

**Labor und Durchflusszytometrie**

Die Abkürzung IGLD steht für „Interdisziplinäre Gruppe für Labor und Durchflusszytometrie“, aber damit ist das Themenspektrum der IGLD-Jahrestagungen nur sehr unvollständig beschrieben. Der Name sollte bei der Gründung des Vereins im Jahr 1995 zwei Tätigkeitsfelder inhaltlich verbinden, die damals für junge, ambitionierte Laborärzte schwer vereinbar schienen. „Labor“ stand für tägliche Routine, „Durchflusszytometrie“ für (eher nächtliche) Forschung. Da lag es auf der Hand, ein Symposium ins Leben zu rufen, das Wissenschaft und Praxis verband und obendrein – quasi im Rahmen kollegialer Nachbarschaftshilfe – kostenlos war.

Die Arbeit der IGLD ist nicht politisch, sondern an Inhalten orientiert. Hierarchien spielen für den Verein keine Rolle, alle Aktiven arbeiten ehrenamtlich. Die Tagungsprogramme sind facettenreich und thematisch grenzüberschreitend. Auch wenn die Durchflusszytometrie inzwischen Einzug ins Routinelabor gehalten hat (S. 92), ist das Konzept erhalten geblieben, Theorie und Praxis zu verbinden. Der Themenkatalog hat sich allerdings mit insgesamt zehn Schwerpunkten erheblich ausgeweitet.

**Themen des Programms 2009**

Der Autor des nebenstehenden Beitrags Priv.-Doz. Dr. Michael Spannagl, Leiter des Labors für Immungenetik und Molekulare Diagnostik am Klinikum Großhadern, war Organisator der Tagung mit den nachfolgenden Sessions. Jeweils einer von fünf bis sechs Vorträgen ist in Klammern als Beispiel aufgeführt. Die fett gedruckten Punkte werden hier im Detail vorgestellt.

1. Hämostaseologie (Gentherapie der Hämophilie)
2. Stammzellbiologie (Der Mensch ist so alt wie seine Stammzellen)
3. **Immungenetik und Transplantation** (Hochauflösende HLA-Genotypisierung)
4. Sterilproduktion in der Zelltherapie (Herstellung von Stammzellprodukten)
5. Analyse biomedizinischer Daten (Signalübertragung in Netzwerken)
6. POCT (RiLiBäk/Akkreditierung)
7. Neue Versorgungsstrukturen (ambulant-stationäre Verknüpfung)
8. Hämatologie/Onkologie (Genexpressions- und SNP-Arrays)
9. Transfusionsmedizin (Stammzelletherapie solider Tumoren)
10. **Workshops** (Grundlagen der Durchflusszytometrie)

Über die Themenblöcke 4 und 5 sind Beiträge in den nächsten beiden Trillium-Ausgaben vorgesehen. Informationen zum Verein unter [www.igld.de](http://www.igld.de).

gh



**Immungenetik und Transplantationsmedizin**

# Die virtuelle Kreuzprobe

**Nach einer molekulargenetischen Erfolgphase erleben Serologie und Kreuzprobe eine Renaissance im HLA-Labor. Die Methoden haben sich allerdings erheblich verfeinert.**

Die Transplantationsmedizin gehört zu den größten und seit Prof. Christiaan Barnard (1967) wohl auch spektakulärsten Errungenschaften der Hochleistungsmedizin. Der entscheidende Durchbruch erfolgte vor kaum mehr als 50 Jahren: 1958 entdeckte der Arzt und Nobelpreisträger Jean Dausset das HLA-System (*human leucocyte antigen*) und fand damit die Erklärung für die bis dato tödlich verlaufenen Versuche, Organe von einem Spender auf einen Empfänger zu übertragen.

Die Erkennung körperfremder Zellen ist ein komplizierter Vorgang, bei dem die enorme individuelle Variabilität der HLA-Klassen I und II eine Schlüsselrolle spielt. Vereinfacht gesagt prüft der Körper des Empfängers die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) durch einen Vergleich der fremden und eigenen HLA-Muster. Gegen fremde Muster wird häufig eine spezifische Immunantwort ausgelöst, die bei wiederholtem Kontakt (z.B. einer erneuten Transplantation) eine zytotoxische Reaktion auslöst und die fremden Zellen zerstört. Abhilfe schafft letztlich zwar nur die Immunsuppression, aber ein möglichst perfektes HLA-Matching ist nach wie vor eine gute Voraussetzung für den Erfolg.

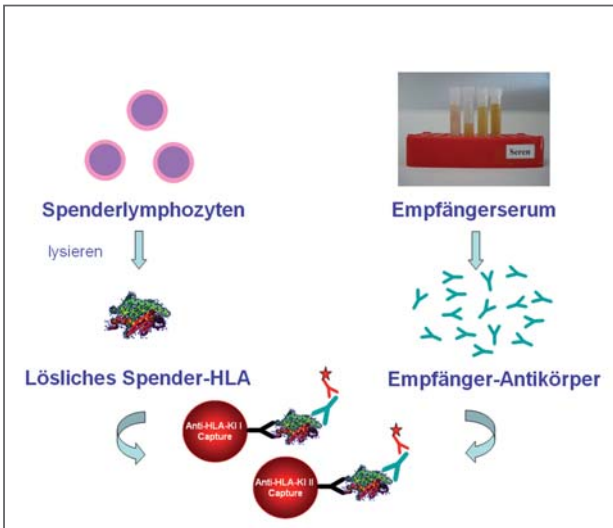
Im Hintergrund jeder Klinik mit Transplantationszentrum müssen deshalb aufwändige Labortechniken vorgehalten werden, um die Vorbereitung von Spender und Empfänger, die richtige Zuordnung der Organe und die angemessene Behandlung von etwaigen Abstoßungsreaktionen zu gewährleisten.

**HLA-Diagnostik im Wandel der Zeit**

Ursprünglich wurde das HLA-System mit serologischen Techniken proteinchemisch charakterisiert. Dabei nutzte man Antisera, die durch natürliche Immunisierung, z.B. gegen den Embryo in der Schwangerschaft, entstanden waren. Mit diesen einfachen Verfahren ließ sich jedoch die Heterogenität der Proteinstrukturen auf den Zelloberflächen nicht ausreichend auflösen.

Eine neue Welt eröffnete sich mit der DNA-Sequenzierung, die den genetischen Hintergrund der HLA-Proteinstrukturen aufzuklären erlaubte. Zuverlässige Techniken lassen inzwischen eine Differenzierung von Tausenden individueller HLA-Varianten zu, wie Dr. Hirv von IMG Laboratories (Labor Dr. Klein, Dr. Rost) zeigte. Entscheidend sei allerdings eine fachgerechte Befundung, insbesondere Aufbereitung der genetischen Codes und Begriffe, damit der Laborbericht auch im klinischen Alltag verstanden werde.

Wegen der ausgeprägten Mikroheterogenität des HLA-Systems auf DNA-Ebene gewinnt heute die Betrachtung des pro-



Testprinzip der „virtuellen Kreuzprobe“: Spenderzellen werden über Ficollgradienten gereinigt, lysiert und mit Mikrobeads inkubiert. Nach Zugabe von Empfängerserum reagieren etwaige HLA-Antikörper mit dem löslichen Spender-HLA. Der Komplex wird mit markiertem Konjugat (Anti-IgG-PE) zum Leuchten gebracht und im Luminexgerät, einer Art Durchflusszytometer, gemessen.

teinchemischen Phänotyps wieder an Bedeutung. Auch die klassische Kreuzprobe erlebt eine Renaissance, nicht zuletzt durch das vermehrte Auftreten von Antikörpern gegen Oberflächenantigene in potenziellen Empfängern. Solche präformierten Antikörper entstehen natürlicherweise bei der Schwangerschaft, aber zunehmend auch aufgrund vorangegangener Transfusionen oder Transplantationen.

Dass außer HLA auch andere Oberflächenproteine der Zelle eine wichtige Rolle in der Transplantationsimmunologie spie-

len, zeigte Frau Dr. Kauke aus München am Beispiel des MICA-Systems (*MCC class I-related chain A*). Dabei handelt es sich um eine polymorphe Klasse von Antigenen auf Spenderseite, die die Bildung pathologischer Allo-Antikörper des Empfängers anregen und zur Abstoßung von Transplantaten führen können.

Kreuzproben werden unmittelbar vor einer Transplantation zum Ausschluss von Antikörpern des Empfängers gegen HLA-Antigene des Spenders durchgeführt. Die Referenzmethode ist der komplement-abhängige Lymphozytotoxizitätstest (CDC), der den im Körper ablaufenden Erkennungs- und Abstoßungsprozess physiologisch möglichst

exakt nachbildet. In den letzten Jahren haben sich aber auch immunchemische Festphasenassays (z.B. ELISA) im Antikörperscreening fest etabliert. Sie sind weniger aufwändig und gut automatisierbar.

Aktuell wird die standardisierte Kopplung von HLA-Proteinen auf Mikrobeads zum Nachweis präformierter löslicher Antikörper im so genannten „Luminex-Crossmatch“ intensiv wissenschaftlich untersucht. Laut Dr. Schaub aus

der Nephrologie in Basel kann man mit dem aus der Durchflusszytometrie abgeleiteten Luminex-Verfahren eine robuste serologische HLA-Diagnostik aufbauen, die dem CDC ebenbürtig ist.

Die Luminex-Technologie ermöglicht es, die Antikörperspezifität für exakt definierte HLA-Moleküle durch die Wahl der gekoppelten Antikörper festzulegen. Vergleicht man nun die HLA-Typisierung des Spenders mit den vorher spezifizierten HLA-Antikörpern des Empfängers, so kann damit ein „virtueller“ Crossmatch durchgeführt werden, d.h. die Verträglichkeit von Spender und potenziellem Empfänger kann nach Kenntnis der HLA-Typisierung des Spenders ohne Verwendung seiner Leukozyten mit dem Computer kalkuliert werden.

Erste Vergleichsstudien zwischen der CDC-Referenzmethode und dem neuen Verfahren ergaben eine hohe Übereinstimmung. Bei abweichenden Resultaten besaß der Luminextest vereinzelt sogar eine bessere Vorhersagekraft bezüglich des späteren Transplantationserfolgs. Ob eines Tages im klinischen Alltag die zytotoxische durch die virtuelle Kreuzprobe abgelöst werden kann, ist derzeit Gegenstand prospektiver Untersuchungen.



Priv.-Doz. Dr. med. Michael Spannagl  
Klinikum der Universität München  
Labor für Immungenetik  
Tel. 089/7095-4401  
mispannagl@t-online.de

[www.igld.de](http://www.igld.de)

Dr. J. Wessels,  
Univ. Göttingen

## IGLD-Workshop-Programm

Die Hörsäle und Seminarräume im Klinikum Großhadern der Universität München mit den angrenzenden Instituten der Grundlagen- und der angewandten Forschung boten ideale Voraussetzungen zur Durchführung von Workshops während des Symposiums. Unter der Überschrift „Neues aus Immunologie und zellulärer Therapie“ wurden auch diesmal zahlreiche Vortragsthemen mit praktischen Anleitungen unterfüttert. Da der Buchstabe D in der Abkürzung IGLD für Durchflusszytometrie steht, befassten sich fünf von insgesamt zehn Workshops mit dieser Technologie.

Praxiserfahrene Fachleute (im Bild Dr. Hans-Dieter Kleine, Seracell Rostock) gestatteten den Teilnehmern einen detaillierten Blick ins Innere der höchst komplexen Geräte. Von diesem vertieften Einblick profitieren auch die Trillium-Leser auf den nächsten beiden Seiten; dort werden vier aktuelle Durchflusszytometrie-Systeme vorgestellt.

Alle, die sich für die hochkarätigen und preisgünstigen Workshops der IGLD interessieren, sind schon heute herzlich zum nächsten Symposium nach Bad Soden-Allendorf bei Frankfurt eingeladen. Workshopthemen werden unter anderem die Messung von Stamm- und Progenitorzellen und Bestimmung des Immunstatus sein.



Infos unter [www.igld.de](http://www.igld.de), persönliche Anfragen an [johannes.wessels@med.uni-goettingen.de](mailto:johannes.wessels@med.uni-goettingen.de)