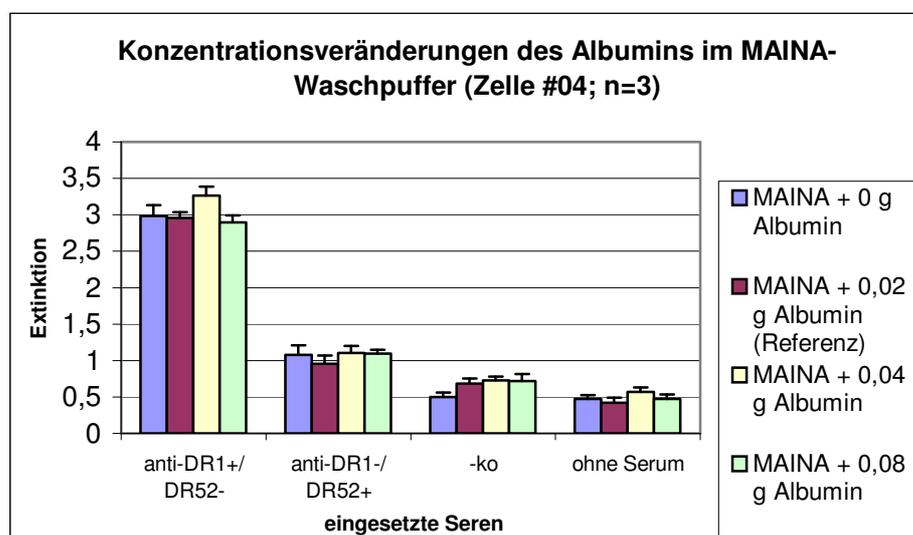
Wegen der aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse wurden die Zelle im Folgenden weder mit INF  $\gamma$  noch mit IL-4 versetzt.

### 3.2.4 Änderung der Albuminkonzentration im MAINA-Waschpuffer

Albumin hat die Eigenschaft, unspezifische Bindungen abzufangen. Im folgenden Versuch wurden Mengen von 0 g Albumin /10 ml MAINA, 0,02 g Albumin /10 ml MAINA, 0,04 g Albumin /10 ml MAINA und 0,08 g Albumin /10 ml MAINA zugegeben

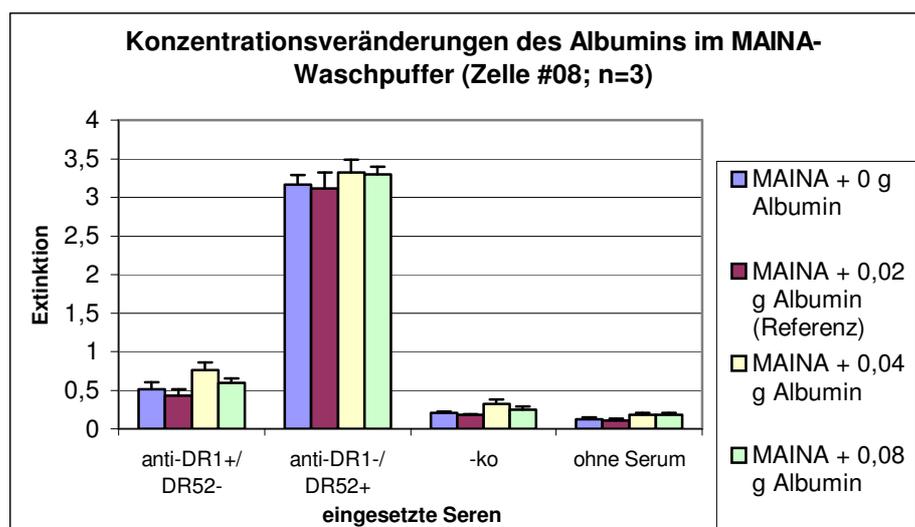
In beiden Zellgruppen nahmen bei einer Konzentrationserhöhung auf 0,04 g Albumin /10 ml MAINA sowie auf 0,08 g Albumin /10 ml MAINA die Extinktionswerte aller Ansätze ohne spezifische Antigen-Antikörperreaktion (Negativkontrollen, „interne Negativkontrollen“ und Ansätze ohne Serum) zu. Demnach konnte die Idee einer Konzentrationserhöhung des Albumins zum verbesserten Abfangen der unspezifischen Bindungen verworfen werden.

Es stellte sich ebenso heraus, dass das Weglassen von Albumin im MAINA-Waschpuffer ähnliche Extinktionswerte ergab wie die Zugabe von 0,02 g Albumin nach dem Standardprotokoll. Nimmt man alle Extinktionswerte der beiden Zellgruppen zusammen und errechnet jeweils den Durchschnitt aller Werte, die bei 0 g bzw. bei 0,02 g Albuminzugabe herauskamen, so steht einem Durchschnittswert von 1,13 (bei 0 g Albuminzugabe) ein Durchschnittswert von 1,11 (bei 0,02 g Albuminzugabe) gegenüber.



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/DR52-	anti-DR1-/DR52+	-ko	ohne Serum
MAINA + 0 g Albumin	2,982 ± 0,150	1,076 ± 0,135	0,501 ± 0,060	0,473 ± 0,053
MAINA + 0,02 g Albumin (Referenz)	2,957 ± 0,080	0,951 ± 0,120	0,679 ± 0,074	0,424 ± 0,065
MAINA + 0,04 g Albumin	3,264 ± 0,123	1,106 ± 0,095	0,727 ± 0,055	0,569 ± 0,063
MAINA + 0,08 g Albumin	2,899 ± 0,098	1,091 ± 0,056	0,721 ± 0,093	0,475 ± 0,061

Abbildung 13: Konzentrationsveränderungen des Albumins im MAINA-Waschpuffer (Zelle #04)



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/DR52-	anti-DR1-/DR52+	-ko	ohne Serum
MAINA + 0 g Albumin	0,511 ± 0,095	3,167 ± 0,120	0,205 ± 0,019	0,128 ± 0,021
MAINA + 0,02 g Albumin (Referenz)	0,426 ± 0,085	3,114 ± 0,211	0,180 ± 0,006	0,107 ± 0,023
MAINA + 0,04 g Albumin	0,758 ± 0,103	3,325 ± 0,164	0,325 ± 0,055	0,184 ± 0,026
MAINA + 0,08 g Albumin	0,593 ± 0,064	3,299 ± 0,095	0,248 ± 0,041	0,182 ± 0,024

**Abbildung 14: Konzentrationsveränderungen des Albumins im MAINA-Waschpuffer (Zelle #08)**

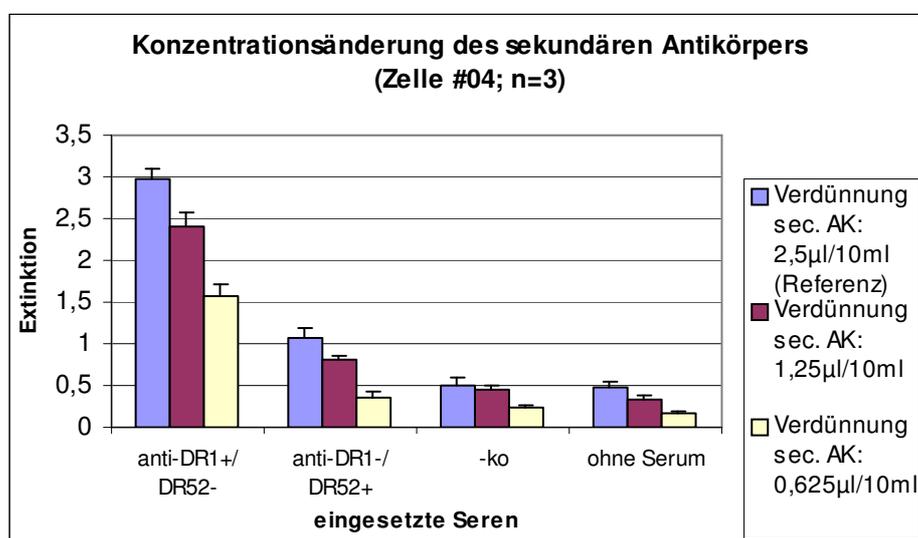
Auf Grund dieser ähnlichen Extinktionswerte zwischen der Zugabe von 0,02 g Albumin und dem Weglassen von Albumin wurde in allen folgenden Versuchen bei den Schritten, bei denen MAINA-Waschpuffer verwendet wurde, das Albumin zu Gunsten des einfacheren Handlings nicht zugegeben.

### 3.2.5 Konzentrationsänderung des sekundären Antikörpers

Der sekundäre Antikörper (sec. AK) wurde im Standard-MAILA-Protokoll in einer Verdünnung von 2,5 µl sekundärer Antikörper (Stammlösung) / 10 ml MAINA-Waschpuffer eingesetzt. Bei folgendem Versuch wurde dieser Antikörper in einer Verdünnung von 1,25 µl sekundärer Antikörper (Stammlösung) / 10 ml MAINA-Waschpuffer und von 0,625 µl sekundärer Antikörper (Stammlösung) / 10 ml MAINA-Waschpuffer im MAILA eingebracht. Als Referenzwert wurde die Antikörper-Verdünnung aus dem Standard-MAILA-Protokoll

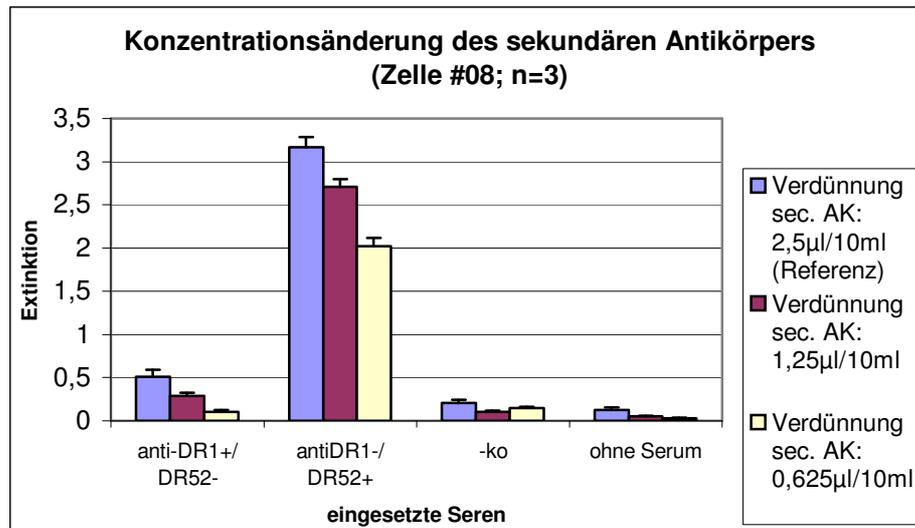
verwendet. Wie bereits erwähnt wurde dem MAINA bei keinem der Ansätze Albumin zugesetzt.

Die Versuchsergebnisse erbrachten im Durchschnitt einen starken Abfall aller Extinktionswerte bei der Verdünnung des sekundären Antikörpers. Nicht nur die Extinktionswerte der Ansätze ohne spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion reduzierten sich, auch die Extinktionswerte, bei denen HLA-Antikörper im Serum vorhanden waren, sanken bei der Reduktion des sekundären Antikörpers von der 2,5 µl / 10 ml –Verdünnung auf die 1,25 µl / 10 µl -Verdünnung um 19,4 % (bei Zelle #04) bzw. 14,5 % (bei Zelle #08) ab. Die Reduktion auf die 0,625 µl /10 µl –Verdünnung des eingebrachten Antikörpers ließ diese Extinktionswerte sogar um 47,1 % (bei Zelle #04) bzw. um 36,2 % (bei Zelle #08) sinken.



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Verdünnung sec. AK: 2,5µl/10ml (Referenz)	2,982 ± 0,122	1,076 ± 0,107	0,501 ± 0,095	0,473 ± 0,078
Verdünnung sec. AK: 1,25µl/10ml	2,403 ± 0,161	0,813 ± 0,056	0,441 ± 0,054	0,345 ± 0,046
Verdünnung sec. AK: 0,625µl/10ml	1,578 ± 0,134	0,368 ± 0,051	0,227 ± 0,040	0,164 ± 0,021

**Abbildung 15: Konzentration des sekundären Antikörpers (Zelle #04)**



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	antiDR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Verdünnung sec. AK: 2,5µl/10ml (Referenz)	0,511 ± 0,080	3,167 ± 0,121	0,205 ± 0,036	0,128 ± 0,025
Verdünnung sec. AK: 1,25µl/10ml	0,286 ± 0,041	2,709 ± 0,090	0,104 ± 0,016	0,055 ± 0,006
Verdünnung sec. AK: 0,625µl/10ml	0,107 ± 0,021	2,021 ± 0,101	0,145 ± 0,018	0,033 ± 0,003

**Abbildung 16: Konzentrationseränderung des sekundären Antikörpers (Zelle #08)**

Auf Grund des zu starken Abfalls der Positivwerte und damit der Sensitivität bei dem Versuch, die Sekundärantikörper-Konzentration zu verringern, wurde bei allen folgenden Versuchen dieser Antikörper in der ursprünglichen Verdünnung (2,5 µl sekundärer AK / 10 ml MAINA-Waschpuffer) eingebracht.

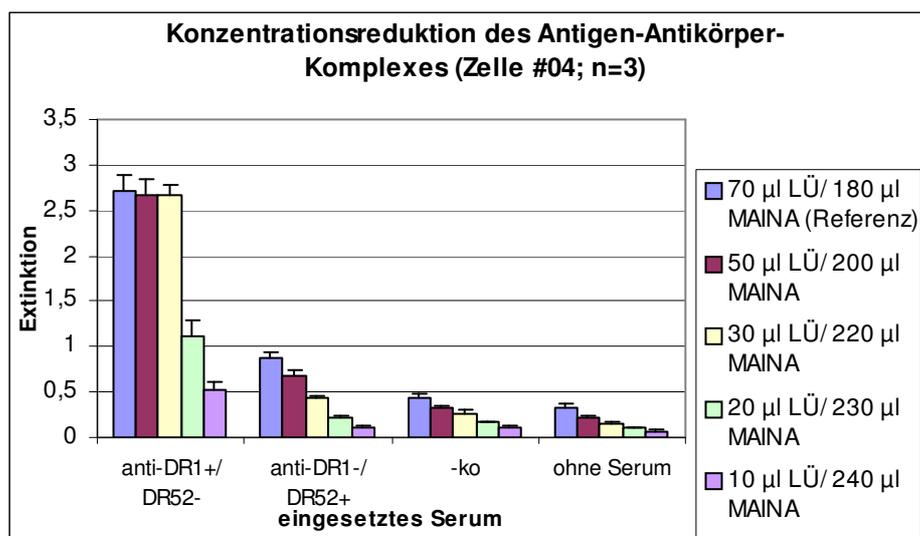
### 3.2.6 Konzentrationsreduktion des eingebrachten Antigen-Antikörper-Komplexes

Um das Hintergrundsignal zu reduzieren, wurde die Konzentration des eingebrachten Antigen-Antikörper-Komplexes reduziert, indem der nach der Inkubation mit Lysepuffer und dem Abzentrifugieren entstandene Lyseüberstand in geringerer Konzentration auf die gecoatete Flachbodenplatte aufgebracht wurde. Im Standard-MAILA-Protokoll wurden 70 µl Lyseüberstand (LÜ) mit 180 µl MAINA-Waschpuffer (MAINA) verdünnt (28 %ige Lyseüberstandslösung). Es wurde nun getestet, welche Auswirkungen eine 20 %ige (50 µl LÜ / 200 µl MAINA), eine 12 %ige (30 µl LÜ / 220 µl MAINA), eine 8 %ige (20 µl LÜ / 230 µl MAINA) und eine 4 %ige (10 µl LÜ / 240 MAINA) Lyseüberstandslösung auf das Hintergrundsignal hat.

In den Grafiken beider Zellgruppen ist zu erkennen, dass beim Verwenden der 8 %igen LÜ-Lösung sowie beim Einsatz der 4 %igen LÜ-Lösung die Extinktionswerte, die die Anwesenheit von HLA-Antikörpern im Testserum wiedergeben, stark absanken (zwischen 44,9 % und 80,6 %). Demnach sind diese Verdünnungen zu stark gewählt worden.

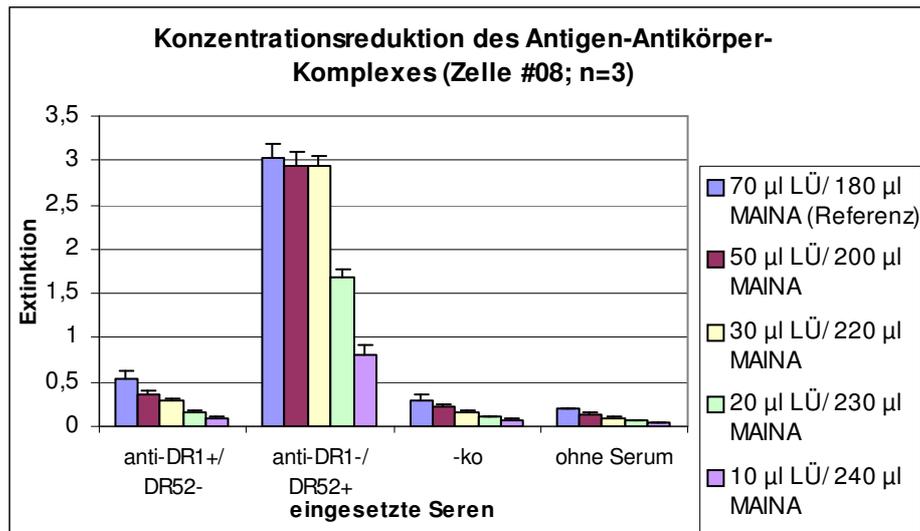
Bei der Reduktion des Lyseüberstands von 28 % auf 12 % nahmen die Extinktionswerte, die das Vorhandensein von HLA-Antikörpern aufzeigen, nur um 1,8 % (bei den #04-Zellen) bzw. um 3,6 % (bei den #08-Zellen) ab. Die Extinktionswerte der Ansätze, bei denen kein Serum eingebracht wurde, reduzieren sich jedoch um 53 % bzw. 51,8 %. Die Extinktionswerte der Negativkontrollen reduzierten sich mit Reduktionswerten von 38,2 % (in der #04-Zellgruppe) bzw. 47,6 % (in der #08-Zellgruppe) deutlich; ebenso sanken die Extinktionswerte der „internen Negativkontrollen“ stark ab (um 51,4 % bzw. 47 %).

Bei der Reduktion des Lyseüberstands auf eine 20 %ige LÜ-Lösung sanken die Extinktionswerte ebenfalls deutlich ab. Bei den Ansätze ohne Antigen-Antikörper-Komplexbildung (Ansätze ohne Serum, Negativkontrolle und „interne Negativkontrolle“) jedoch nur um Werte zwischen 23,2 % und 36,4% was im Vergleich zu den Reduktionswerten der 12 %igen LÜ-Lösung ein deutlich geringerer Rückgang des Hintergrundsignals bedeutet. Die Extinktionswerte, bei denen HLA-Antikörper im Serum vorhanden waren, sanken beim Einsatz der 20 %igen LÜ-Lösung im Vergleich zu den Referenzwerten um 1,7 % (bei den #04-Zellen) bzw. um 3,5 % (bei den #08-Zellen).



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
70 µl LÜ/ 180 µl MAINA (Referenz)	2,722 ± 0,173	0,882 ± 0,067	0,442 ± 0,048	0,338 ± 0,030
50 µl LÜ/ 200 µl MAINA	2,676 ± 0,163	0,677 ± 0,056	0,332 ± 0,012	0,215 ± 0,024
30 µl LÜ/ 220 µl MAINA	2,672 ± 0,109	0,429 ± 0,030	0,273 ± 0,030	0,159 ± 0,016
20 µl LÜ/ 230 µl MAINA	1,126 ± 0,160	0,222 ± 0,020	0,173 ± 0,009	0,099 ± 0,006
10 µl LÜ/ 240 µl MAINA	0,527 ± 0,081	0,119 ± 0,016	0,112 ± 0,018	0,073 ± 0,007

**Abbildung 17: Konzentrationsreduktion des Antigen-Antikörper-Komplexes (Zelle #04)**



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
70 µl LÜ/ 180 µl MAINA (Referenz)	0,530 ± 0,102	3,036 ± 0,143	0,292 ± 0,061	0,191 ± 0,016
50 µl LÜ/ 200 µl MAINA	0,361 ± 0,051	2,930 ± 0,167	0,220 ± 0,036	0,134 ± 0,021
30 µl LÜ/ 220 µl MAINA	0,281 ± 0,037	2,928 ± 0,126	0,153 ± 0,023	0,092 ± 0,010
20 µl LÜ/ 230 µl MAINA	0,160 ± 0,024	1,672 ± 0,110	0,107 ± 0,014	0,060 ± 0,007
10 µl LÜ/ 240 µl MAINA	0,085 ± 0,016	0,815 ± 0,110	0,073 ± 0,006	0,036 ± 0,006

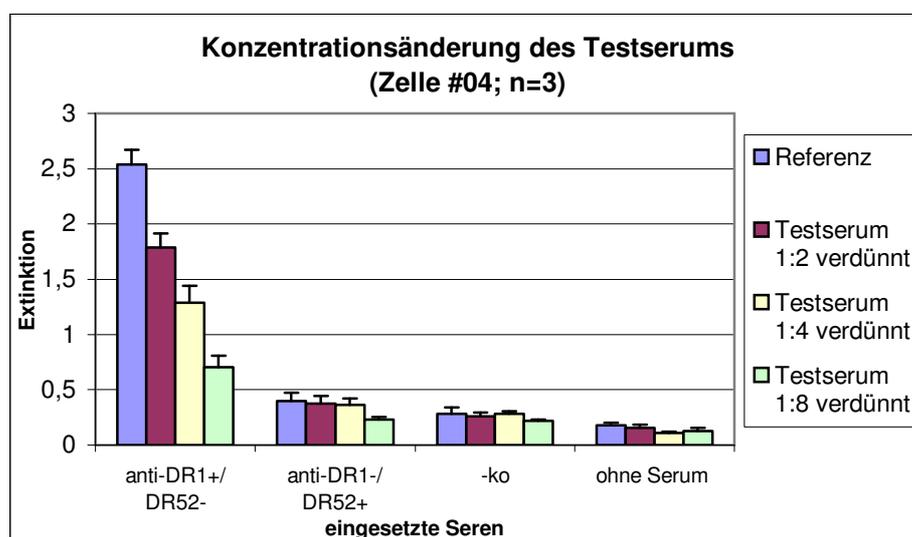
**Abbildung 18: Konzentrationsreduktion des Antigen-Antikörper-Komplexes (Zelle #08)**

In allen folgenden Versuchen wurde bei allen Ansätzen 30 µl Lyseüberstand mit 220 µl MAINA-Waschpuffer (ohne Albumin) verdünnt und davon je Well 100 µl eingebracht.

### 3.2.7 Konzentrationsänderung des eingesetzten Testserums

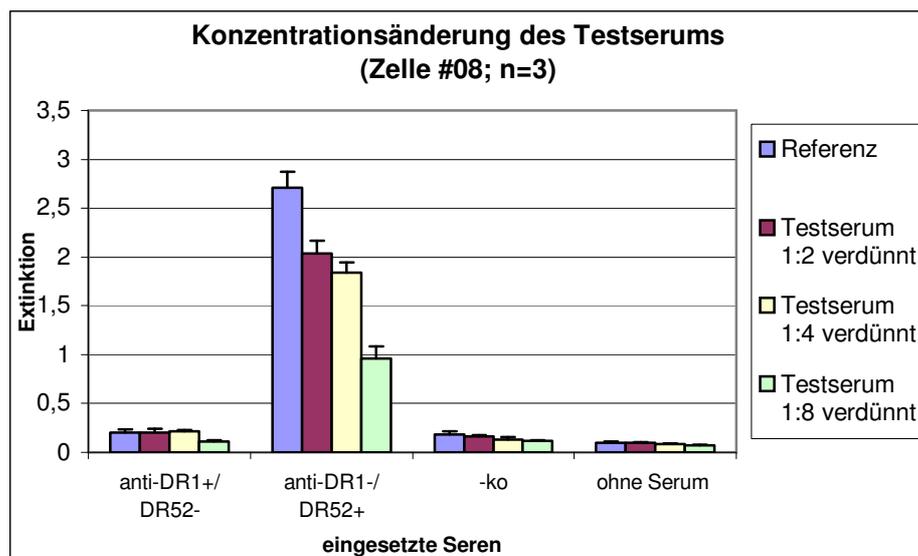
Im Standard-MAILA-Protokoll ist beschrieben, dass 50 µl Testserum (Patientenserum) unverdünnt eingebracht werden. Bei diesem Versuch wurden nun je 50 µl Testserum in der Verdünnung 1:2, 1:4 und 1:8 (mit 1 × DPBS) eingebracht.

Durch das Verdünnen des eingesetzten Testserums mit 1 × DPBS nahm in beiden Zellgruppen die Sensitivität stark ab. Je nach Verdünnung und Zellgruppe sanken die Extinktionswerte, die die Anwesenheit von HLA-Antikörpern wiedergeben, zwischen 24,8 % und 72,3 %. Im Durchschnitt reduzierten sich die Extinktionswerte der Negativkontrollen, „internen Negativkontrollen“ und den Ansätzen ohne Serum in beiden Zellgruppen weder bei der Verdünnung auf eine 1:2-Lösung noch auf eine 1:4-Lösung deutlich.



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	ko	ohne Serum
Referenz	2,538 ± 0,134	0,400 ± 0,071	0,285 ± 0,056	0,180 ± 0,020
Testserum 1:2 verdünnt	1,788 ± 0,125	0,374 ± 0,069	0,262 ± 0,030	0,154 ± 0,030
Testserum 1:4 verdünnt	1,289 ± 0,156	0,363 ± 0,057	0,283 ± 0,023	0,110 ± 0,012
Testserum 1:8 verdünnt	0,704 ± 0,105	0,229 ± 0,025	0,219 ± 0,012	0,126 ± 0,031

Abbildung 19: Konzentrationsänderung des Testserums (Zelle #04)



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Referenz	0,203 ± 0,034	2,709 ± 0,161	0,184 ± 0,034	0,097 ± 0,017
Testserum 1:2 verdünnt	0,202 ± 0,041	2,037 ± 0,130	0,165 ± 0,013	0,095 ± 0,011
Testserum 1:4 verdünnt	0,218 ± 0,013	1,844 ± 0,102	0,133 ± 0,023	0,082 ± 0,009
Testserum 1:8 verdünnt	0,114 ± 0,007	0,962 ± 0,120	0,115 ± 0,011	0,070 ± 0,008

**Abbildung 20: Konzentrationsänderung des Testserums (Zelle #08)**

Bei allen folgenden Versuchen wurde weiterhin unverdünntes Testserum eingesetzt.

### 3.2.8 Verwendung verschiedener Lysepuffer

Der im Standard-MAILA-Protokoll verwendete Lysepuffer (LP) zum Herauslösen der membrangebundenen HLA-Antigene durch Lyse der Lymphozyten setzt sich wie folgt zusammen: 2,4 g Tris, 8,76 g Natriumchlorid, 9,5 ml Triton X-100 und 1,86 g EDTA in 1 l Aqua dest. gelöst und auf pH = 7,4 eingestellt.

Die in diesem Versuch verwendeten Lysepuffer haben folgende Zusammensetzung:

**LP1:** 1 % NP40, 150 mmol/l Natriumchlorid, 1 mmol/l EDTA, 100 µmol/l Natriumoxybutat, 1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mmol/l Jodacetamid, 50 mmol/l Tris-Cl; gelöst in Aqua dest.; pH = 7,5.

**LP2:** 0,1 % Triton X-100, 0,3 mol/l Natriumchlorid, 1,5 mmol/l Magnesiumchlorid, 0,2 mmol/l EDTA, 0,5 mmol/l DTT, 0,1 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 20 mmol/l  $\beta$ -Glycerophosphat, 25 mmol/l HEPES; gelöst in Aqua dest.; pH = 7,6.

**LP3 (DC-Lysat):** 1 mmol/l Kaliumchlorid, 30 mmol/l Natriumchlorid, 35 mmol/l Magnesiumchlorid, 10 mmol/l  $\text{ATP}[\text{Na}]_2$ , 12,5 mmol/l EGTA, 100 mmol/l Pipes, 100 µl 5%iges NP40; gelöst in Aqua dest.; pH = 6,8.

**LP4 (NET-Puffer):** 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l Natriumchlorid, 5 mmol/l EDTA, 1 % Triton X-100, 100 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; gelöst in Aqua dest.; pH = 7,4.

**LP5:** 1 % Triton X-100, 10 mmol/l Tris, 5 mmol/l EDTA, 50 mmol/l Natriumchlorid, 30 mmol/l  $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$ , 50 mmol/l NaF, 100 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; gelöst in Aqua dest.; pH = 7,6.

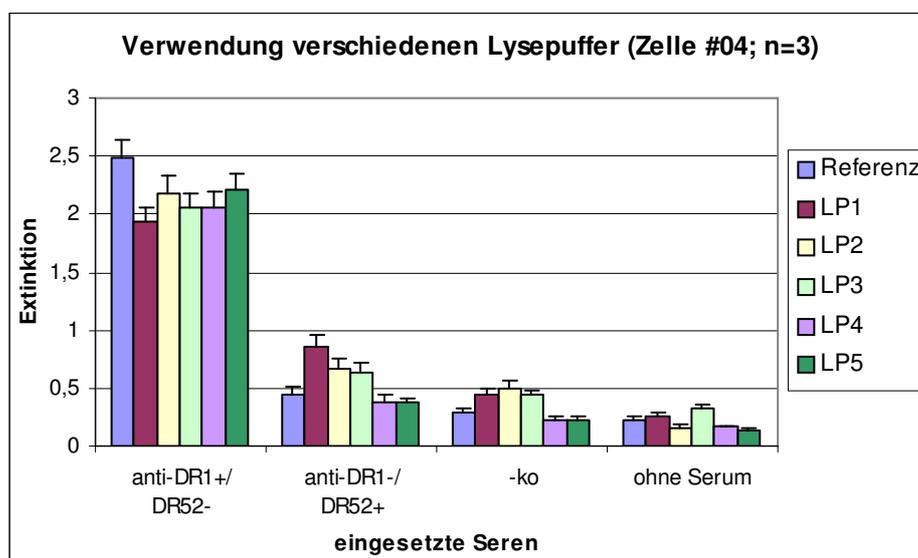
Protease-Inhibitor-Cocktail wird bei jedem Puffer in der Konzentration von 50 µl Protease-Inhibitor-Cocktail je 950 µl Lysepuffer verwendet. Je Pellet werden, nach Standard-Protokoll, 100 µl Lysepuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben.

Zunächst lässt sich zusammengefasst sagen, dass die Lysepuffer LP1, LP2 und LP3 im Vergleich zu den Referenzwerten keine Verbesserung der Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe erbrachten. Es stellte sich sogar eine Verschlechterung ein, da die Extinktionswerte, die die Anwesenheit von HLA-Klasse-II-Antikörpern anzeigen, abnahmen, während die Negativkontrollen sowie die Extinktionswerte der Ansätze ohne Testserum im Durchschnitt anstiegen. Darum wurden diese Lysepuffer wieder verworfen.

Vergleicht man die Extinktionswerte des LP5 mit den Referenzwerten des Standardlysepuffers, so fällt auf, dass diese in den beiden Zellgruppen nicht gleich reagierten. In der Zellgruppe #04 sanken die Extinktionswerte der Negativkontrollen, der „internen

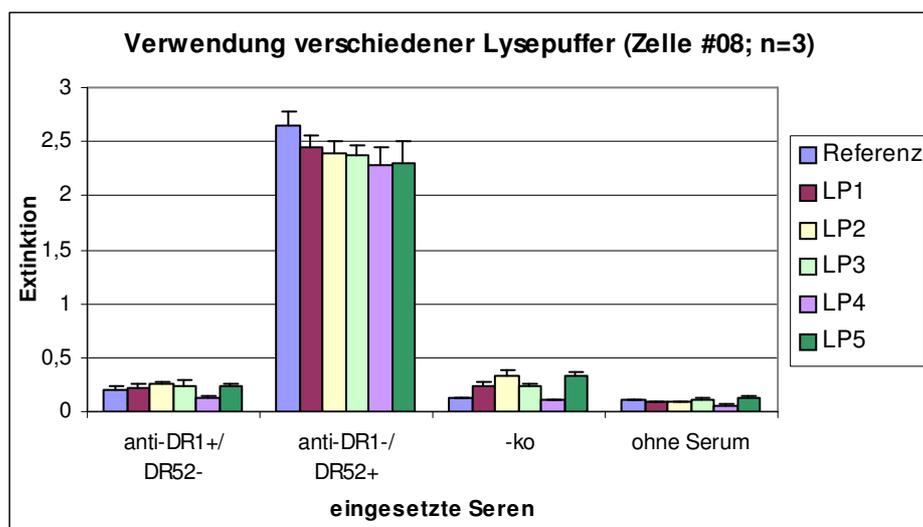
Negativkontrollen“ sowie die Extinktionswerte der Ansätze ohne Serum ab, während sie in der Zellgruppe #08 anstiegen.

Bei der Verwendung des LP4 sanken sowohl in der Zellgruppe #04 als auch in der Zellgruppe #08 die Extinktionswerte der Negativkontrolle, der „internen Negativkontrolle“ sowie der Extinktionswert des Ansatzes ohne Serum im Vergleich zum Referenzwert ab. Die Negativkontrolle reduzierte sich um 20,4 % (bei den Zellen #04) bzw. um 15,4 % (bei den Zellen #08); die Werte der „internen Negativkontrolle“ sanken um 15,3 % bzw. 37,6 %. Die Extinktionswerte der Ansätze ohne Serum nahmen sogar um 25,8 % bzw. 41,3 % ab. Gleichzeitig reduzierten sich jedoch die Extinktionswerte, die die Anwesenheit von HLA-Antikörpern im Serum wiedergeben, nur um 16,8 % (bei den Zelle #04) bzw. um 13,9 % (bei den Zellen #08).



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Referenz	2,480 ± 0,163	0,451 ± 0,061	0,289 ± 0,043	0,221 ± 0,032
LP1	1,930 ± 0,134	0,851 ± 0,106	0,446 ± 0,046	0,260 ± 0,024
LP2	2,174 ± 0,156	0,666 ± 0,089	0,501 ± 0,067	0,162 ± 0,021
LP3	2,064 ± 0,110	0,642 ± 0,078	0,454 ± 0,026	0,334 ± 0,033
LP4	2,064 ± 0,130	0,382 ± 0,056	0,230 ± 0,034	0,164 ± 0,006
LP5	2,205 ± 0,146	0,375 ± 0,043	0,223 ± 0,031	0,142 ± 0,009

**Abbildung 21: Verwendung verschiedenen Lysepuffer (Zelle #04)**



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Referenz	0,210 ± 0,036	2,649 ± 0,134	0,123 ± 0,011	0,104 ± 0,008
LP1	0,225 ± 0,026	2,452 ± 0,110	0,247 ± 0,023	0,088 ± 0,007
LP2	0,249 ± 0,031	2,385 ± 0,124	0,331 ± 0,050	0,089 ± 0,012
LP3	0,245 ± 0,046	2,378 ± 0,089	0,235 ± 0,030	0,118 ± 0,008
LP4	0,131 ± 0,021	2,281 ± 0,169	0,104 ± 0,012	0,061 ± 0,011
LP5	0,233 ± 0,022	2,300 ± 0,210	0,331 ± 0,041	0,122 ± 0,021

Abbildung 22: Verwendung verschiedenen Lysepuffer (Zelle #08)

Da unter den Lysepuffern LP4, LP5 und dem (Referenz) kein Lysepuffer als der eindeutig effizienteste identifiziert werden konnte, wurde im Folgeversuch zuerst die Effizienz verschiedener Fixierungspuffer unter dem Standard-Lysepuffer getestet, um anschließend unter der für B-lymphoblastoide Zellen besten Fixierung erneut die Lysepuffer LP4, LP5 und den Standard-LP miteinander zu vergleichen.

### 3.2.9 Verwendung verschiedener Fixierungspuffer

Nach dem Standard-MAILA-Protokoll wurden die aus der Zellkultur entnommenen und abzentrifugierten Zellen (siehe „Fixierung B-lymphoblastoider Zellen (Standardprotokoll)“) in 2 ml 1 %iger Paraformaldehydlösung (1.500 µl 1 × DPBS (200 ml 10 × DPBS in 1.800 ml Aqua ad iniectabilia) sowie 500 µl 4% Formaldehydlösung (Sigma-Altrich, Steinheim)) für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Abzentrifugieren des

Kulturmediums erfolgte nach dem Standard-MAILA-Protokoll also kein zusätzlicher Waschschrift. Diese Methode diene als Referenz.

*Folgende Fixierungen wurden getestet:*

**Natriumazidfixierung:** Nach der Entnahme aus der Zellkultur und dem Abzentrifugieren des Kulturmediums wurden die lymphoblastoiden Zellen zunächst in 6 ml  $1 \times$  DPBS für 5 min bei  $12 \times g$  gewaschen, im MikroZellcounter CC-130 (Sysmex, Colora Messtechnik, Lorch) gezählt und die Suspension auf  $1 \times 10^4$  Zellen je  $\mu$ l  $1 \times$  DPBS eingestellt. Zu je 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden 100  $\mu$ l 5 mM Natriumazidfixierlösung (mit 1 % Formaldehyd und 2 % Glucose) zugegeben und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert.

**Glutaraldehydfixierung:** Auch nach diesem Protokoll wurden die lymphoblastoiden Zellen nach der Entnahme aus der Zellkultur und dem Abzentrifugieren des Kulturmediums zunächst in 6 ml  $1 \times$  DPBS für 5 min bei  $12 \times g$  gewaschen, im MikroZellcounter CC-130 (Sysmex, Colora Messtechnik, Lorch) gezählt und die Suspension mit  $1 \times$  DPBS auf  $1 \times 10^4$  Zellen je  $\mu$ l eingestellt. Zur Fixierung wurden zu je 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension 100  $\mu$ l 2 %ige Glutaraldehydlösung gegeben. Es wurde anschließend für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

**Behandlung der Zellen mit Cytochalasin-B + Paraformaldehydfixierung:** Die Zellen wurden nach dem Abzentrifugieren des Kulturmediums 1-mal mit 6 ml  $1 \times$  DPBS für 5 min bei  $12 \times g$  gewaschen. Mit Hilfe des MikroZellcounter CC-130 (Sysmex, Colora Messtechnik, Lorch) wurden die in 500  $\mu$ l  $1 \times$  DPBS aufgenommenen Zellen gezählt und die Zellzahl der Suspension auf  $4 \times 10^3$  Zellen / $\mu$ l eingestellt. Zu  $4 \times 10^3$  Zellen wurden dann 200  $\mu$ l 10  $\mu$ M Cytochalasin-B-Lösung (Sigma-Altrich, Steinheim; mit 0,2 % Dimethylsulfoxid) zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1-mal mit 6 ml  $1 \times$  DPBS für 5 min bei  $12 \times g$  gewaschen und, wie im Standard-Protokoll beschrieben, mit Paraformaldehydlösung fixiert.

**Paraformaldehydfixierung + Waschen der Zellen vor der Fixierung:** Da bei allen „neuen“ Fixierungsprotokollen nach dem Abzentrifugieren des Kulturmediums die Zellen noch vor der Fixierung 1-mal gewaschen wurden, wurde auch ein Versuchsansatz getestet, bei dem vor der

Standard-Paraformaldehyd-Fixierung die Zellen 1-mal mit 6 ml  $1 \times$  DPBS bei  $12 \times g$  für 5 min einem Waschschrift unterzogen wurden.

Bei allen Fixierungsprotokollen wurde nach der Inkubation die Fixierlösung durch zweimaliges Waschen mit 6 ml  $1 \times$  DPBS bei  $245 \times g$  (5 min) entfernt, das Zellpellet im Anschluss in 200 – 400  $\mu$ l (je nach Zellmenge)  $1 \times$  DPBS aufgenommen und die Zellsuspension auf  $10 \times 10^3$  Zellen/ $\mu$ l eingestellt. Bei allen Versuchen wurde wie gewohnt 50  $\mu$ l dieser Zellsuspension je 50  $\mu$ l Testserum eingesetzt.

In allen Ansätzen wurde der Standard-Lysepuffer zur Lyse der Lymphozyten eingesetzt.

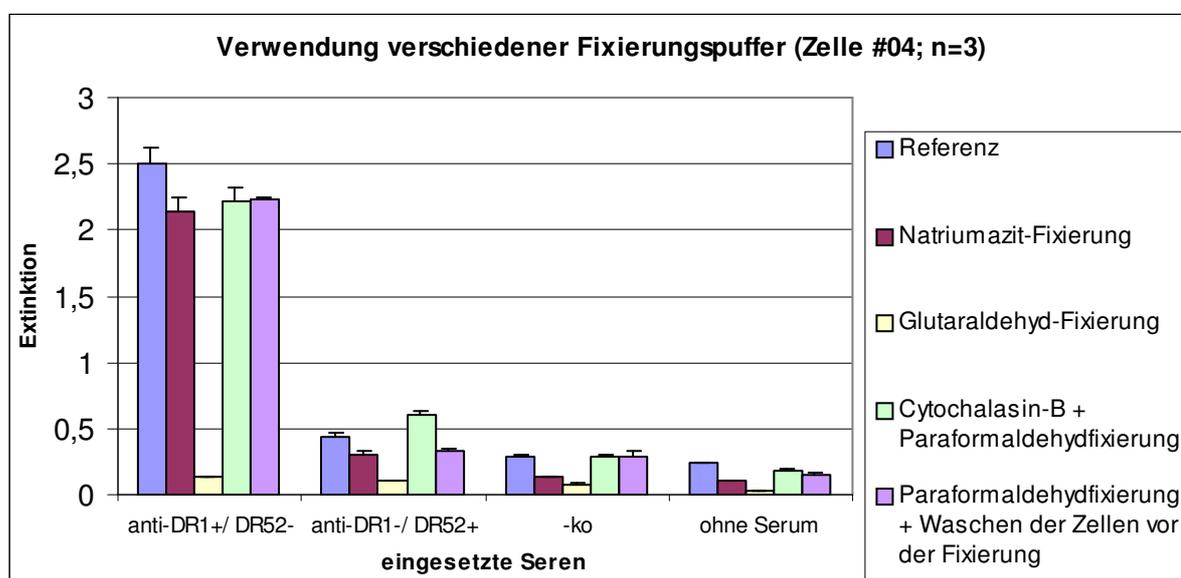
In beiden Zellgruppen erbrachte die Anwendung der Glutaraldehydfixierung bei den Ansätzen, die laut Kontrolle die Anwesenheit von HLA-Klasse-II-Antikörpern aufzeigen, Extinktionswerte um 0,1. In der Kontrolle lagen die entsprechenden Extinktionswerte bei 2,51 (#04-Zellen) bzw. 2,701 (#08-Zellen), also deutlich höher. Demnach ist die Glutaraldehydfixierung keine effektive Fixierungsmethode für B-lymphoblastoide Zellen.

Bei den Ansätzen, bei denen die Zellen eingebracht wurden, die vor der Fixierung mit Cytochalesin-B behandelt wurden, ergaben die Negativkontrollen sowie die Ansätze ohne Serum in etwa gleich hohe Extinktionswerte wie in der jeweiligen Kontrollgruppe. In der #04-Zellgruppe stieg der Extinktionswert der „internen Negativkontrolle“ im Vergleich zum Referenzwertwert sogar noch an.

Der zusätzliche Waschschrift der Zellen vor der Formaldehydfixierung erbrachte eine Verbesserung der Extinktionswerte in Form von Reduktion des Hintergrundsignals. Die Extinktionswerte der Negativkontrollen sanken im Vergleich zu den Referenzwerten um 1,4 % bei den #04-Zellen sowie um 22,7 % bei den #08-Zellen; die Werte der „internen Negativkontrollen“ reduzierten sich um 26,2 % bzw. 31,4 %. Der Wert des Testansatzes ohne zugefügtem Serum sank in der #04-Zellgruppe um 37,5 % (verglichen mit dem Referenzwert), während in der #08-Zellgruppe der Extinktionswert dieses Ansatzes um 17,3 % anstieg. Die Werte beider Ansätze mit Bildung spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe sanken um 10 %.

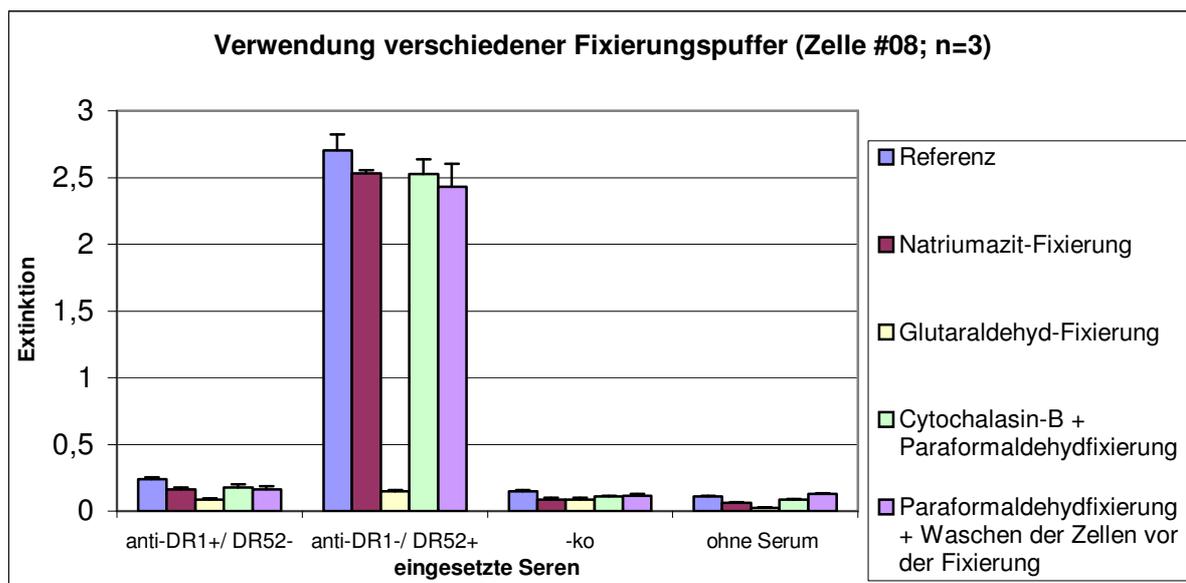
Jedoch nahmen bei der Verwendung von Natriumazidfixierung die Extinktionswerte aller Ansätze, bei denen kein Antigen-Antikörper-Komplex gebildet werden konnte (Negativkontrolle, „interne Negativkontrolle“, Ansätze ohne Serum), noch stärker ab als bei

der Fixierung mit Paraformaldehyd mit zusätzlichem Waschschrift. Beim Einsatz der Seren, die jeweils die andere HLA-DR-Klasse an Antikörpern enthielten als die auf der Zelle exprimierten Antigene („interne Negativkontrolle“), sanken die Extinktionswerte um 31 % (bei den #04-Zellen) bzw. 32,6 % (bei den #08-Zellen); die Extinktionswerte der Negativkontrollen sanken um 54,6 % bzw. 42,7 %. Bei den Ansätzen ohne Serum nahmen die Extinktionswerte Vergleich zu den Referenzwerten sogar um 58,7 % (bei den #04-Zellen) bzw. 41,8 % (bei den #08-Zellen) ab. Gleichzeitig nahmen die Extinktionswerte der Ansätze, bei denen sich spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe ausgebildet hatten, nur um 14,6 % (bei den #04-Zellen) bzw. 6,4 % (bei den #08-Zellen) im Vergleich zu den Referenzwerten ab.



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Referenz	2,510 ± 0,114	0,442 ± 0,026	0,291 ± 0,006	0,240 ± 0,004
Natriumazid-Fixierung	2,143 ± 0,109	0,305 ± 0,025	0,132 ± 0,007	0,099 ± 0,002
Glutaraldehyd-Fixierung	0,132 ± 0,007	0,098 ± 0,014	0,080 ± 0,006	0,034 ± 0,003
Cytochalasin-B + Paraformaldehydfixierung	2,220 ± 0,109	0,602 ± 0,033	0,289 ± 0,012	0,175 ± 0,015
Paraformaldehydfixierung + Waschen der Zellen vor der Fixierung	2,237 ± 0,016	0,326 ± 0,014	0,287 ± 0,039	0,150 ± 0,012

**Abbildung 23: Verwendung verschiedener Fixierungspuffer (Zelle #04)**



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Referenz	0,239 ± 0,015	2,701 ± 0,124	0,150 ± 0,006	0,110 ± 0,005
Natriumazid-Fixierung	0,161 ± 0,016	2,529 ± 0,024	0,086 ± 0,013	0,064 ± 0,005
Glutaraldehyd-Fixierung	0,087 ± 0,011	0,150 ± 0,006	0,086 ± 0,013	0,026 ± 0,002
Cytochalasin-B + Paraformaldehydfixierung	0,179 ± 0,024	2,526 ± 0,112	0,110 ± 0,003	0,084 ± 0,009
Paraformaldehydfixierung + Waschen der Zellen vor der Fixierung	0,164 ± 0,025	2,432 ± 0,171	0,116 ± 0,014	0,129 ± 0,007

**Abbildung 24: Verwendung verschiedener Fixierungspuffer (Zelle #08)**

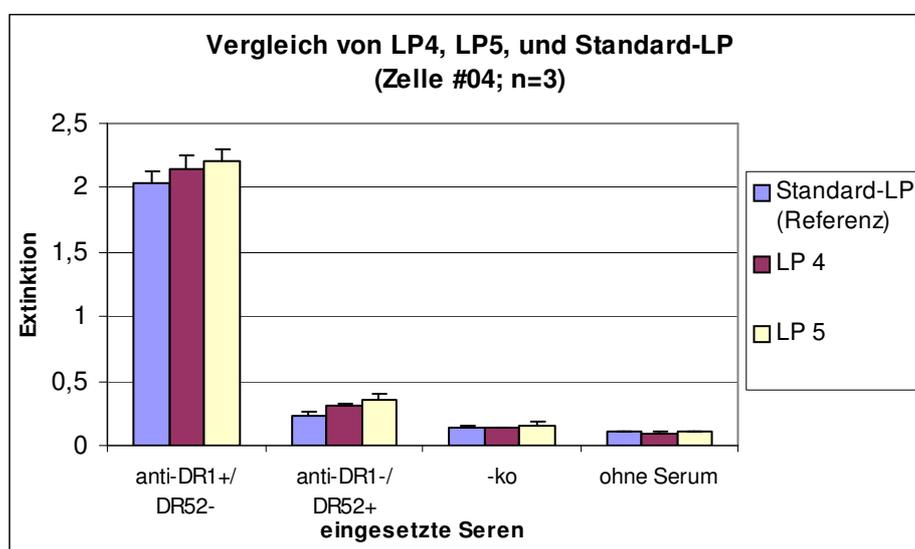
Aus diesen Ergebnissen ist der Schluss zu ziehen, dass die Natriumazidfixierung im Vergleich zum Fixierungspuffer des Standard-MAILA-Protokolls sowie in Vergleich zu allen anderen getesteten Fixierungspuffern die effektivste Methode zur Fixierung B-lymphoblastoider Zellen darstellt.

### 3.2.10 Vergleich von Lysepuffer 4, Lysepuffer 5 und Standardlysepuffer

Unter Verwendung der Natriumazidfixierung wurden die Lysepuffer LP4 und LP5 sowie der Standard-LP (Referenz) erneut im Vergleich zueinander analysiert, um eventuell ein eindeutigeres Ergebnis hinsichtlich der Wahl des Lysepuffers zu erhalten.

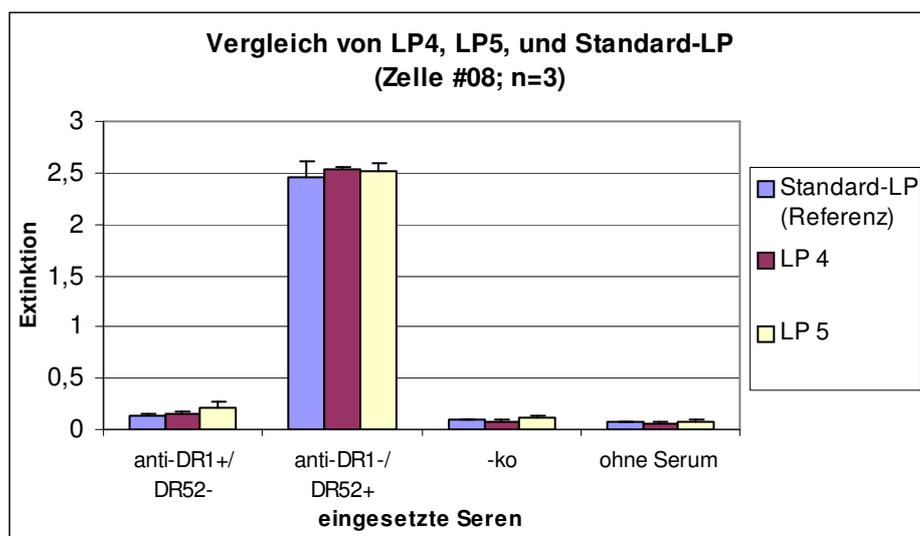
Von allen verwendeten Lysepuffern wies bei dieser Gegenüberstellung der Lysepuffer LP5 bei den Negativkontrollen, den Ansätzen ohne Serum sowie bei den „internen Negativkontrollen“ immer die höchsten Extinktionswerte und damit die geringste Spezifität auf.

Zwischen dem Standardlysepuffer und dem Lysepuffer LP4 war nun unter Verwendung der Natriumazidfixierung ein deutlicherer Unterschied zu erkennen als unter Verwendung der Paraformaldehydfixierung. Die Extinktionswerte der Negativkontrollen sowie die Extinktionswerte der Ansätze ohne Serum lagen in beiden Zellgruppen beim Lysepuffer LP4 leicht unter den entsprechenden Extinktionswerten beim Standardlysepuffer. Gleichzeitig waren die Extinktionswerte, die die Anwesenheit von HLA-Klasse-II-Antikörpern anzeigten, beim Lysepuffers LP4 in beiden Zellgruppen höher als die entsprechenden Extinktionswerte beim Standardlysepuffer.



Zelle #04 (DR1+/DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Standard-LP (Referenz)	2,040 ± 0,094	0,236 ± 0,030	0,136 ± 0,014	0,101 ± 0,008
LP 4	2,143 ± 0,109	0,305 ± 0,025	0,132 ± 0,007	0,099 ± 0,002
LP 5	2,212 ± 0,091	0,359 ± 0,035	0,159 ± 0,022	0,111 ± 0,002

Abbildung 25: Vergleich von LP4, LP5, und Standard-LP (Zelle #04)



Zelle #08 (DR1-/DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Standard-LP (Referenz)	0,141 ± 0,006	2,451 ± 0,166	0,092 ± 0,009	0,072 ± 0,001
LP 4	0,161 ± 0,016	2,529 ± 0,024	0,086 ± 0,013	0,064 ± 0,005
LP 5	0,209 ± 0,053	2,508 ± 0,079	0,112 ± 0,021	0,083 ± 0,009

**Abbildung 26: Vergleich von LP4, LP5, und Standard-LP (Zelle #08)**

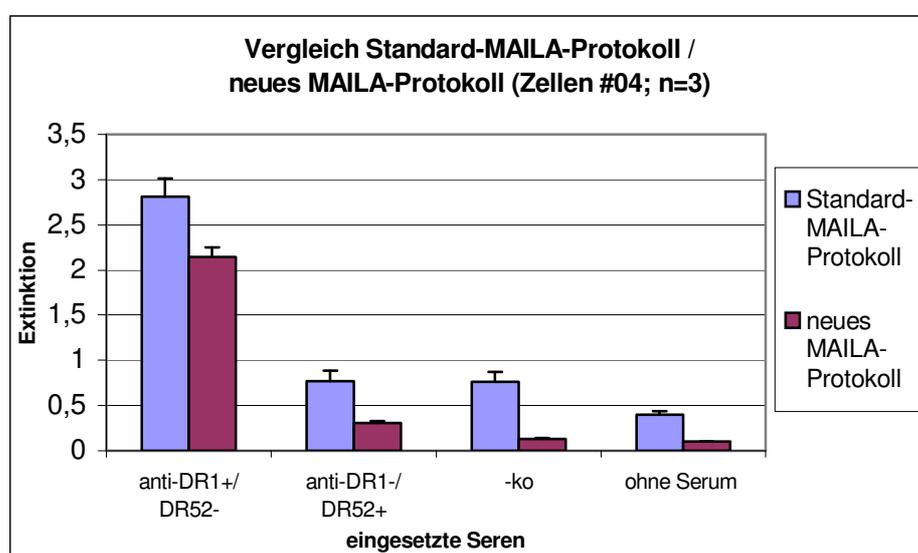
Demnach ist unter der Verwendung des Lysepuffers LP4 sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität des MAILA höher als unter Verwendung des Standardlysepuffers.

### 3.2.11 Vergleich des Standard-MAILA-Protokolls mit dem neuen MAILA-Protokoll

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen bei verbesserter Dissoziation und Fixierung ein optimales Verhältnis von Hintergrund- zu Signalreduktion bei folgender Kombination:

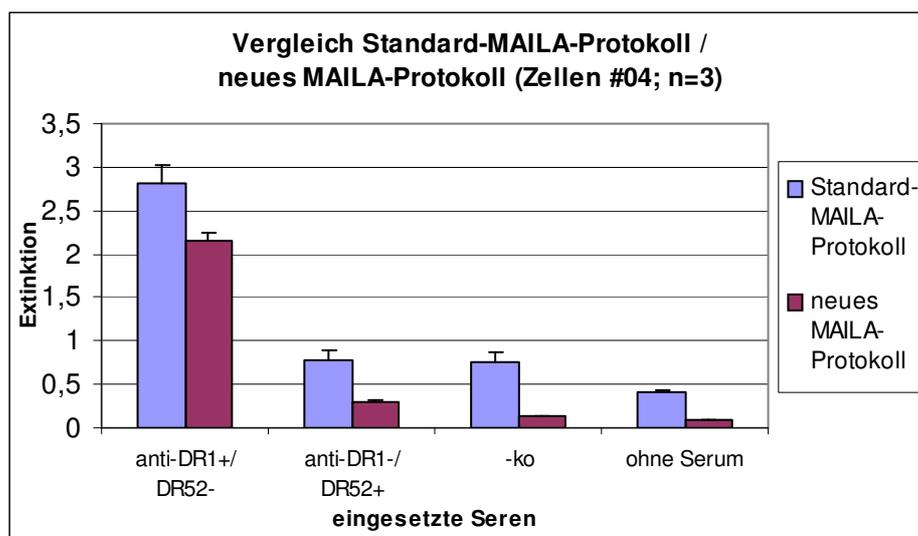
- Es werden nun stets EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zellen verwendet, die drei Tage vor dem Einsetzen in den MAILA in Kultur genommen werden.
- Zu dem MAINA-Waschpuffer wird kein Albumin zugegeben.
- Die Konzentration des eingebrachten Antigen-Antikörper-Komplexes beträgt 30 µl Lyseüberstand verdünnt mit 220 µl MAINA-Waschpuffer.
- Der Standardlysepuffer wurde durch den NET-Lysepuffer ersetzt.
- LP4 (NET-Puffer): 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l Natriumchlorid, 5 mmol/l EDTA, 1 % Triton X-100, 100 mmol/l Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; gelöst in Aqua dest.; pH = 7,4.
- Die Paraformaldehydfixierung des Standard-MAILA-Protokolls wurde durch Natriumazidfixierung ersetzt.

Durch die Protokolländerungen sanken die Extinktionswerte der „internen Negativkontrollen“ um 60,2 % (in der Zellgruppe #04) bzw. um 62,4 % (in der Zellgruppe #08). Im Vergleich zu den entsprechenden Extinktionswerten des ursprünglichen Standard-MAILA-Protokolls sanken die Extinktionswerte der Ansätze ohne Serum im neuen MAILA-Protokoll um 75,4 % in der Zellgruppe #04 und um 78,8 % in der Zellgruppe #08. In den Negativkontroll-Ansätzen nahmen die unspezifischen Bindungen derart ab, dass sich der Wert der Extinktion im MAILA um 82,7 % (in der Zellgruppe #04) bzw. 81,7 % (in der Zellgruppe #08) reduzierte. Die Extinktionswerte der Testansätze, die jeweils die Anwesenheit spezifischer HLA-Klasse-II-Antikörper wiedergeben, reduzierten sich um 23,8 % bzw. 16,4 %.



Zelle #04 (DR1+ / DR52-)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Standard-MAILA- Protokoll	2,813 ± 0,204	0,767 ± 0,120	0,763 ± 0,106	0,403 ± 0,030
neues MAILA- Protokoll	2,143 ± 0,109	0,305 ± 0,025	0,132 ± 0,007	0,099 ± 0,002

**Abbildung 27: Vergleich Standard-MAILA-Protokoll / neues MAILA-Protokoll (Zellen #04)**



Zelle #08 (DR1- / DR52+)	anti-DR1+/ DR52-	anti-DR1-/ DR52+	-ko	ohne Serum
Standard-MAILA- Protokoll	0,428 ± 0,004	3,025 ± 0,127	0,470 ± 0,083	0,302 ± 0,035
neues MAILA- Protokoll	0,161 ± 0,016	2,529 ± 0,024	0,086 ± 0,013	0,064 ± 0,005

**Abbildung 28: Vergleich Standard-MAILA-Protokoll / neues MAILA-Protokoll (Zellen #08)**

## 4 Diskussion

### 4.1 Screening der mehrfach schwangeren Spenderinnen

In Bezug auf die Vermeidung von TRALI-Fällen, die auf die Transfusion von plasmareichen Blutkomponenten von mehrfach schwangeren Spenderinnen zurückzuführen sind, wurde in der Blutbank der Universitätsklinik Gießen die Strategie des Screenings auf leukozytenreaktive Antikörper ab der dritten Schwangerschaft etabliert. In den vier Jahren der Studie trat kein Fall auf, bei dem sich eine TRALI durch Transfusion von plasmahaltigen Komponenten gescreenter, mehrfach schwangerer Spenderinnen entwickelte. Insgesamt wurden in diesem Zeitraum Blutspenden von 229 Erstspenderinnen, die bereits mindestens dreimal schwanger waren, gescreent. Letztlich enthielten davon 91 Proben leukozytenreaktive Antikörper (= 39,7 % der gescreenten Seren). Die meisten Seren (71 % der in mindestens einem Test positiven Seren) reagierten positiv im LIFT und/oder im HLA-ELISA, was auf die Anwesenheit von HLA-Antikörpern schließen lässt und somit mit früheren Berichten über die HLA-Immunsierung bei Schwangeren übereinstimmt (Clay et al., 1984; Densmore et al., 1999; Maslanka et al., 2007). Da der im Vergleich zum LIFT sensitivere HLA-ELISA die Rate der erkannten Seren, die lymphozytenreaktive Antikörper enthielten, deutlich an hob, rechtfertigt dies die Einführung dieses zusätzlichen Screening-Tests.

Eine interessante Beobachtung ist jedoch, dass 26 Seren (29 % der in mindestens einem Test positiven Seren) im GIFT und/oder GAT granulozytenreaktive Antikörper aufwiesen, diese jedoch weder im LIFT noch im HLA-ELISA als HLA-Antikörper spezifiziert werden konnten. Diese wichtige Beobachtung zeigt, dass in einer relevanten Anzahl von mehrfach schwangeren Spenderinnen granulozytenreaktive Antikörper im Serum vorhanden sind, wobei diese nicht als HLA-Antikörper identifiziert werden können. Damit würde eine Screening Methode, die ausschließlich auf den Nachweis von HLA-Antikörpern basiert, einen relevanten Prozentsatz von Spenderinnen nicht erfassen. Nicht erkannt würden diejenigen Spenderinnen, die sich während einer ihrer Schwangerschaften gegen granulozytenreaktive Antikörper des Feten immunisiert haben, bei deren Antikörper es sich jedoch nicht um HLA-Antikörper handelt. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu einem Bericht von Maslanka et al., in dem nur eine von 62 immunisierten Frauen granulozytenreaktive Antikörper, jedoch keine HLA-Antikörper aufwies (Maslanka et al., 2007). Ob dieser Unterschied auf die eingesetzten Methoden zurückzuführen ist (GIFT und GAT sind nur

unzureichend standardisierte Tests) oder auf die Tatsache, dass die Anzahl der Schwangerschaften einen Einfluss auf die Immunisierung der Mütter hat, bleibt im Moment unklar. Das Analysieren einer männlichen Vergleichsgruppe (ohne erhaltene Bluttransfusion in der Vergangenheit) zeigte jedoch die hohe Spezifität der von uns verwendeten Testverfahren GIFT und GAT auf. Ein Unterschied liegt vielmehr darin, dass wir ausschließlich Frauen ab der dritten Schwangerschaft screenen, wohingegen Maslanka et al. Frauen unabhängig von der Anzahl der Schwangerschaften screenen (Maslanka et al., 2007). Die granulozytenreaktiven Antikörper besagter 26 Seren konnten mit Hilfe des MAIGA auch nicht als HNA-Antikörper spezifiziert werden. Es bleibt somit unklar, ob die GIFT/GAT-Ergebnisse dieser Seren falsch positiv waren oder die Seren HNA-Antikörper noch nicht bekannter Spezifität enthielten. Auch besteht die Möglichkeit, dass diese Seren durch die Anwesenheit von Antikörpern gegen noch völlig ungekannte Granulozytenantigenklassen im GIFT reagierten. In vielen Arbeiten wurde berichtet, dass Antikörper gegen bekannte HNA-Antigene eine TRALI auslösen können (Yomtovian et al., 1984; Nordhagen et al., 1986; Bux et al., 1996; Leach et al., 1998), jedoch wurde die Anwesenheit von spezifischen HNA-Antikörpern in Spenderplasma in einer großen Studie von Clay et al. (1984) nur mit einer Häufigkeit von weniger als 1:1.000 bestimmt. Diese Ergebnisse von Clay et al. (1984) stimmen mit den Beobachtungen unserer Studie überein, in der im MAIGA keine Spezifität der zuvor im GIFT und/oder GAT nachgewiesenen Antikörper bestimmt werden konnte. Im Gegensatz zur niedrigen Inzidenz von granulozytenreaktiven Antikörpern bekannter Spezifität wurde die Inzidenz von granulozytenreaktiven Antikörpern unbekannter Spezifität mit 1:20 in Studien mit mehrfach schwangeren Frauen angegeben (Skacel et al., 1989). Ob auch granulozytenreaktive Antikörper von unbekannter Spezifität eine TRALI auslösen können ist noch unklar, wobei jedoch in einigen wenigen Fällen die Anwesenheit solcher Antikörper in Seren von Spendern, die in einen TRALI-Fall involviert waren, bestätigt wurde (Stainsby et al., 2003). Damals wurde im Bericht des Serious Hazards of Transfusion (SHOT) von 18 Patienten berichtet, die in Folge einer TRALI beatmungspflichtig geworden sind. Während bei drei dieser Patienten keine Antikörper in den transfundierten Blutkomponenten nachgewiesen werden konnten, wurden in den transfundierten Blutkonserven von elf Patienten im Nachhinein HLA-Klasse-I- beziehungsweise HLA-Klasse-II-Antikörper oder Antikörper gegen beide HLA-Antigene gefunden. In einem Fall wies die plasmareiche Transfusion HNA-1a-Antikörper auf, in einem weiteren Fall konnten nach der TRALI-Reaktion Antikörper der Spezifität HNA-3a sowie HLA-Klasse-I-Antikörper im Serum des

entsprechenden Spenders nachgewiesen werden. In drei Fällen jedoch konnte die Spezifität der nachgewiesenen granulozytenreaktiven Antikörper nicht bestimmt werden (Stainsby et al., 2003). Ohne dass experimentelle Beweise hinzugezogen werden müssen, lassen diese Daten den Schluss zu, dass Spender, in deren Blut granulozytenreaktive Antikörper unbekannter Spezifität gefunden werden, von der Spende plasmareicher Blutkomponenten ausgeschlossen werden sollten.

Während des Betrachtungszeitraumes traten in der Universitätsklinik Gießen drei klinisch gut dokumentierte TRALI-Fälle auf, bei denen alle Patienten intubiert und beatmet werden mussten. Zwei dieser Plasmatransfusionsempfänger starben, ein Patient erholte sich innerhalb von drei Tagen und überlebte die transfusionsinduzierte Lungeninsuffizienz. Allerdings konnte nur einer der drei TRALI-Fälle auf die Anwesenheit von HLA-DR4-Antikörpern im Spenderserum zurückgeführt werden, welche mit den HLA-DR4-Antigenen des Empfängers reagierten. Diese Antikörper wurden Jahre nach dem Transfusionszwischenfall mit Hilfe des neu eingeführten, spezifischeren ELISAs nachgewiesen. Im zweiten TRALI-Fall, von dem berichtet wurde, muss eine nicht-immunogene TRALI in Betracht gezogen werden, da keine leukozytenreaktiven Antikörper im Spenderserum vorhanden waren. Beim dritten TRALI-Patienten waren sowohl HLA-Klasse-I- als auch HLA-Klasse-II-Antikörper mit der Spezifität HLA-A2 bzw. HLA-DR4 im Spenderserum vorhanden, die jedoch nicht durch das Screening erfasst wurden, da die Spenderin erst einmal schwanger gewesen war. Diese Antikörper reagierten mit den entsprechenden Antigenen auf den Granulozyten der Empfängerin und lösten so eine Reaktion aus, die zur TRALI führte. Zusammenfassend kann man sagen, dass die erweiterte Screening-Strategie, bei der der ELISA zusätzlich eingesetzt wird, bei früherem Einführen einen der drei TRALI-Fällen hätte verhindern können, da der ELISA eindeutig sensitiver ist als der LIFT. Andererseits hätte ein Screening, das alle Spenderinnen ab der ersten Schwangerschaft erfasst, zwei von drei TRALI-Fällen verhindern können.

Obwohl von Densmore et al. 1999 berichtet wurde, dass die Inzidenz der leukozytenreaktiven Antikörper mit der Anzahl der Schwangerschaften steigt, nämlich bei einer Schwangerschaft um 7,6 %, bei zwei um 14,6 % und bei drei oder mehr Schwangerschaften um 26,3 %, konnte durch den hier berichteten TRALI-Fall (Fall 3) gezeigt werden, dass es keine sichere Methode ist, die Anzahl der Schwangerschaften als alleinigen Indikator für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer TRALI zu verwenden. Demnach ist diesen Erkenntnissen nach die einzig

sichere Methode das Screening aller Frauen mit Schwangerschaftsanamnese unabhängig von der Anzahl ihrer bisherigen Schwangerschaften. Dies würde jedoch die Kosten für Blutkomponenten um ein Vielfaches erhöhen. Die letztendlichen Kosten wären abhängig davon, wie viele Spenderinnen durch positive Screenings von der Spende ausgeschlossen werden müssten (etwa jede dritte Frau) und wie lange ein einmaliges Negativergebnis als richtig angesehen werden kann, beziehungsweise Frauen ohne Antikörpernachweis bei späteren Spenden erneut gescreent werden müssten.

Auf der Suche nach einer neuen Strategie, die die Sicherheit von plasmahaltigen Blutkomponenten bezogen auf die TRALI erhöhen soll, scheint es, dass das Screening von Frauen nur dann sinnvoll ist, wenn alle Frauen mit Schwangerschaftsanamnese unabhängig von der Anzahl ihrer bisherigen Schwangerschaften getestet werden. Außerdem muss das Screeningverfahren neben der Erfassung von HLA-Antikörpern auch granulozytenreaktive Antikörper im Allgemeinen erfassen, da gezeigt wurde, dass in einigen Fällen Spenderinnen HLA-negativ sind, granulozytenreaktive Antikörper unbekannter Spezifität jedoch nachgewiesen werden können. In Anbetracht der Tatsache, dass die Relevanz von granulozytenreaktiven Antikörpern unbekannter Spezifität noch immer unklar ist und HNA-Antikörper bekannter Spezifität in sehr seltenen Fällen vorkommen (1:1.000; Clay et al., 1984), ist diese Strategie sehr kostenintensiv. Und letztendlich müsste eine relevante Anzahl der zuvor das kostenintensive Screening durchlaufenen Spenderinnen von der Spende plasmahaltiger Blutkomponenten ausgeschlossen werden. Berücksichtigt man diese Tatsache, so scheint der einzig vernünftige Weg das Verfolgen einer Strategie zu sein, die nur plasmahaltige Blutkomponenten zulässt, welche von Männern oder von Frauen, die noch nicht schwanger waren, gespendet wurden.

Im Falle der Thrombozytenapherese, bei der der Bedarf seltener Kombinationen aus ABO- und Rhesus-Gruppe, der Status der CMV (Zytomegalievirus)-Serologie und die Konstellation von HPA (humanes Plättchen Antigen) und/oder HLA dazu führen kann, dass Frauen, die bereits schwanger waren, doch nicht von der Spende ausgeschlossen werden, scheint jedoch ein Screening gerechtfertigt.

## 4.2 Etablierung des MAILA

Da für das Screening der mehrfach schwangeren Spenderinnen im Moment nur ein ELISA-Kit zum Nachweis spezifischer HLA-Antikörper vorliegt, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, den MAILA (monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigen assay) als Referenzmethode zum ELISA zu etablieren. Dabei stellte sich heraus, dass das MAIGA (monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigen assay) - Protokoll, aus welchem das MAILA-Standard-Protokoll (siehe „Material und Methoden“) entwickelt wurde, nicht ohne Weiteres auf Lymphozyten übertragen werden konnte. Zum einen bereitete die schwankende Expressionsrate der Antigene auf den Lymphozyten zu unterschiedlichen Tagen Probleme bei der Konstanthaltung der Testergebnisse. Des weiteren wies der MAILA ein zu hohes Hintergrundsignal auf, was daran zu erkennen war, dass die Extinktionswerte der Testansätze, bei denen kein Serum eingebracht wurde, also folglich auch keine Reaktion stattfinden konnte, mit 0,403 (bei den Zellen #04) bzw. 0,302 (bei den Zellen #08) zu stark positiv ausfielen. Als drittes Problem stellte sich die unzureichende Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe dar, was zur Folge hatte, dass ein HLA-Antigen mehrere Antikörper band und somit die Spezifität des MAILA zu niedrig war.

Um die HLA-Expressionsrate der B-lymphoblastoiden Zellen konstant zu halten und so keine Schwankungen innerhalb eines Testprotokolls zuzulassen, wurde in das neue MAILA-Protokoll aufgenommen, stets Zellen zu verwenden, die drei Tage vor Einbringen in den MAILA neu in Kultur gebracht wurden. Aus unseren Versuchsergebnissen lässt sich schließen, dass drei Tagen nach Beginn der Kultivierung der optimale Zeitpunkt der Lymphozytenernte ist, da dann die höchste Antigendichte erreicht und somit die Sensitivität des MAILA größtmöglich ist. Die Zytokine Interleukin-4 und Interferon  $\gamma$  trugen jedoch nicht dazu bei, die Antigenexpressionsrate zu erhöhen, was möglicherweise an der Tatsache liegt, dass unsere Zellen EBV-transformiert sind und nicht als ursprüngliche Immunzellen kultiviert werden können.

Remmele beschrieb 1995 in einem von ihm veröffentlichten Buch der Pathologie, dass Hintergrundsignale vier möglich Ursachen hätten: 1) eine zu hohe Antikörperkonzentration, welche sich durch eine optimale Verdünnung in Kombination mit einer eventuell verlängerten Inkubationszeit beheben ließe, 2) Antigen-Diffusion in die Umgebung, was sich vor allem bei

löslichen Antigenen durch schnelle, effektive Fixierung vermeiden ließe, 3) schlecht entparaffinierte Schnitte (was im MAILA keine Rolle spielt, da keine Paraffinschnittverfahren zum Einsatz kommen), 4) Eigenfluoreszenz beispielsweise von elastischen Fasern, was nicht vermeidbar wäre (Remmele, 1995).

Zur Reduktion des Hintergrundsignals war es also nötig die Menge an Antigen-Antikörper-Komplexen (Primärkomplexen) zu optimieren und so unspezifische Bindungen zu reduzieren. Dies gelang beim Einbringen einer 12 %igen Lyseüberstandslösung (30 µl Lyseüberstand / 220 µl MAINA-Waschpuffer) am effektivsten. Dadurch reduzierten sich die Extinktionswerte der Ansätze, bei denen spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen stattfanden, nur um 1,8 % (bei den #04-Zellen) bzw. 3,6 % (bei den #08-Zellen). Gleichzeitig nahmen die Extinktionswerte der Testansätze, bei denen kein Serum eingebracht wurde und die demnach auch keinerlei Antigen-Antikörper-Bindungen aufweisen konnten, um 53 % bzw. 51,8 % ab. Aufgrund der Tatsache, dass in den Lyseüberständen der Ansätze ohne eingebrachtem Serum auch keine Antikörper bzw. Antigen-Antikörper-Komplexe enthalten sind, kann davon ausgegangen werden, dass das Hintergrundsignal hier vor allem unspezifische Bindungen der Antigene darstellte, das durch diese Reduktion des eingebrachten Lyseüberstands verschwanden. Die Reduktion des Lyseüberstands auf eine 20 %ige LÜ-Lösung erbrachte zwar ebenfalls verbesserte Hintergrundsignale, jedoch lagen diese mit 3,5 % (als höchster Reduktionswert beider Zellgruppen bei den Ansätzen mit spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen) zu 24,9 % (als höchster Reduktionswert bei den Negativkontrollen beider Zellgruppen) in schlechterem Verhältnis zueinander wie bei der Verdünnung auf eine 12 %ige LÜ-Lösung (3,6 % Reduktion in beiden Zellgruppen bei den Ansätzen mit spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen zu 47,6 % Reduktion bei den Negativkontrollen).

Weitere Versuche zeigten, dass weder Albumin, was die Eigenschaft hat, unspezifische Bindungen abzufangen, noch die Reduktion des Testserums sowie des Sekundär-Antikörpers eine Minimierung des Hintergrundsignals zur Folge hatte.

Um eine bessere Fixierung der Zellen zu erreichen wurde die Effizienz der Natriumazidfixierung, der Glutaraldehydfixierung, der Behandlung mit Cytochalasin-B unter der Standard-Paraformaldehydfixierung sowie des Einführens eines zusätzlichen Waschschrilles bei der Standard-Paraformaldehydfixierung verglichen. Das im Versuch eingebrachte Cytochalasin-B hat die Eigenschaft, die Polymerisierung der Antigene zu verhindern, die dann im Pellet gebunden sind und somit nicht im Lyseüberstand zum

Einbringen in den MAILA zur Verfügung stehen. Da diese Methode im Vergleich zur Paraformaldehydfixierung ähnliche Extinktionswerte in den Negativkontrollen erbrachte und die Extinktionswerte der Testansätze, die jeweils die Anwesenheit spezifischer HLA-Klasse-II-Antikörper wiedergeben absanken, kann die Polymerisierung der Antigene in unserem MAILA-Protokoll nicht das Problem sein. Die Glutaraldehydfixierung wird vor allem dann eingesetzt, wenn man die Zellstruktur erhalten will, da diese eine intensive Quervernetzung zellulärer Proteine bewirkt; dabei geht jedoch in der Regel die Antigenizität verloren (DiDonato et al., 2003). Das könnte der Grund sein, weshalb in unserem Lyseüberstand nach der Glutaraldehydfixierung für eine effektive Antigen-Antikörper-Reaktion nicht mehr genug Antigene enthalten waren und diese Methode somit zur Fixierung B-lymphoblastoider Zellen ungeeignet ist. Beim Versuch, ob ein weiterer Waschgang vor der Paraformaldehydfixierung deren Effizienz steigern könne, stellte sich dies hinsichtlich des Hintergrundsignals als bessere Fixierungsmethode gegenüber der Standard-Paraformaldehydfixierung dar. Im Vergleich aller Fixierungsprotokolle zueinander stellte sich jedoch heraus, dass die Natriumazidfixierung zur Fixierung B-lymphoblastoider Zellen am besten geeignet ist. Dies lässt sich daraus schließen, dass, im Vergleich zu den Referenzwerten, alle Extinktionswerte der Ansätze, bei denen kein Antigen-Antikörper-Komplex gebildet werden konnte, zwischen 31 % und 58,7 % reduziert werden konnten, die Extinktionswerte der Ansätze, bei denen sich spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe ausbildeten, gleichzeitig nur um 14,6 % (bei den #04-Zellen) bzw. 6,4 % (bei den #08-Zellen) absanken. Dies spiegelt das gewünschte Ergebnis wieder – nur die Anzahl der unerwünschten, unspezifischen Bindungen sank ab, während gleichzeitig die spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen erhalten blieben. Die Spezifität nahm zu und die Sensitivität blieb hoch. Aus diesem Grund wurde der Paraformaldehydfixierpuffer des Standard-MAILA-Protokolls durch die Natriumazidfixierung ersetzt.

Das Problem der unzureichenden Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe sollte durch die Verwendung eines effektiveren Lysepuffers behoben werden. Getestet wurden neben dem Standardlysepuffer als Referenz fünf verschiedene Lysepufferprotokolle wobei sich schließlich der NET-Puffer (LP4) als der effektivste Lysepuffer für B-lymphoblastoide Zellen herausstellte. Im Vergleich der drei besten Lysepuffer zueinander unter Natriumazidfixierung wurde dieses Ergebnis bestätigt.

Nimmt man nun alle neuen Erkenntnisse aus den durchgeführten Versuchen zusammen und vergleicht die Extinktionswerte des neuen MAILA-Protokolls mit den ursprünglichen Extinktionswerten des Standard-MAILA-Protokolls, so ist anhand der adäquat gesunkenen Extinktionswerte ein starker Rückgang des Hintergrundsignals sowie eine verbesserte Dissoziation des Primärkomplexes zu erkennen. Durch die Protokolländerungen sank der Extinktionswert der „internen Negativkontrolle“ in der Zellgruppe #04 um 60,2 %; in der Zellgruppe #08 waren es 62,4 % Rückgang. Im Vergleich zu den entsprechenden Extinktionswerten des ursprünglichen Standard-MAILA-Protokolls sanken die Extinktionswerte der Ansätze ohne Serum im neuen MAILA-Protokoll um 75,4 % in der Zellgruppe #04 und um 78,8 % in der Zellgruppe #08. In den Negativkontroll-Ansätzen nahmen die unspezifischen Bindungen derart ab, dass sich der Wert der Extinktion im MAILA um 82,7 % (in der Zellgruppe #04) bzw. 81,7 % (in der Zellgruppe #08) reduzierte. Aus diesen Vergleichen geht hervor, dass sich die Spezifität des MAILA deutlich verbessern ließ.

Durch die Reduktion der unspezifischen Bindungen ließ sich auch die Sensitivität des MAILA verbessern. Die Extinktionswerte der Testansätze, die jeweils die Anwesenheit spezifischer HLA-Klasse-II-Antikörper wiedergeben, reduzierten sich zwar um 23,8 % bzw. 16,4 %, jedoch ist dieser Rückgang kein Verlust spezifischer Bindungen sondern vielmehr unspezifische Bindungen, die nun nicht mehr in diesem hohen Maße wie im Standard-MAILA-Protokoll vorkommen. Demnach reagiert das neue MAILA-Protokoll nun sensitiver auf die Anwesenheit spezifischer HLA-Klasse-II-Antikörper.

Der MAILA hat gegenüber dem ELISA den Vorteil, dass hierbei natives Antigen von Lymphozyten aus der Kultur eingebracht wird. Somit findet ein direkter Kontakt zwischen den Reaktionspartnern statt. Beim ELISA hingegen sind die Antigene auf der Testplatte angebracht.

Der Cut-off-Wert für ein Positiv-Ergebnis wurde beim MAILA mit dem dreifachen Wert der Negativkontrolle festgelegt. In uneindeutigen Fällen kann der MAILA eine zusätzliche Entscheidungshilfe sein bei der Frage, ob die Spenderin des entsprechenden Serums aufgrund enthaltener HLA-Antikörper von der Plasmaspende ausgeschlossen werden muss.

## 5 Literaturverzeichnis

Barnard R. D.: Indiscriminate transfusion: a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *New York State Journal of Medicine* 1951; 51:2399-2402.

Bass D. A., Olbrantz P., Szejda P., Seeds M. C., McCall C. E.: Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 1986; 136:860-866.

Berkow R. L., Wang D., Larrick J. W., Dodson R. W., Howard T. H.: Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 1987; 139:3783-3791.

Bøyum A.: A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum.* 1968; 97:51-76.

Brittingham T. E.: Immunologic studies on leukocytes. *Vox Sanguinis* 1957; 2:242-248.

Burns A. R., Smith C. W., Walker D. C.: Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiological Reviews* 2003; 83:309-336.

Busse W. W., Vrtis R. F., Steiner R., Dick E. C.: *In vitro* incubation with influenza virus primes human polymorphonuclear leukocyte generation of superoxide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1991; 4:347-354.

Bux J., Becker F., Seeger W., Kilpatrick D., Chapman J., Waters A.: Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *British Journal of Haematology* 1996; 93:707-713.

Bux J., Sachs U. J.: The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *British Journal of Haematology* 2007; 136:788-799.

Bux J., Kober B., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C.: Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfusion Medicine* 1993; 3:157-162.

Chapman C. E., Williamson L. M., Cohen H., Stainsby D., Jones H.: The impact of using male donor plasma on haemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury (TRALI) in the UK. *Vox Sanguinis* 2006; 91:227.

Clay M., Kline W., McCullough J.: The frequency of granulocyte-specific antibodies in postpartum sera and a family study of the 6B antigen. *Transfusion* 1984; 24:252-255.

Daniels R. H., Finnen M. J., Hill M. E., Lackie J. M.: Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology* 1992; 75:157-163.

Davoren A., Curtis B. R., Shulman I. A., Mohrbacher A. F., Bux J., Kwiatkowska B. J., McFarland J. G., Aster R. H.: TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion* 2003; 43:641-645.

Densmore T. L., Goodnough L. T., Ali S., Dynis M., Chaplin H.: Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion* 1999; 39:103-106.

DiDonato D., Brasaemle D. L.: Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2003; 51:773-780.

Doerschuk C. M.: Neutrophil rheology and transit through capillaries and sinusoids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1999; 159:1693-1695.

Dooren M. C., Ouwehand W. H., Verhoeven A. J., von dem Borne A. E., Kuijpers R. W.: Adult respiratory distress syndrome after experimental intravenous gamma-globulin concentrate and monocyte-reactive IgG antibodies. *Lancet* 1998; 352:1601-1602.

Downey G. P., Worthen G. S., Henson P.M., Hyde D. M.: Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. *The American Review of Respiratory Disease* 1993; 147:168-176.

Dry S. M., Bechar K. M., Milford E. L., Churchill W. H., Benjamin R. J.: The pathology of of transfusion-related acute lung injury. *American Journal of Clinical Pathology* 1999; 112:216-221.

Eastlund T., McGrath P. C., Britten A., Propp R.: Fatal pulmonary transfusion reaction to plasma containing donor HLA antibody. *Vox Sanguinis* 1989; 57:63-66.

Felbo M., Jensen K. G.: Death in childbirth following transfusion of leukocyte-incompatible blood. *Acta Haematologica* 1962; 27:113-119.

Fleischmann J., Golde D. W., Weisbart R. H., Gasson J. C.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* 1986; 68:708-711.

Flury R., Reutter F.: Lethal anaphylactic shock during the transfusion of a thrombocyte concentrate. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 1966; 96:918-920.

Gebb S. A., Graham J. A., Hanger C. C., Godbey P. S., Capen R. L., Doerschuk C. M., Wagner W. W. Jr.: Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation. *Journal of Applied Physiology* 1995; 79:493-497.

Gerritsen M. E., Bloor C. M.: Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB Journal* 1993; 7:523-532.

Gosselin E. J., Wardwell K., Rigby W. F., Guyre P. M.: Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma and IL-3. *Journal of Immunology* 1993; 151:1482-1490.

Guthrie L. A., McPhail L. C., Henson P. M., Johnston R. B. Jr.: Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *Journal of Experimental Medicine* 1984; 160:1656-1671.

Holness L., Knippen M. A., Simmons L., Lachenbruch P. A.: Fatalities caused by TRALI. *Transfusion Medicine Reviews* 2004; 18:184-188

Ichinose Y., Hara N., Ohta M., Aso H., Chikama H., Kawasaki M., Kubota I., Shimizu T., Yagawa K.: Recombinant granulocyte colony-stimulating factor and lipopolysaccharide maintain the phenotype of and superoxide anion generation by neutrophils. *Infection and Immunity* 1990; 58:1647-1652.

Issekutz A. C., Rowter D., Springer T. A.: Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 65:117-126.

Kao G. S., Wood I. G., Dorfman D. M., Milford E. L., Benjamin R. J.: Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *Transfusion* 2003; 43:185-191.

Kawahito K., Kobayashi E., Ohmori M., Harada K., Kitoh Y., Fujimura A., Fuse K.: Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: increased aggregability and superoxide producing capacity. *Artificial Organs* 2000; 24:37-42.

Kernoff P. B., Durrant I. J., Rizza C. R., Wright F. W.: Severe allergic pulmonary oedema after plasma transfusion. *British Journal of Haematology* 1972; 23:777-781.

Khan S. Y., Kelher M. R., Heal J. M., Blumberg N., Boshkov L. K., Phipps R., Gettings K. F., McLaughlin N. J., Silliman C. C.: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2006; 108:2455-2462.

Klein C. L., Bittinger F., Skarke C. C., Wagner M., Köhler H., Walgenbach S., Kirkpatrick C. J.: Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 1995; 63:204-212.

Kleinman S., Caulfield T., Chan P., Davenport R., McFarland J., McPhedran S., Meade M., Morrison D., Pinset T., Robillard P., Slinger P.: Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 2004; 44:1774-1789.

Kopko P. M., Paglieroni T. G., Popovsky M. A., Muto K. N., MacKenzie M. R., Holland P. V.: TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion* 2003; 43:177-184.

Kopko P. M., Popovsky M. A., MacKenzie M. R., Paglieroni T. G., Muto K. N., Holland P. V.: HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 2001; 41:1244-1248.

Krause P. J., Maderazo E. G., Bannon P., Kosciol K., Malech H. M.: Neutrophil heterogeneity in patients with blunt trauma. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1988; 112:208-215.

Leach M., Vora A. J., Jones D. A., Lucas G.: Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid leukaemia: a case report and review of the literature. *Transfusion Medicine* 1998; 8:333-337.

Lee W. L., Downey G. P.: Neutrophil activation and acute lung injury. *Current Opinion in Critical Care* 2001; 7:1-7.

Leger R., Palm S., Wulf H., Vosberg A., Neppert J.: Transfusion-related acute lung injury with leukopenic reaction caused by fresh frozen plasma containing anti-NB1. *Anaesthesiology* 1999; 91:1529-1532.

Liles W. C., Ledbetter J. A., Waltersdorph A. W., Klebanoff S. J.: Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; 58:690-697.

Looney M. R., Su X., Van Ziffle J. A., Lowell C. A., Matthay M. A.: Neutrophils and their Fc gamma receptors are essential in a mouse model of transfusion-related acute lung injury. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116:1615-1623.

Loosli C. G., Baker R. F.: Acute experimental pneumococcal (type D) pneumonia in the mouse: the migration of leucocytes from the pulmonary capillaries into the alveolar spaces as revealed by the electron microscope. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 1962; 74:15-28.

Maslanka K., Michur H., Zupanska B., Uhrynowska M., Nowak J.: Leucocyte antibodies in blood donors and a look back on recipients of their blood components. *Vox Sanguinis* 2007; 92:247-249.

Monien S., Salama A., Schönemann C.: ELISA methods detect HLA antibodies with variable sensitivity. *International Journal of Immunogenetics* 2006; 33:163-166.

Nordhagen R., Conradi M., Drömtorp S. M.: Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b. *Vox Sanguinis* 1986; 51:102-107.

Palfi M., Berg S., Ernerudh J., Berlin G.: A randomized controlled trial of transfusion-related acute lung injury: is plasma from multiparous blood donors dangerous? *Transfusion* 2001; 41:317-322.

Popovsky M. A., Moore S. B.: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 1985; 25:573-577.

Popovsky M. A., Abel M. D., Moore S. B.; Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *The American Review of Respiratory Disease* 1983; 128:185-189.

Remmele W.: Pathologie: Neuropathologie, Skelettmuskulatur, Sinnesorgane. 6. Band. Springer-Verlag 1995.

Reutershan J., Ley K.: Bench-to-bedsite review: acute respiratory distress syndrome – how neutrophils migrate into the lung. *Critical Care* 2004; 4:453-461.

Ruder H., Opelz G., Lenhard V., Schäfer A., Daniel V.: A rapid screening technique for lymphocytotoxic antibodies using tray-frozen lymphocytes. *Cryobiology* 1984; 21:480-485.

Sachs U. J., Bein G.: Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) – Diagnose, Therapie und Prävention. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 2007; 42:774-782.

Sachs U. J., Chavakis T., Fung L., Lohrenz A., Bux J., Reil A., Ruf A., Santoso S.: Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. *Blood* 2004; 104:727-734.

Sachs U. J., Hattar K., Weissmann N., Bohle R. M., Weiss T., Sibelius U., Bux J.: Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 2006; 107:1217-1219.

Sachs U. J., Kauschat D., Bein G.: White blood cell-reactive antibodies are undetectable in solvent/detergent plasma. *Transfusion* 2005; 45:1628-1631.

Santamaria A., Moya F., Martinez C., Martino R., Martinez-Perez J., Muniz-Diaz E.: Transfusion-related acute lung injury associated with an NA1-specific antigranulocyte antibody. *Haematologica* 1998; 83:951-952.

Santoso S., Kiefel V., Richter I. G., Sachs U. J., Rahman A., Carl B., Kroll H.: A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the beta(3) integrin: the Oe(a) alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99:1205-1214.

Scholz D., Devaux B., Hirche A., Pötzsch B., Kropp B., Schaper W., Schaper J.: Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell and Tissue Research* 1996; 284:415-423.

Seeger W., Schneider U., Kreuzler B., von Witzleben E., Walmrath D., Grimminger F., Neppert J.: Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood* 1990; 76:1438-1444.

Silliman C. C.: The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Critical Care Medicine* 2006; 34:124-131.

Silliman C. C., Ambruso D. R., Bushkov L. K.: Transfusion-related acute lung injury. *Blood* 2005; 105:2266-2273.

Silliman C.C., Bjornsen A. J., Wyman T. H., Kelher M., Allard J., Bieber S., Voelkel N. F.: Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model. *Transfusion* 2003; 43:633-640.

Silliman C. C., Bushkov L. K., Mehdizadehkashi Z., Elzi D. J., Dickey W. O., Podlosky L., Clarke G., Ambruso D. R.: Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood* 2003; 101:454-462.

Silliman C. C., Curtis B. R., Kopko P. M., Khan S. Y., Kelher M. R., Schuller R. M., Sannoh B., Ambruso D. R.: Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event *in vitro* model. *Blood* 2007; 109:1752-1755.

Silliman C. C., Paterson A. J., Dickey W. O., Stroneck D. F., Popovsky M. A., Caldwell S. A., Ambruso D. R.: The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion* 1997; 37:719-726.

Silliman C. C., Voelkel N. F., Allard J. D., Elzi D. J., Tuder R. M., Johnson J. L., Ambruso D. R.: Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101:1458-1467.

Skacel P. O., Stacey T. E., Tidmarsh C. E., Contreras M.: Maternal alloimmunization to HLA, platelet and granulocyte-specific antigens during pregnancy: its influence on cord blood granulocyte and platelet counts. *British Journal of Haematology* 1989; 71:119-123.

Spertini O., Luscinskas F. W., Kansas G. S., Munro J. M., Griffin J. D., Gimbrone M. A. Jr., Tedder T. F.: Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *Journal of Immunology* 1991; 147:2565-2573.

Stainsby D., Jones H., Asher D., Atterbury C., Boncinelli A., Brant L., Chapman C. E., Davison K., Gerrard R., Gray A., Knowles S., Love E. M., Milkins C., McClelland D. B., Norfolk D. R., Soldan K., Taylor C., Reville J., Williamson L. M., Cohen H.; SHOT Steering Group. Serious Hazards of Transfusion (SHOT), Annual Report 2007. Verfügbar unter: [http://www.shotuk.org](http://www.shotuk.org;); Letzter Zugriff 4. Mai 2010

Stroneck D. F., Shankar R. A., Noren P.A., Herr G. P., Clement L. T.: Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. *Transfusion*. 1996; 36:168-174.

Sudgen B.: Epstein-Barr virus: a human pathogen inducing lymphoproliferation *in vivo* and *in vitro*. *Reviews of Infectious Diseases* 1982; 4:1048-1061.

Tennenberg S. D., Fey D. E., Lieser M. J.: Oxidative priming of neutrophils by interferon-gamma. *Journal of Leukocyte Biology* 1993; 53:301-308.

Thiele D. L., Lipsky P. E.: Leu-Leu-OMe sensitivity of human activated killer cells: delineation of a distinct class of cytotoxic T lymphocytes capable of lysing tumor targets. *Journal of Immunology* 1986; 137:1399-406.

Varis I., Deneys V., Mazzon A., De Bruyere M., Cornu G., Brichard B.: Expression of HLA-DR, CAM and co-stimulatory molecules on cord blood monocytes. *European Journal of Haematology* 2001; 66:107-114.

Vercellotti G. M., Yin H. Q., Gustafson K. S., Nelson R. D., Jacob H. S.: Platelet-activating factor primes neutrophil responses to agonists: role in promoting neutrophil-mediated endothelial damage. *Blood* 1988; 71:1100-1107.

Verheugt F. W., von dem Borne A., E., Decary F., Engelfriet C.P.: The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *British Journal of Haematology* 1978; 38:151.

Waddell T. K., Fialkow L., Chan C. K., Kishimoto T. K., Downey G. P.: Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:18485-18491.

Wallis J. P.: Transfusion-related acute lung injury (TRALI) – under-diagnosed and under-reported. *British Journal of Anaesthesia* 2003; 90:573-576.

Williams M. A., Solomkin J. S.: Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 65:725-736.

Wolf C. F., Canale V. C.: Fatal pulmonary hypersensitivity reaction to HLA incompatible blood transfusion: report of a case and review of the literature. *Transfusion* 1976; 16:135-140.

Worthen G. S., Schwab B. 3rd, Elson E. L., Downey G. P.: Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries. *Sciences* 1989; 245:183-186.

Yomtovian R., Kline W., Press C., Clay M., Engman H., Hammerschmidt D., McCullough J.: Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody. *Lancet* 1984; 1:244-246.

Zachary A. A., Delaney N. L., Lucas D. P., Leffell M. S.: Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: I. Evaluation of the GTI QuikID assay and analysis of antibody patterns. *Human Immunology* 2001; 62:228-235.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung (deutsch)

Die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI) stellt heute in Großbritannien und den USA (Zahlen für Deutschland werden nicht regelmäßig veröffentlicht) den häufigsten Transfusionszwischenfall mit Todesfolge dar. Dass HLA- und HNA-Antikörper die bedeutendsten transfundierten TRALI-auslösenden Faktoren sind, wurde bereits mehrfach beschrieben (Popovsky und Moore, 1985; Yomtovian et al., 1984; Nordhagen et al., 1986; Eastlund et al., 1989; Bux et al., 1996; Santamaria et al., 1998; Leger et al., 1999; Kopko et al., 2001; Davoren et al., 2003). Die Mehrzahl aller TRALI-Fälle konnte in diesen Studien auf die Anwesenheit dieser Antikörper in der transfundierten Blutkomponente zurückgeführt werden. HLA- und HNA-Antikörper sind im Plasma mehrfach schwangerer Blutspenderinnen nachzuweisen, da sich Frauen zu etwa 30 % während ihrer Schwangerschaft gegen väterliche Antigene des Fötus immunisieren (Clay et al., 1984; Bux und Sachs, 2007). Es wurde publiziert, dass die Wahrscheinlichkeit, leukozytenreaktive Antikörper im Blut von Frauen nachzuweisen, mit der Anzahl ihrer bisherigen Schwangerschaften steigt: bei einer Schwangerschaft um 7,6 %, bei zwei um 14,6 % und bei drei oder mehr Schwangerschaften um 26,3 % (Densmore et al., 1999). Diese Daten zeigen, dass das Plasma von mehrfach schwangeren Frauen das höchste TRALI-Risiko darstellt.

Um das Risiko einer TRALI zu reduzieren, wurden verschiedene Maßnahmen vorgeschlagen und umgesetzt, wie beispielsweise in Großbritannien der Ausschluss von Frauen aus der Plasmaspende. In dieser Arbeit wurde die Effizienz eines Screenings von Frauen ab der dritten Schwangerschaft in einer prospektiven Studie untersucht.

In den vier Jahren der Studie wurden in 40 % der gescreenten Seren leukozytenreaktive Antikörper nachgewiesen. Häufig enthielten die Seren Antikörper gegen Antigene des HLA-Systems (40 % der in mindestens einem Test positiv getesteten Seren). Von den drei registrierten TRALI-Fällen innerhalb dieses Zeitabschnittes hätte einer durch das vorgeschlagene, um den ELISA erweiterte Screening, vermieden werden können. Eine Strategie, die sich ausschließlich auf den Nachweis von HLA-Antikörpern beschränkt, ist

nicht sinnvoll, da in einem relevanten Anteil (29 %) keine HLA-Antikörper nachgewiesen werden konnten, granulozytenreaktive Antikörper jedoch enthalten waren.

Zusammenfassend muss der Schluss gezogen werden, dass das Screening von mehrfach schwangeren Spenderinnen keine sinnvoll Strategie zur Vorbeugung einer TRALI ist. Die Methode an sich ist kostenintensiv und der Nachweis unspezifischer HNA-Antikörper, deren Relevanz für eine TRALI noch ungeklärt ist, ist sehr häufig. Außerdem wurde der Nachweis erbracht, dass Antikörper, deren TRALI-auslösende Eigenschaft bekannt ist, bereits nach der ersten Schwangerschaft im Plasma von Spenderinnen in für eine TRALI-Reaktion ausreichend hoher Konzentration nachgewiesen werden können. Folglich muss eine Strategie verfolgt werden, welche ausschließlich plasmahaltige Blutkomponenten von Frauen, die noch nicht schwanger waren, und/oder plasmahaltige Blutkomponenten von Männern zur Transfusion einsetzt.

Sollte jedoch durch diese Strategie die Anzahl plasmahaltiger Blutkomponenten unter einen kritischen Wert fallen und die ausreichende Versorgung der Kliniken mit Frischplasma und Thrombozytenkonzentraten nicht gewährleistet sein, so müssten eventuell weiterhin plasmahaltige Blutkomponente von Frauen mit Schwangerschaftsanamnese eingesetzt werden und das Screening von mehrfach schwangeren Spenderinnen als Strategie zur Vorbeugung einer TRALI verfolgt werden. Würde dieser Fall eintreten, so sollte zum Nachweis spezifische HLA-Antikörper eine Referenzmethode zum ELISA zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurde der MAILA etabliert und konkurrenzfähig gemacht.

Hierbei mussten das Problem der Konstanz der Antigendichte auf den in den Test eingesetzten B-lymphoblastoiden Zellen sowie das Problem des Hintergrundsignals und der unzureichenden Dissoziation der Antigen-Antikörper-Komplexe behoben werden.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen bei konstanter Antigendichte und verbesserter Dissoziation ein optimales Verhältnis von Hintergrund- zu Signalreduktion bei folgender Kombination:

- Es werden nun stets EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zellen verwendet, die drei Tage vor dem Einsetzen in den MAILA in Kultur genommen werden.
- Zu dem MAINA-Waschpuffer wird kein Albumin zugegeben.

- Die Konzentration des eingebrachten Antigen-Antikörper-Komplexes beträgt 30  $\mu$ l Lyseüberstand, verdünnt mit 220  $\mu$ l MAINA-Waschpuffer.
- Der Standardlysepuffer wurde durch den NET- Lysepuffer ersetzt.  
LP4 (NET-Puffer): 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l Natriumchlorid, 5 mmol/l EDTA, 1 % Triton X-100, 100 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; gelöst in Aqua dest.; pH = 7,4.
- Die Paraformaldehydfixierung des Standard-MAILA-Protokolls wurde durch Natriumazidfixierung ersetzt.

Bei der Etablierung des MAILA konnte durch Modifizierung des Standard-MAILA-Protokolls sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität drastisch verbessert und in einen signifikanten Bereich angehoben werden. Somit ist der MAILA nun bezogen auf die Sensitivität und die Spezifität konkurrenzfähig gegenüber dem ELISA.

## 6.2 Summary (englisch)

Currently, TRALI (transfusion-related acute lung injury) represents in the United Kingdom and the United States the most frequent side-effect in transfusion with fatal consequences (numbers for Germany are not regularly published). Other scientific research groups already described that HLA- and HNA-antibodies are the most important transfused factors which trigger TRALI (Popovsky und Moore, 1985; Yomtovian et al., 1984; Nordhagen et al., 1986; Eastlund et al., 1989; Bux et al., 1996; Santamaria et al., 1998; Leger et al., 1999; Kopko et al., 2001; Davoren et al., 2003). In this studies, the majority of all TRALI cases could be traced back to the presence of these antibodies in the blood transfusion. HLA- and HNA-antibodies may be detected in the plasma of multiparous female blood donors because approximately 30 per cent of women are immunized against paternal leukocyte antigens of the fetus during pregnancy (Clay et al., 1984; Bux und Sachs, 2007). It has been reported that the incidence of leukocyte reactive antibodies increases parallel to the number of their previous pregnancies: during the first pregnancy this risk augments to 7.6 %, during the second pregnancy to 14.6 % and from the third pregnancy on, the probability rises to 26.3 % (Densmore et al., 1999). These data indicate that plasma from multiparous women is at highest risk for inducing TRALI.

To reduce the risk of TRALI, different measures were suggested and subsequently realized, for example the exclusion of women from plasma donation in the UK. In a prospective study, this paper tries to analyse the efficiency of a screening of multiparous women from the third pregnancy on.

During the four years of this study, in 40 % of the screened sera leukocyte antibodies were detected. Usually the sera contained antibodies of the HLA-system (40 % of the sera which were tested positively in at least one of the screening-tests). During the time sequence of this study, one of the three registered TRALI cases could be avoided by the use of the suggested screening strategy, which is expanded by the enzyme immunoassay (EIA). It is not useful to persecute a strategy which is exclusively limited to the evidence of HLA-antibodies, because in 29 % of the sera, HLA-antibodies could not be detected; but the sera contained granulocyte antibodies.

Taking everything into consideration, one can draw the conclusion that the screening of multiparous blood-donors is not a useful strategy to prevent transfusion-related acute lung injury. First of all, the method is cost-intensive and besides that, the detection of unspecific HNA-antibodies, whose relevance for TRALI is presently unsolved, is very frequently. Furthermore, it was verified that antibodies, which trigger TRALI, are already available in the plasma of blood-donors after the first pregnancy, namely in high enough concentration. Consequently, it is essential to pursue a strategy which uses blood from female donors without a history of pregnancy, and/or blood from male donors for transfusion.

If an adequate supply with fresh frozen plasma and platelets in hospitals is not guaranteed because of this strategy, it will be necessary to continue with the application of blood components of multiparous women. Therefore, the introduction of the screening of women who already had born children would be sensible. If this occurs, a reference method to the detection of specific HLA-antibodies to the enzyme immunoassay will have to be available; that is why the Monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigen assay (MAILA) was established.

In this case, the following problems must be eliminated: the quantity of the antigens on the B-lymphoblastoid cells, the background signal, and the dissociation of antigen-antibody-complexes.

All in all, the experiments showed the best proportion between background- and signal reduction, by the use of the following combination (with constant quantity of antigens as well as improved dissociation):

- EBV-transformed B-lymphoblastoid cells, which are cultured three days before their use, are constantly used.
- One does not add albumine into the MAINA-buffer.
- The concentration of the antigen-antibody-complex amounts to 30  $\mu$ l of the supernatant, which is diluted with 220  $\mu$ l MAINA-buffer.
- The standard-lysis-buffer was substituted by NET-lysis-buffer.

LP4 (NET-buffer): 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l sodium chloride, 5 mmol/l EDTA, 1 % Triton X-100, 100 mmol/l  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; dissolved in aqua dest; pH = 7,4.

- The paraformaldehydefixation of the standard-MAILA-protocol were substituted for sodiumacidfixation.

During the establishment of the MAILA, the specificity as well as the sensitivity could be improved drastically and raised to a significant level - as a result of the modification of the standard-MAILA-protocol. Therefore, the MAILA, concerning the specificity and sensitivity, is competitive towards EIA; but the method is more protracted and, hence, should be in practice evaluated as an addition in undetermined cases.

## 7 Danksagung

Danken möchte ich in erster Linie meinem Betreuer und Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Sachs, dessen vorbildliche wissenschaftliche Leitung und dessen Kompetenz Grundvoraussetzungen für das Gelingen dieser Arbeit waren. Durch seine menschlichen Qualitäten und seine Kollegialität war er mir eine große Stütze und erleichterte das Vorankommen meiner Arbeit.

Weiterhin gebührt ein großer Dank Herrn Professor Dr. med. G. Bein, der mir als Leiter des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen reges Interesse an dieser Arbeit entgegen brachte.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Christine Hofmann und Frau Ingrid Wallon für ihre kompetente Einarbeitung und freundliche Unterstützung, sowie ihre zielführenden Hilfestellungen zu jeder Zeit und in allen Bereichen – die Durchführung zahlreicher Versuche wäre ohne ihre Hilfe nur schwer möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen für die freundliche, kompetente Unterstützung, das rege Interesse an meiner Arbeit und die stets netten, aufbauenden Worte bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich mein Leben lang gefördert haben und auf deren Unterstützung und Hilfe ich immer vertrauen kann. Sie haben mir dadurch all dies ermöglicht.

## **8 Anhang**

### **8.1 Selbstständigkeitserklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

---

Eva-Maria Uta Link

Giessen, den 20.05.2010