

Aus der
Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Objektivierung der Luminex-Technologie basierten
transplantationsimmunologischen HLA-Antikörperdiagnostik durch
Anwendung verschiedener Epitop- Predictions- Algorithmen bei
Patienten vor und nach Transplantation solider Organe**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Lisa Kleid

aus

Öhringen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Patrick Möhnle
Zweites Gutachten: Priv. Doz. Dr. Teresa Kauke
Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Jan-Michael Abicht

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2025

Eidesstaatliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Kleid, Lisa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Objektivierung der Luminex-Technologie basierten transplantationsimmunologischen HLA-Antikörperdiagnostik durch Anwendung verschiedener Epitop- Predictions- Algorithmen bei Patienten vor und nach Transplantation solider Organe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.11.2025

Ort, Datum

L. Kleid

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Erklärung der Übereinstimmung



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Kleid, Lisa

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Objektivierung der Luminex-Technologie basierten transplantationsimmunologischen HLA-Antikörperdiagnostik durch Anwendung verschiedener Epitop- Predictions-Algorithmen bei Patienten vor und nach Transplantation solider Organe

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 13.11.2025

Ort, Datum

L. Kleid

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Eidesstaatliche Versicherung | 1 |
| Erklärung der Übereinstimmung | 2 |
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 1. Publikationsliste | 5 |
| 2. Beitrag zu den Veröffentlichungen | 6 |
| 3. Einleitung..... | 7 |
| 3.1 Organspende in Deutschland | 7 |
| 3.2 Das HLA-System als transplantationsrelevantes Gewebemerkmale | 7 |
| 3.2.1 Gewebetypisierung des humanen Leukozyten Antigens..... | 8 |
| 3.2.2 HLA-Antikörper Detektion | 8 |
| 3.2.3 Histokompatibilitätsbeurteilung und nicht akzeptable Spenderantigene | 10 |
| 3.2.4 Epitop-Predictions Algorithmen..... | 10 |
| 3.3 Besonderheit bei der Lungentransplantation | 12 |
| 4. Zusammenfassung | 13 |
| 5. Abstract..... | 15 |
| 6. Publikation I..... | 17 |
| 7. Publikation II..... | 18 |
| 8. Literaturverzeichnis | 19 |
| Danksagung | 21 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|--------|---|--|
| CDC | = | complement-dependend cytotoxicity assay/ komplement-abhängige zytotoxische Kreuztestung |
| DNA | = | desoxyribonucleinic acid/ Desoxyribonukleinsäure |
| EFI | = | European Federation for Immunogenetics |
| HLA | = | humanes Leukozyten Antigen |
| IgG | = | Immunglobulin G |
| PIRCHE | = | predicted indirectly recognizable HLA epitopes |

1. Publikationsliste

ABSTRACTS & KONFERENZBEITRÄGE

Correlation of immunogenicity of HLA-class II Eplet Mismatches with the development of de novo donor-specific antibodies regarding patients after lung transplantation – L. Kleid, J. Walter, T. Kauke, A. Dick

Abstract & poster presentation - 35th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, Amsterdam

Eplet Analysis: A tool for risk assessment of de novo donor-specific hla-dq-antibodies in patients after lung transplantation – L. Kleid, J. Walter, T. Kauke, A. Dick

Abstract & oral presentation 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), Graz

The impact of preformed and de novo donor-specific HLA-antibodies on graft rejection in patients after liver transplantation – R. Kugyelka, L. Kleid, T. Lutz, G. Denk, M. Guba, T. Kauke, A. Dick

Abstract & poster – 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI), Halle

PUBLIKATIONEN

Predictive value of molecular matching tools for the development of donor specific HLA-antibodies in patients undergoing lung transplantation - Kleid L., Walter J., Vorstandlechner

M., et al. HLA Immune Response Genetics 2023 ;1-12. doi:10.1111/tan.15068

High-Risk HLA-DQ Mismatches Are Associated With Adverse Outcomes After Lung Transplantation. - Kleid L., Walter J, Moehnle P, Wichmann C, Kovács J, Humpe A, Schneider C,

Michel S, Kneidinger N, Irlbeck M, Fertmann J, Dick A and Kauke T (2024) *Transpl Int* 37:13010.

doi: 10.3389/ti.2024.13010

2. Beitrag zu den Veröffentlichungen

Die Autorin dieser Arbeit hat im Labor für Immungenetik und Molekulare Diagnostik am LMU-Klinikum erfolgreich die Epitop-basierten Analysen implementiert und spielte eine entscheidende Rolle bei der Formulierung der untersuchten Hypothesen. Darüber hinaus war sie verantwortlich für die Datenerhebung und -verarbeitung und sowie die Erstellung der grundlegenden deskriptiven Statistiken. Des Weiteren verfasste die Autorin die originären Manuskripte für die geplanten Veröffentlichungen und führte den gesamten Publikationsprozess der beigefügten Artikel in ihrer Funktion als Erstautorin.

3. Einleitung

3.1 Organspende in Deutschland

Die Organtransplantation stellt eine lebensrettende Maßnahme dar und hat in den letzten Jahrzehnten unter anderem durch verbesserte Immunsuppressive Therapiekonzepte sowie optimierte Operationstechniken erhebliche Fortschritte gemacht. Dennoch steht die medizinische Gemeinschaft weltweit vor einer wachsenden Herausforderung - dem steigenden Organmangel [1]. Der Mangel an Spenderorganen betrifft Menschen auf der ganzen Welt. Er resultiert aus verschiedenen Faktoren, wie der alternden Bevölkerung, der Zunahme von chronischen Erkrankungen, die zu Organschäden führen, und dem geringen Angebot an verfügbaren Spenderorganen. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde bereits im Jahr 1969 die Stiftung Eurotransplant gegründet (www.eurotransplant.org). Die Benelux-Länder, Slowenien, Kroatien, Ungarn, Österreich und Deutschland bilden heute in enger Zusammenarbeit den Eurotransplant-Verbund. Eurotransplant fungiert dabei als zentrale Vermittlungsstelle zwischen Spendern und Empfängern und ist für die geregelte Zuteilung von Organen (Allokation) basierend auf ethischen und medizinischen Gesichtspunkten zuständig [2]. Ziel der internationalen Zusammenarbeit dieser Länder ist nicht nur die Anzahl der verfügbaren Organe zu erhöhen, sondern auch gleichzeitig eine optimale Zuteilung der Organe anhand der Dringlichkeit sowie der Gewebemerkmale zu gewährleisten.

3.2 Das HLA-System als transplantationsrelevantes Gewebemerkmale

Ein entscheidender Aspekt bei der Organtransplantation ist die genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, insbesondere im Hinblick auf das Humane Leukozyten Antigen (HLA) System [3]. Dies spielt bei der passenden Spenderauswahl und damit für die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei der Organtransplantation eine entscheidende Rolle [4]. Aus diesem Grund sind bei der Aufnahme auf die Warteliste solider Organe und für die Listung bei Eurotransplant je nach Organ verschiedene transplantationsimmunologische Untersuchungen notwendig ([Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG](#)). Diese werden nach den Richtlinien der European Federation for Immunogenetics (EFI-Standards) durchgeführt. Zu Ihnen zählen die molekulargenetische Bestimmung der

Gewebemerkmale (HLA-Typisierung), sowie die Erhebung des HLA-Antikörperstatus und verschiedene Gewebeverträglichkeitstestungen (Histokompatibilitätstestungen).

3.2.1 Gewebetypisierung des humanen Leukozyten Antigens

Das HLA-System umfasst eine Gruppe von Genen, die im Rahmen der Immunerkennung für die Unterscheidung zwischen körpereigenem und körperfremdem Gewebe zuständig sind [5]. Obwohl es innerhalb des HLA-Systems viele homologe Abschnitte gibt, zeichnet es sich aufgrund hochpolymorpher Bereiche durch eine hohe Variabilität und Allelvielfalt aus. Die genetische Codierung des HLA-Systems befindet sich auf Chromosom 6, wobei die Genorte in die HLA-Klasse I Loci HLA-A, -B und -C- und die HLA-Klasse II Loci HLA-DR, -DQ und -DP-Locus unterteilt werden können [6]. Die Bezeichnung und Sequenzen aller bekannten HLA-Allele werden in der IMGT/HLA Datenbank geführt und ständig erweitert (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/index.htm>).

Die Informationen über die Gewebemerkmale sowohl von Organspender- als auch Empfänger werden heutzutage mittels molekulargenetischer HLA-Typisierung bestimmt [7]. Nach Extraktion der DNA aus einer Blutprobe werden mittels Polymerase-Kettenreaktion HLA-Spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert. Durch die Analyse der polymorphen Genabschnitte des HLA und Abgleich der erhaltenen Sequenzdaten kann eine genaue Bestimmung der HLA-Allele erfolgen.

3.2.2 HLA-Antikörper Detektion

Durch immunisierende Ereignisse wie Bluttransfusionen, Schwangerschaften oder durch Transplantationen kann es zur Bildung von Antikörpern gegen körperfremde HLA Merkmale kommen [8]. Aus diesem Grund wird der HLA-Antikörperstatus der Patienten sowohl vor als auch nach der Transplantation in regelmäßigen Abständen untersucht.

Die traditionelle zellbasierte Methode, welche in der Vergangenheit und zur Detektion komplementbindender HLA-Antikörpern verwendet wurde, ist die komplement-abhängige zytotoxische Kreuztestung (CDC) [9]. Dieser Test kann sowohl als Screening-Methode unter Verwendung eines Panels von Spenderzellen durchgeführt werden, dient aber auch als Kreuztest (Crossmatch) zur Beurteilung der Verträglichkeit zwischen Spender und Empfänger unmittelbar vor einer Transplantation. Dabei werden Spenderlymphozyten mit dem Serum des Empfängers inkubiert, wodurch donorspezifische HLA-Antikörper des Empfängers an die HLA-Moleküle auf den Spen-

derzellen binden können. Durch Zugabe von Kaninchenkomplement wird die Komplementkaskade durch den Antigen-Antikörperkomplex aktiviert und die mit Antikörpern markierten Zellen entsprechend lysiert. Da der CDC ein Vitalitätstest ist, ist dieser jedoch zeitkritisch und anfällig für verschiedenen Störfaktoren. Die Verabreichung therapeutischer Antikörper (z.B. Rituximab) kann dabei im Assay zu falsch positiven Ergebnissen führen. Ein Hauptproblem besteht außerdem darin, dass nur Antikörper bestimmt werden können, die Komplement-bindende Eigenschaften besitzen und hochtitrig sind. Da der CDC damit weniger spezifisch als aktuelle Methoden ist, wurde er weitestgehend durch die Standardmethode der heutigen Zeit, der Luminex-Technologie, ersetzt. Diese stellt derzeit die sensitivste Methode zum Nachweis von HLA-Antikörpern dar und wird primär zur Festlegung des HLA-Antikörperstatus bei Transplantationskandidaten verwendet [10, 11]. Bei dieser Durchfluss-Fluorometrischen Methode werden farbige Beads mit HL-Antigenen bestückt. Nach entsprechender Inkubation können die im Empfängerserum vorhandenen HLA-Antikörper spezifisch an das HL-Antigen auf der Oberfläche dieser Beads binden. Über einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten anti-human-IgG-Sekundärantikörper kann im zweiten Schritt eine stattgefundene Antigen-Antikörperbindung detektiert werden [12]. Mittels Luminex-Technologie ist sowohl ein Screening, bei dem verschiedene HL-Antigene gleichzeitig getestet werden als auch eine konkrete Spezifizierung der HLA-Antikörper möglich. Obwohl die Luminex-Technologie eine sehr leistungsstarke und hochspezifische Methode der Antikörper Detektion darstellt, erfordert sie eine genaue Validierung und Kontrolle, um ihre Empfindlichkeit und Spezifität sicherzustellen [11, 13]. So können durch diese hohe Empfindlichkeit bereits geringe Mengen an HLA-Antikörpern detektiert werden. Aufgrund von Kreuzreaktivitäten binden die Antikörper jedoch oftmals nicht nur an einzelne, sondern an eine Vielzahl an Beads, welche mit Antigenen mit strukturellen Ähnlichkeiten (shared Epitopes) beladen sind, was die Ergebnisinterpretation erschwert. Aufgrund der hohen HLA-Variabilität ist es zudem nicht möglich alle Antigene abzubilden. Antikörper gegen sehr seltene Antigene sind daher im Assay nicht messbar. Ebenfalls gibt es im Assay bekannte falschpositive Reaktionen, beispielsweise Reaktionen gegen denaturierte Antigene an der Oberfläche der Beads, die es von den tatsächlich positiven Reaktionen zu unterscheiden gilt [11, 14]. Eine korrekte Identifizierung und Interpretation der HLA-Antikörper Ergebnisse im Luminex-Assay ist daher nicht nur entscheidend für die erfolgreiche Auswahl eines kompatiblen Spenderorgans, sondern essenziell auch für Therapieentscheidungen nach Transplantation.

3.2.3 Histokompatibilitätsbeurteilung und nicht akzeptable Spenderantigene

Unter dem Begriff Histokompatibilität versteht man die Gewebeverträglichkeit von Spender und Empfänger. Vor einer Transplantation kann physisch oder virtuell eine sogenannte Kreuzprobe zwischen Spender und Empfänger durchgeführt werden [15, 16]. Bei der physischen Kreuzprobe wird der im Kapitel HLA-Antikörper Detektion beschriebene komplement-abhängige Zytotoxizitätstest (CDC) als serologische Verträglichkeitsprobe durchgeführt. Dabei wird überprüft, ob im Empfängerserum gegen die Spender HLA-Merkmale gerichtete zytotoxische HLA-Antikörper vorhanden sind [17]. Beim Vorliegen von zytotoxischen HLA-Antikörpern kann dabei eine Lyse der Spenderzelle detektiert werden. Da mit dieser Methode jedoch, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, nur hochtrigge und Komplement-bindende Antikörper detektiert werden können, wird seit Anfang 2023 mit dem Inkrafttreten der neuen Richtlinie zum Empfängerschutz der Bundesärztekammer im Allokationsprozess bei bestimmten Organen die physische Kreuzprobe um die virtuelle Kreuzprobe ergänzt. Die virtuelle Kreuzprobe wird auf Basis der HLA-Typisierung des Organspenders und des HLA-Antikörperstatus festgelegten nicht akzeptablen HL-Antigenen durchgeführt [18]. Die nicht-akzeptablen HL-Antigene werden in der Regel im Rahmen der Warteliste mittels Luminex-Technologie festgelegten HLA-Antikörperstatus für jeden Empfänger individuell bestimmt. Das Organ eines Spenders mit einem Nicht-akzeptablen Spendermerkmal wird dem Patienten nicht angeboten. Die Detektion und korrekte Interpretation der mittels Luminex-Technologie bestimmten HLA-Antikörper gewinnt damit nochmals an Bedeutung, da die Bestimmung der unakzeptablen HLA-Merkmale auf dieser Methode beruht.

3.2.4 Epitop-Predictions Algorithmen

Klassischerweise wird die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger anhand der Anzahl der Übereinstimmungen von Spender- und Empfänger HLA-Merkmalen bewertet (Antigen-Ebene). Eine Nicht-Übereinstimmung wird dabei als Mismatch bezeichnet. Aufgrund der hohen Variabilität des HLA-Systems ist jedoch oft nur eine begrenzte Übereinstimmung möglich und es kommt bei der Transplantation solider Organe zwangsläufig zu einem oder mehreren Mismatches. Gegen diese Mismatches kann sich der Patient potenziell immunisieren. Durch die Zunahme des Auflösungsgrades der HLA-Typisierung und dreidimensionalen Modellen, können heutzutage die immunogenen Teilstrukturen der HLA-Merkmale genauer charakterisiert werden

(Epitop-Ebene). Epitop-Predictions-Algorithmen basieren auf diesen Informationen und erlauben eine detailliertere Analyse der HLA Mismatche.

Die Immunantwort gegen fremde HLA Merkmale umfasst sowohl die B-Zell- als auch T-Zell vermittelte Reaktionen und kann grundlegend in die direkte, indirekte und semidirekte Fremderkennung eingeteilt werden [19]. Während sich der HLAMatchmaker Algorithmus auf direkte Fremderkennung und Eplet Unterschiede bezieht, berechnet der PIRCHE Score das Ausmaß der indirekt präsentierten Peptidunterschiede und berechnet aufgrund diesen das Potential eines Mismatches, das Risiko einer Alloimmunisierung vorherzusagen.

HLAMatchmaker

Die Struktureinheiten eines Antigens welche vom Paratop eines Antikörpers oder direkt durch den B-Zell Rezeptoren erkannt werden können, werden als strukturelle Epitope bezeichnet [22]. Innerhalb eines strukturellen Epitops, welches aus 15-20 Aminosäuren besteht, gibt es sogenannte funktionelle Epitope oder Eplets. Es handelt es sich dabei meist um 2-3 Aminosäurekombinationen in einem 3.0-3.5 Ångstrom Radius, welche für die Bindungsstärke und Spezifität eines Antikörpers verantwortlich sind [23, 24]. Beim Epitop-Matching mittels HLAMatchmaker werden die Eplet-Unterschiede der Spender- und Empfängerallele auf molekularer Ebene quantifiziert und charakterisiert. Hierbei werden nur Eplets als potenziell immunogen betrachtet, die nicht von den HLA-Molekülen des Empfängers selbst exprimiert werden. Die Immunogenität der einzelnen Epitopunterschiede und ihre Auswirkung ist jedoch aktuell noch Gegenstand der Forschung.

PIRCHE (predicted indirectly recognizable HLA epitopes)

Bei Exposition von fremden HL-Antigenen werden diese Antigene von B-Zellen internalisiert und zu Peptiden verdaut, welche anschließend mithilfe eigener HLA-Klasse II Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese präsentierten Peptide wiederum können durch CD4+ T-Zellen erkannt werden, was in einer Aktivierung von B-Zellen und IgG Produktion resultiert [19, 20]. Diese donorspezifischen IgG HLA Antikörper können an HLA-spezifische Strukturen der allogenen HLA Moleküle binden und zu einer Abstoßungsreaktion führen [21].

Implementierung von Epitop Predictions Algorithmen in die Routinediagnostik

Die Implementierung von Epitop-Prediction-Algorithmen in der transplantationsimmunologischen Routinediagnostik kann dazu beitragen, die Unterschiede in den Gewebemerkmale zwischen Spender und Empfänger präziser zu quantifizieren und im Fall des HLA Matchmaker besser zu charakterisieren. Dies könnte die Interpretation der Messungen in der Luminex-basierten Analytik in Verbindung mit Immunisierungsprozessen verbessern und die Festlegung von nicht akzeptablen Spendermerkmalen erleichtern. Das Ziel besteht darin, Risiko-Spender-Kombinationen zu identifizieren, das Risiko einer Alloimmunisierung vorherzusagen und Abstoßungsreaktionen nach der Transplantation zu reduzieren.

3.3 Besonderheit bei der Lungentransplantation

Bei Lungentransplantationen wird im Gegensatz zu anderen Organtransplantationen in der Regel kein HLA-Matching durchgeführt. Der Hauptgrund dafür liegt in der widersprüchlichen Datenlage bezüglich des Einflusses von HLA-Kompatibilität auf den Transplantationserfolg bei Lungeneempfängern. Die bisher noch unklare Rolle des HLA-Matchings und die vergleichsweise ungünstigen klinischen Outcomes machen die Gruppe der Lungentransplantationspatienten zu einer besonders interessanten Kohorte für wissenschaftliche Untersuchungen.

Daher wurde in dieser Arbeit gezielt die Lungentransplantationskohorte ausgewählt, um mögliche Einflussfaktoren auf den Transplantationserfolg genauer zu analysieren und ein besseres Verständnis für die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen zu gewinnen.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen der soliden Organtransplantation bietet die Anwendung von Epitop-basierten Algorithmen eine moderne Methode zur Verbesserung des Verständnisses der transplantationsimmunologischen Diagnostik. Diese Algorithmen können im Bereich der Luminex-basierten HLA-Antikörper Analytik dazu beitragen, die Präzision und Genauigkeit der HLA-Antikörperdetektion zu steigern. Sie helfen bei der Plausibilitätsprüfung der Luminex-Spezifitäten und tragen dazu bei, das Verständnis der Immunreaktion gegenüber fremden HLA-Merkmalen zu vertiefen. Darüber hinaus ermöglichen sie eine detaillierte Analyse der erwarteten Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Dies kann Transplantationsärzten und immungenetischen Laboren bei der Identifizierung nicht-akzeptabler HLA-Merkmale unterstützen und eine entscheidende Rolle bei der Verbesserung der Transplantatverträglichkeit und des Transplantatüberlebens spielen.

Anhand einer Kohorte von 183 lungentransplantierten Patienten wurde der Immunisierungsprozess gegen fremde HLA-Gewebemerkmale auf molekulargenetischer Ebene mithilfe von Epitop-Predictions Algorithmen analysiert. Dabei wurden besonders immunogene Strukturunterschiede charakterisiert und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit den tatsächlichen Immunisierungsdaten in der Luminex-basierten Analyse verglichen, und die klinische Relevanz der detektierten HLA-Donorspezifitäten wurde untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem donorspezifische HLA-Antikörper der Klasse II, insbesondere gegen den HLA-DQ Locus, mittels Luminex-Analyse in der Patientenkohorte nachgewiesen werden konnte. Als molekulare Matching-Algorithmen wurden der HLAMatchmaker und der PIR-CHE-II Score für die Berechnung indirekter Epitopunterschiede verwendet. Die Untersuchungen legen nahe, dass beide Algorithmen unter bestimmten Bedingungen geeignete Werkzeuge sein können, um das Risiko der Immunisierung insbesondere gegen HLA-Klasse II Spenderantigene abzuschätzen. Die Festlegung eines Cut-offs und die Kombination beider Methoden erwiesen sich als am besten geeignet. (Publikation I)

Weiterführende Analysen identifizierten spezifische funktionelle Epitope (Eplets) und Risikoantigen Kombinationen, welche mit einem erhöhten Risiko der Immunisierung und der Entwicklung von HLA-Antikörpern einhergingen. Auch die Homozygotie im HLA-DQ Locus konnte als Risiko-

faktor herausgearbeitet werden. Die Zuordnung der gemessenen Spezifitäten zu den entsprechenden funktionellen Epitopen diente zur Plausibilitätsprüfung und ermöglichte die Nachverfolgung des Immunisierungsprozesses. Eine Gegenüberstellung der HLA-Antikörperdaten mit dem klinischen Verlauf der Patienten bestätigte die Bedeutung der mittels Luminex-Technologie erkannten Spezifitäten. Die Bildung von donorspezifischen HLA-DQ Antikörpern konnte mit der Entstehung einer akuten zellulären Abstoßung, einer Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion sowie der Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion nach Lungentransplantation in Verbindung gebracht werden. (Publikation II)

Zusammenfassend bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Plausibilität und klinische Relevanz der gemessenen Spezifitäten in der Luminex-basierten HLA-Antikörperanalytik. Sie zeigen zudem das Potenzial auf, Epitop-basierte Analysen zur Entwicklung individueller Transplantationsstrategien für Patienten vor und nach der Transplantation zu nutzen. Dies könnte die Anpassung immunsuppressiver Therapien entsprechend dem Risikoprofil ermöglichen und gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit von Abstoßungsreaktionen verringern, was letztendlich die Langzeitüberlebensrate des Transplantats verbessern könnte.

5. Abstract

In the context of solid organ transplantation, the application of epitope-based algorithms represents a modern approach to enhance the understanding of transplant immunologic diagnostics. These algorithms support Luminex-based analytics in increasing the precision and accuracy of HLA antibody detection. They serve as tools for validating Luminex specificities and contribute to a deeper understanding of the immune response to foreign HL-antigens. Furthermore, they enable a detailed analysis of histocompatibility between donors and recipients. This can assist transplant physicians and immunogenetics laboratories in identifying unacceptable antigens and may significantly impact transplant compatibility and graft survival.

The aim of this work was to objectify transplant immunological HLA antibody diagnostics based on Luminex technology by implementing epitope prediction analysis in patients before and after solid organ transplantation.

In an analysis of 183 lung transplant patients, the immunization process against foreign HLA was analysed at the molecular genetic level. Epitope prediction algorithms were used to characterize and evaluate particularly immunogenic foreign components. These findings were compared to actual immunization data from Luminex, and the clinical relevance of donor specificities was evaluated. The results revealed that predominantly donor-specific HLA class II antibodies, especially against the HLA-DQ locus, were detected in the patient cohort by Luminex analysis. The HLA-Matchmaker and PIRCHE-II Algorithm were employed as molecular matching algorithms. The investigations suggest that both algorithms can be suitable tools for assessing the risk of immunization against HLA-class II donor antigens under specific conditions. Establishing a cut-off and combining both methods proved to be the most suitable approach. (Publication I)

Subsequent analyses identified specific eplets and patient-recipient combinations associated with an increased risk of immunization and the development of de novo donorspecific HLA-DQ antibodies. Additionally, being homozygous for HLA-DQ was revealed as a risk factor for developing HLA-antibodies. Matching the measured specificities to the corresponding functional epitopes served as a plausibility check and facilitated tracking of the immunization process. A comparison of HLA antibody data with the clinical outcomes of the patients confirmed the significance of the specificities identified through Luminex-based technology. The formation of donor-specific HLA

antibodies was linked to the occurrence of acute cellular rejection, antibody-mediated rejection and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. (Publication II)

In summary, the results of this study reaffirm the plausibility and clinical relevance of the measured specificities in the Luminex-Assay. They also highlight the potential to use epitope-based analyses in collaboration with clinicians and laboratories to develop individual therapeutic strategies for patients before and after transplantation. This could enable the adjustment of immunosuppressive therapies based on the risk profile while simultaneously reducing the likelihood of rejection reactions, aiming to improve long-term graft outcomes.

6. Publikation I

Predictive value of molecular matching tools for the development of donor specific HLA-antibodies in patients undergoing lung transplantation

Kleid L, Walter J, Vorstandlechner M, Schneider CP, Michel S, Kneidinger N, Irlbeck M, Wichmann C, Möhnle P, Humpe A *et al*: **Predictive value of molecular matching tools for the development of donor specific HLA-antibodies in patients undergoing lung transplantation.** *Hla* 2023.

7. Publikation II

High-Risk HLA-DQ Mismatches Are Associated With Adverse Outcomes After Lung Transplantation

Kleid L, Walter J, Moehnle P, Wichmann C, Kovács J, Humpe A, Schneider C, Michel S, Kneidinger N, Irlbeck M, Fertmann J, Dick A and Kauke T **High-Risk HLA-DQ Mismatches Are Associated With Adverse Outcomes After Lung Transplantation.** *Transpl Int* 2024 37:13010.
doi: 10.3389/ti.2024.1301

8. Literaturverzeichnis

1. Abouna, G.M., *Organ shortage crisis: problems and possible solutions*. Transplant Proc, 2008. **40**(1): p. 34-8.
2. Persijn, G.G., *Allocation of organs, particularly kidneys, within Eurotransplant*. Hum Immunol, 2006. **67**(6): p. 419-23.
3. Ayala García, M.A., et al., *The major histocompatibility complex in transplantation*. J Transplant, 2012. **2012**: p. 842141.
4. Opelz, G., et al., *HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study*. Rev Immunogenet, 1999. **1**(3): p. 334-42.
5. Choo, S.Y., *The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications*. Yonsei Med J, 2007. **48**(1): p. 11-23.
6. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(12): p. 889-899.
7. Edgerly, C.H. and E.T. Weimer, *The Past, Present, and Future of HLA Typing in Transplantation*. Methods Mol Biol, 2018. **1802**: p. 1-10.
8. Fuggle, S.V. and S. Martin, *Tools for Human Leukocyte Antigen Antibody Detection and Their Application to Transplanting Sensitized Patients*. Transplantation, 2008. **86**(3): p. 384-390.
9. Saito, P.K., et al., *Complement-dependent cytotoxicity (CDC) to detect Anti-HLA antibodies: old but gold*. J Clin Lab Anal, 2014. **28**(4): p. 275-80.
10. Schlaf, G., B. Pollok-Kopp, and W.W. Altermann, *Sensitive solid-phase detection of donor-specific antibodies as an aid highly relevant to improving allograft outcomes*. Mol Diagn Ther, 2014. **18**(2): p. 185-201.
11. Tait, B.D., et al., *Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation*. Transplantation, 2013. **95**(1): p. 19-47.
12. TAIT, B.D., et al., *Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation*. Nephrology, 2009. **14**(2): p. 247-254.
13. Tait, B.D., *Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 570.
14. Dean, C.L., et al., *Identification of a recurrent pattern of false-positivity by Luminex HLA MHC class I single antigen bead testing*. Hum Immunol, 2020. **81**(2-3): p. 73-78.
15. Gebel, H.M. and L.K. Lebeck, *Crossmatch procedures used in organ transplantation*. Clin Lab Med, 1991. **11**(3): p. 603-20.
16. Rocha, Y., et al., *Crossmatch assays in transplantation: Physical or virtual?: A review*. Medicine (Baltimore), 2023. **102**(50): p. e36527.
17. Peña, J.R., D. Fitzpatrick, and S.L. Saidman, *Complement-dependent cytotoxicity crossmatch*. Methods Mol Biol, 2013. **1034**: p. 257-83.
18. Amico, P., et al., *Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(6): p. 656-61.
19. Geneugelijk, K., K.A. Thus, and E. Spierings, *Predicting alloreactivity in transplantation*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 159479.
20. Steele, D.J., et al., *Two levels of help for B cell alloantibody production*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 699-703.
21. Duquesnoy, R.J., *The antibody response to an HLA mismatch: a model for nonself-self discrimination in relation to HLA epitope immunogenicity*. Int J Immunogenet, 2012. **39**(1): p. 1-9.
22. El-Awar, N., V. Jucaud, and A. Nguyen, *HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined*. J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 3406230.

23. Duquesnoy, R.J. and M. Marrari, *HLAMatchmaker-based definition of structural human leukocyte antigen epitopes detected by alloantibodies*. Curr Opin Organ Transplant, 2009. **14**(4): p. 403-9.
24. Duquesnoy, R.J., *A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level*. Hum Immunol, 2006. **67**(11): p. 847-62.

Danksagung

Ich stehe am Ende einer langen und anspruchsvollen Reise, die mich zur Erlangung meines Dokortitels geführt hat. Es ist schwer in Worte zu fassen, wie dankbar ich für all die Unterstützung und Ermutigung bin, die ich auf diesem Weg erfahren durfte. Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerinnen Dr. Andrea Dick und PD Dr. Teresa Kauke. Ihre Fachkenntnisse und Ihre unermüdliche Unterstützung waren für den Erfolg dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung. Auch danke ich Prof. Dr. Patrick Möhnle und allen weiteren Mitgliedern meiner Betreuungskommission für die Ideen, das wertvolle Feedback und die vielen Stunden des wissenschaftlichen Austauschs. Für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit an der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zelltherapeutika und Hämostaseologie durchführen zu können, möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Andreas Humpe bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls dem gesamten Team des Labors für Immungenetik, das mich so herzlich in ihre Reihen aufgenommen hat. Ihr habt es geschafft, dass das zwischenmenschliche Miteinander nie zu kurz kam, und meine Zeit bei euch wird mir immer eine schöne Erinnerung bleiben.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Dr. Julia Walter bedanken.

Was als berufliche Zusammenarbeit begann, hat sich zu einer wunderbaren Freundschaft entwickelt. Deine Expertise und dein Engagement haben einen maßgeblichen Beitrag zur Weiterentwicklung dieses Projekts geleistet. Ich schätze mich glücklich, dich nicht nur als Kollegin, sondern auch als Freundin an meiner Seite zu haben.

Mein Dank gilt auch meinen engsten Freunden. Eure aufmunternden Worte und euer Beistand haben mir stets geholfen durchzuhalten, auch wenn die Herausforderungen manchmal überwältigend schienen.

Zu guter Letzt, möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie bedanken. Ihr habt mich auf all meinen Wegen stets begleitet und unterstützt. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen.

L. Kleid
Februar 2025