

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen  
Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Erhard Seifried

**Bedeutung der Single Antigen Luminex Technologie für den Nachweis  
HLA-spezifischer Antikörper in der Nierentransplantation**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Anna-Alicia Lydia Niedermayer

aus Neumarkt i.d.OPf.

Frankfurt am Main, 2016

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Christian Seidl
Korreferent/in:	Prof. Dr. Helmut Geiger
Tag der mündlichen Prüfung:	20.09.2017

## Inhalt

Abbildungs- und Graphikverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Nierentransplantation.....	1
1.2 HLA-System.....	2
1.2.1 Aufbau und Funktion.....	2
1.2.2 HLA-spezifische Antikörper .....	5
1.3 Detektion HLA-spezifischer Antikörper .....	8
1.3.1 Lymphozytotoxizitätstest .....	8
1.3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay .....	10
1.3.3 Luminex .....	10
1.4 Transplantatabstoßung .....	11
1.5 Immunsuppression und Therapie der Transplantatabstoßung .....	14
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	16
2. Materialien und Methoden.....	18
2.1 Verwendete Materialien .....	18
2.1.1 Reagenzien und Geräte .....	18
2.1.2 Klinische Daten der Patienten und Patientenseren.....	18
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Erhebung der klinischen Daten .....	19
2.2.2 Analyse der Patientenseren .....	20
2.2.3 Luminex Immunoassay.....	21
2.2.3.1 Technischer Hintergrund.....	21
2.2.3.2 Durchführung des LABScreen Single Antigen .....	22

2.2.3.3	Verdünnungsevaluation .....	23
2.2.3.4	Auswertung und Software .....	23
2.2.4	Statistische Analyse .....	25
3.	Ergebnisse .....	26
3.1	Verdünnungsversuche .....	26
3.1.1	Differenz und Verhältnis der Verdünnungsreihen .....	26
3.1.2	Sensitivität und Spezifität der Verdünnungsversuche .....	32
3.2	Patienten- und Transplantateigenschaften .....	34
3.3	Patienten- und Transplantateigenschaften in Abhängigkeit vom Antikörperstatus im Luminex .....	36
3.4	Transplantatüberleben .....	38
3.4.1	Transplantatüberleben in Abhängigkeit der im Luminex nachgewiesenen Antikörper .....	38
3.4.2	Transplantatüberleben in Abhängigkeit von donorspezifischen Antikörpern im Luminex .....	41
3.4.3	„Death censored graft survival“ in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Luminex .....	43
3.4.4	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Vergleich LCT, ELISA und Luminex .....	45
3.4.4.1	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im LCT .....	45
3.4.4.2	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im LCT im Vergleich zu Luminex .....	46
3.4.4.3	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im ELISA .....	48
3.4.4.4	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im ELISA im Vergleich zu Luminex .....	50
3.5	Verlaufparameter in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Luminex ....	53

3.5.1	Proteinurie.....	53
3.5.2	Verlauf des Serumparameters Kreatinin.....	57
4.	Diskussion.....	59
4.1	Verdünnung.....	59
4.2	Antikörperstatus im LCT, ELISA und Luminex .....	61
4.3	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Immunstatus im Luminex.....	62
4.4	Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Immunstatus im Vergleich Luminex mit LCT und ELISA .....	66
4.5	Verlaufparameter der Nierenfunktion in Abhängigkeit vom Immunstatus im Luminex .....	68
4.6	MFI-Grenzwert .....	69
5.	Zusammenfassung.....	71
6.	Summary.....	73
7.	Literaturverzeichnis.....	75
8.	Eigene Veröffentlichungen.....	92
9.	Lebenslauf .....	94
10.	Danksagung .....	95
11.	Schriftliche Erklärung .....	96

## Abbildungs- und Graphikverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der HLA-Gene auf Chromosom 6. [Autism – A Neurodevelopmental Journey from Genes to Behaviour, V. Eapen, 2011].....	3
Abbildung 2: Aufbau der HLA-Klasse I und II. [J. Klein et A. Sako, The New England Journal of Medicine, 2000].....	4
Abbildung 3: Screenshot aus dem Programm HLA Fusion 2 bei der Auswertung von HLA-Klasse I Antikörpern einer Probe mit dem Programm HLA Fusion.....	24
Graphik 1: Streuung der Mittelwerte (Mittelwert der fünf Patientenseren der drei Versuchstage) der prozentualen Verhältnisse der einzelnen Verdünnungsstufen. ....	30
Graphik 2: Mittelwert der Verhältnisse (Mittelwert der fünf Patientenseren der drei Versuchstage) der Beads der HLA-Klasse I der Verdünnungsstufe 1 zu 4 unterteilt in elf nMFI-Kategorien abhängig von unverdünnter Kontrolle.....	31
Graphik 3: Mittelwert der Verhältnisse (Mittelwert der fünf Patientenseren der drei Versuchstage) der Beads der HLA-Klasse II der Verdünnungsstufe 1 zu 4 unterteilt in elf nMFI-Kategorien abhängig von unverdünnter Kontrolle.....	32
Graphik 4: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus (HLA-Klassen I und II kombiniert) mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.....	39
Graphik 5: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	40
Graphik 6: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten der nicht im Luminex immunisierten Patienten abhängig vom MFI-Grenzwert. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.	41
Graphik 7: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom Vorhandensein donorspezifischer Antikörper im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000. Signifikanz des Unterschiedes bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.....	42

Graphik 8: „Death censored graft survival“ in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	44
Graphik 9: „Death censored graft survival“ in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	45
Graphik 10: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im LCT gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5%. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.....	46
Graphik 11: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im LCT gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	47
Graphik 12: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im LCT gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 (LCT negativ und Luminex positiv kombiniert). Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	48
Graphik 13: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im ELISA gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5%. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.....	49
Graphik 14: Vergleich des Transplantatüberlebens in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im ELISA gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	51
Graphik 15: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im ELISA gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 (ELISA negativ und Luminex positiv	

kombiniert). Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test. ....	52
Graphik 16: Vorhandensein von Antikörpern in Prozent gemessen im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 bei negativem Immunstatus im ELISA (PRA-Wert unter 5%) in Abhängigkeit vom Transplantatverlust. Signifikanz des Unterschiedes bezüglich des Verlustes oder keines Verlustes des Transplantats berechnet mit Fisher's Exact Test.....	53
Graphik 17: Proteinurie in Grad abhängig vom Immunstatus gemessen im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test. ....	54
Graphik 18: Proteinurie in Grad abhängig vom Immunstatus gemessen im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test. ....	55
Graphik 19: Renale Proteinausscheidung in g/d gemessen im 24-Stunden-Sammelurin abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test. ....	56
Graphik 20: Renale Proteinausscheidung in g/d gemessen im 24-Stunden-Sammelurin abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test. ....	57
Graphik 21: Serum-Kreatinin in mg/dl abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Serum-Kreatinins berechnet mit ungepaartem T-Test. ....	58
Graphik 22: Serum-Kreatinin in mg/dl abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Serum-Kreatinins berechnet mit ungepaartem T-Test. ....	58



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verhältnisse der einzelnen Verdünnungsstufen unterteilt in HLA-Klasse I und HLA-Klasse II sowie deren Zusammenfassung. Signifikanzen berechnet mit dem ungepaarten T-Test. ....	28
Tabelle 2: Interassay-Varianz der Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verhältnisse der unverdünnten Testdurchführungen unterteilt in HLA-Klasse I und II sowie deren Zusammenfassung. ....	29
Tabelle 3: Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Verdünnungsstufen unterteilt in HLA-Klasse I und II sowie deren Zusammenfassung. ....	34
Tabelle 4: Allgemeine Charakteristika der Transplantatempfänger und -spender sowie des Transplantates. ....	35
Tabelle 5: Charakteristika der Transplantatempfänger und -spender sowie des Transplantates abhängig vom Antikörperstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Immunstatus berechnet mit Mann-Whitney-U-Test bzw. Chi <sup>2</sup> -Test. ....	37
Tabelle 6: Vorhandensein donorspezifischer Antikörper im Luminex mit vier unterschiedlichen MFI-Grenzwerten in Abhängigkeit von einem Transplantatverlust. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich Verlust oder kein Verlust des Transplantats berechnet mit Chi <sup>2</sup> -Test. ....	43
Tabelle 7: Immunstatus (absolut und prozentual) unterteilt in HLA-Klasse I und HLA-Klasse II getestet im ELISA mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und getestet im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000.....	50

## Abkürzungsverzeichnis

HLA	Human Leukocyte Antigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
PCR	Polymerasekettenreaktion
SSP	Sequenzspezifische Primer
SSO	Sequenzspezifische Oligonukleotide
Ig	Immunglobulin
MICA	Major histocompatibility complex Class-I-chain related gene
LCT	Lymphozytotoxizitätstest
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PRA	Panel Reactive Antibody
IL	Interleukin
ALG	Antilymphozytäres Globulin
ATG	Antithymozytäres Globulin
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphate buffered saline
MFI	Mean fluorescence intensity
Aqua dest.	Aqua destillata
NBG	Normalized background ratio
nMFI	Normalisierte mean fluorescence intensity
CMV	Zytomegalie-Virus
SD	Standardabweichung
PPW	Positiver prädiktiver Wert
NPW	Negativer prädiktiver Wert

## 1. Einleitung

### 1.1 Nierentransplantation

Pro Jahr erleiden ca. 2500 Menschen in Deutschland eine terminale Niereninsuffizienz. Die häufigsten Erkrankungen, die zu einem Funktionsverlust der Niere führen sind die diabetische Nephropathie (ca. 35%), primäre und sekundäre Glomerulonephritiden (ca. 15%), polyzystische Nierenerkrankungen (bis 10%), chronisch tubulo-interstitielle Erkrankungen und vaskuläre (hypertensive) Nephropathien. (1) Durch diesen Funktionsverlust der Niere müssen harnpflichtige Substanzen mithilfe einer Nierenersatztherapie ausgeschieden werden. Hierfür werden Dialyseverfahren wie die Hämo- und die Peritonealdialyse verwendet. Jedoch stellt, wie im Folgenden gezeigt wird, die Nierentransplantation die beste Therapie für eine terminale Niereninsuffizienz dar. (2)

Ein Vorteil der Nierentransplantation im Vergleich zur Dialysetherapie ist zum einen, dass die Nierentransplantation die kostengünstigste Variante ist. Dies ist bei immens steigenden Kosten in der Gesundheitsversorgung durchaus zu berücksichtigen. Im Jahr der Transplantation entsprechen die Operations-, Krankenhausaufenthalts- und Nachuntersuchungskosten ungefähr den jährlichen Kosten für Dialysepatienten. Jedoch liegen die auf Dauer entstehenden finanziellen Belastungen bei Nierentransplantierten schon ab dem zweiten Jahr nach der erfolgten Transplantation unter den Ausgaben von Dialysepatienten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Kosten bei einem nicht funktionierenden Transplantat die Dialysekosten übersteigen. (3)

Außerdem wird die Lebensqualität der Patienten hinsichtlich physischer, emotionaler und sozialer Aspekte stark verbessert. (3, 4)

Der entscheidendste Vorteil der Nierentransplantation im Vergleich zu Dialyseverfahren ist die niedrigere Mortalitätsrate. Bei einer amerikanischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Nierentransplantation die Mortalität um 68% in drei Jahren im Vergleich zu Patienten, die noch auf der Warteliste für ein Transplantat stehen, reduziert. (5) Obwohl die Mortalität in den ersten zwei Wochen nach einer Transplantation 2,8-mal höher ist als bei den Patienten auf der Warteliste und diese auch noch binnen der ersten 106 Tage nach der Transplantation übersteigt, wird dies in den darauffolgenden Jahren mehr als ausgeglichen. Auch in Europa konnte eine

Reduktion der Mortalität nachgewiesen werden. (6). Dieser Effekt beruht vor allem auf der Reduktion des kardiovaskulären Risikos (7) als auch auf dem Rückgang der urämischen Kardiomyopathie. (8)

In ganz Deutschland wurden im Jahr 2014 1384 Nierentransplantationen und 104 Nieren-Pankreas-Transplantationen durchgeführt. 7717 Patienten standen noch auf der Warteliste und haben kein Transplantat erhalten. (9) Diese Diskrepanz von zur Verfügung stehenden und benötigten Transplantaten führt zu einer Zunahme der Lebendnierenspende. Diese ist möglich zwischen Verwandten und sich emotional nahestehenden Personen. Der Vorteil von Lebendnierenspenden ist, dass diese ein längeres Transplantatüberleben im Vergleich zu den Leichenspenden besitzen. (10)

In der Universitätsklinik Frankfurt am Main wurden 2013 61 Nierentransplantationen und eine Nieren-Pankreas-Transplantation durchgeführt; davon waren 21 Lebendnierenspenden. (11)

## 1.2 HLA-System

### 1.2.1 Aufbau und Funktion

Erst das Entdecken des Systems der Human Leukocyte Antigen (HLA) 1967 hat Organ- und Knochenmarktransplantationen möglich gemacht (12), da dieses ein wichtiger Bestandteil der Immunregulation ist. (13)

Als das HLA-System wird die humane Version des Major Histocompatibility Complex (MHC) bezeichnet. (14) Der Name des HLA entstand dadurch, dass diese Antigene erstmals auf Leukozyten nachgewiesen werden konnten. (15)

# Chromosome 6

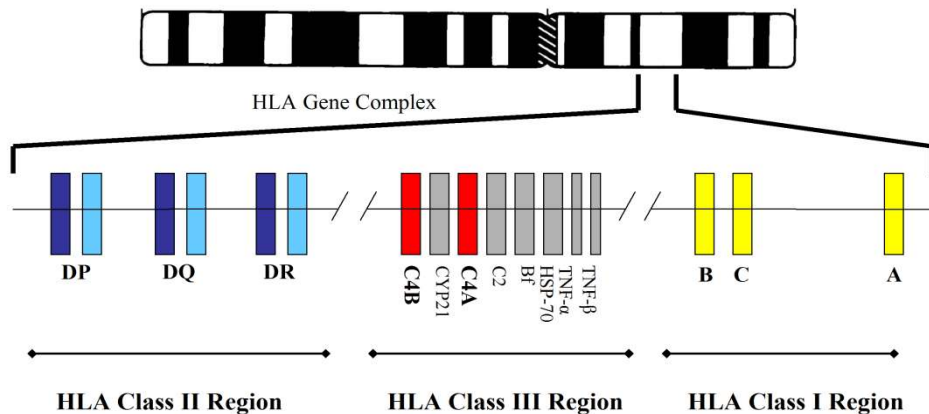


Abbildung 1: Struktur der HLA-Gene auf Chromosom 6. [Autism – A Neurodevelopmental Journey from Genes to Behaviour, V. Eapen, 2011]

Der Genkomplex, der für die HLA-Antigene kodiert, befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 in Zentromernähe (Abb. 1). (12) Dieser Genkomplex besteht aus drei Regionen: HLA I, das für die HLA-Antigene A, B und C kodiert, HLA II für die Antigene DR, DQ und DP sowie HLA III, das unter anderem für Komponenten des Komplementsystems wie Faktor B, C2 und C4, für Tumornekrosefaktoren und für die 21-Hydroxylase zuständig ist. (13), (16)

Die Nomenklatur des HLA-Systems erfolgt anhand des Beispiels von *HLA-DRB1\*02:01*: Die Buchstaben „DRB“ und die zusätzliche Zahl „1“ nach dem „HLA“ stehen für den Genort. Der Stern zeigt an, dass die HLA-Typisierung molekulargenetisch erfolgte. Nach dem Stern beschreiben die zwei Zahlen „02“ das Allel. Die nachfolgenden Zahlen „01“ stellen die Subgruppe des Allels dar. (16)

Klasse I HLA werden auf fast allen Zellen exprimiert, die einen Nukleus besitzen. Hingegen besitzen nur B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen Klasse II HLA. (15) Außerdem können sich HLA Klasse II-Antigene auch auf Endothelien und Epithelien befinden, was durch Entzündungen zusätzlich induziert wird. (17), (18)

HLA-Klasse I tragende Zellen präsentieren endogene Peptide, also Peptide, die in der Zelle synthetisiert werden, wie z.B. zelluläre Proteine oder durch Virus eingeschleuste Partikel. Dieser HLA-Klasse-I-Peptidkomplex wird von CD8-positiven T-Lymphozyten erkannt. (19) Exogene Peptide werden von HLA-Klasse II positiven Zellen durch

Endozytose aufgenommen, im endoplasmatischen Retikulum prozessiert und im Komplex mit HLA II auf der Zelloberfläche präsentiert. An diesen Komplex binden CD4-positive T-Lymphozyten. (20)

Durch das Binden von T-Lymphozyten an die HLA-Peptid-Komplexe wird bei körperfremden Peptiden die Immunabwehr aktiviert. Die zelluläre Immunantwort wird durch das Binden von CD8-positiven T-Lymphozyten an HLA-I-Peptid-Komplexen stimuliert, was die Lyse der Zielzelle zur Folge hat. Die humorale Immunantwort mit der Antikörperbildung durch B-Lymphozyten wird durch die CD4-positiven T-Lymphozyten bei den HLA-Klasse II Molekülen angeregt.

Der MHC I kodiert für eine schwere  $\alpha$ -Polypeptidkette mit fünf Domänen. Die ersten beiden Domänen bilden die Peptidbindestelle, mit der Antigene präsentiert werden. (21) Die  $\alpha 3$ -Domäne ähnelt den Immunglobulinen und bindet den CD8-Rezeptor von T-Lymphozyten. Die Domäne  $\alpha 4$  dient als transmembranäre Domäne der Verankerung in der Zellmembran und die  $\alpha 5$ -Domäne bildet das im Zytoplasma gelegene Ende. Die leichte  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Kette befindet sich bei der  $\alpha 3$ -Domäne und wird vom Chromosom 15 codiert. (22) HLA-Klasse II stellt ein Heterodimer aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette dar. Diese Ketten bestehen jeweils aus fünf Domänen, wobei die  $\alpha 1$ - und die  $\beta 1$ - Domäne die Peptidbindungsstelle bilden. (23) Für die Bindung an den CD4-T-

Zell-Rezeptor sind die Domänen  $\alpha 2$  und  $\beta 2$  zuständig. (22) Abbildung 2 stellt die Morphologie der HLA-Klasse I und II Antigene dar.

Der HLA-Typ jedes Menschen ergibt sich aus den HLA-Typen der Eltern, die als Haplotypen vererbt werden. Durch die Haplotypen der Eltern sind vier verschiedene Kombinationen für den HLA-Typ des Kindes möglich. Somit liegt die Wahrscheinlichkeit für Geschwister, den gleichen HLA-Typ zu tragen bei 25%. (15)

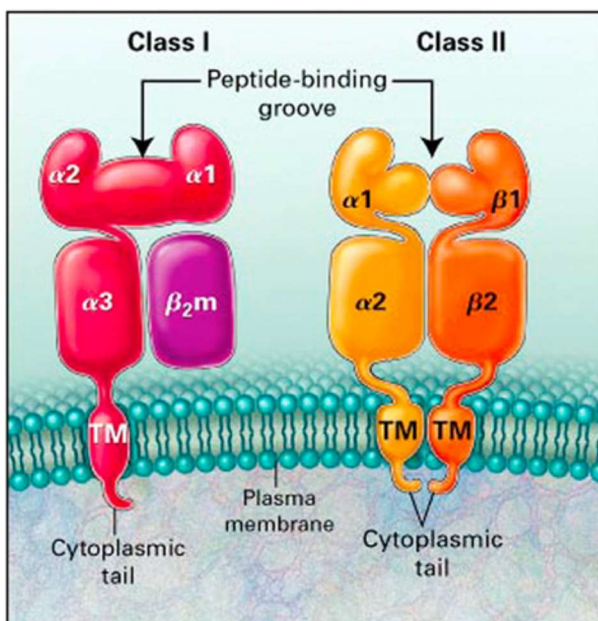


Abbildung 2: Aufbau der HLA-Klasse I und II. [J. Klein et A. Sako, The New England Journal of Medicine, 2000]

Das HLA-System weist einen sehr großen Polymorphismus auf, was dadurch zustande kommt, dass jedes Antigen mehrere Epitope trägt, die alle aus unterschiedlichen Aminosäuren bestehen. (24) Bis Oktober 2014 wurden 12242 unterschiedliche HLA-Klasse I und II Gen-Allele gefunden (25), was eine fast unendliche Anzahl von Allel-Kombinationen ermöglicht. Die Verteilung dieser stark polymorphen Antigene ist jedoch von ethnischen Gruppen abhängig. Die Ursache hierfür könnte unter anderem sein, dass unterschiedliche ethnische Gruppen auch unterschiedlichen Infektionen ausgesetzt sind und somit andere HLA-Merkmale ausprägen. (15)

Da es bekannt ist, dass HLA-identische Transplantationen eine geringere Abstoßungsrate und ein besseres Outcome besitzen als HLA-ungleiche, stellt der große Polymorphismus des HLA-Systems ein großes Problem bei der Allokation passender Transplantat-Organen zu den Empfängern dar. (22) Besonders wichtig für eine erfolgreiche Transplantation sind die HLA-Moleküle A, B und DR. (15) Die richtige HLA-Allokation ist besonders wichtig für den Langzeiterfolg einer Transplantation. (10)

Um den HLA-Typ des Empfängers und des Spenders zu identifizieren, werden entweder serologische oder DNA-basierte Verfahren wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Bei der serologischen Methode werden Antigen-Mismatches aufgedeckt, bei der genetischen Analyse hingegen Allel-Differenzen. (26) Da die PCR die zeitsparendere Methode darstellt, ist sie zum derzeitigen Standard der HLA-Typisierung geworden. (12) Die PCR erfolgt entweder mithilfe von sequenzspezifischen Primern (SSP) oder mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (SSO). (15)

### 1.2.2 HLA-spezifische Antikörper

Unter HLA-spezifischen Antikörpern versteht man Antikörper, die gegen körperfremde Antigene der HLA-Klasse I und/oder II gerichtet sind. Diese entstehen erst bei Exposition von körperfremdem HLA und werden von B-Lymphozyten im Rahmen der humoralen Immunantwort gebildet.

Zu einer solchen Exposition kann es bei Schwangerschaften (die Mutter bildet HLA-spezifische Antikörper gegen die HLA-Merkmale des Kindes), bei Bluttransfusionen und Organtransplantationen kommen. (27)

Jedoch zeigen einige Studien, dass auch junge, gesunde Männer HLA-spezifische Antikörper aufweisen. Diese könnten möglicherweise durch eine Kreuzreaktivität mit Mikroorganismen, Allergenen oder auch durch mit der Nahrung aufgenommene Proteine entstanden sein und werden als „natürliche Antikörper“ bezeichnet. Ob diese bei Transplantationen eine Rolle spielen, ist noch nicht bekannt. (28)

Antikörper – oder auch Immunglobuline (Ig) genannt –, die für die Immunabwehr zuständig sind, gehören zu einer sehr heterogenen Gruppe von Proteinen mit den fünf Hauptgruppen IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. (29) Der Aufbau aller Antikörper ist jedoch grundsätzlich sehr ähnlich. Es soll im Folgenden dennoch nur auf die Struktur des IgG eingegangen werden, da diese die Hauptrolle bei Organtransplantationen einnimmt. Die IgG besitzen eine Y-förmige Struktur bestehend aus je zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten. Die zwei schweren Ketten vom Typ  $\gamma$  sind mit zwei leichten Ketten vom Typ  $\lambda$  oder  $\kappa$  über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Antigenbindestelle wird von den variablen Regionen der oberen Enden des „Y“ gebildet. (30)

Bei Transplantationen werden die HLA-spezifischen Antikörper in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen gibt es die nicht-donorspezifischen Antikörper. Der Transplantatempfänger weist zwar HLA-spezifische Antikörper auf, jedoch sind diese nicht gegen die HLA-Merkmale des Spenders gerichtet. Zum anderen gibt es die donorspezifischen Antikörper, die gegen die HLA-Merkmale, die der Spender trägt, gerichtet sind.

Alle HLA-spezifischen Antikörper, egal ob donorspezifisch oder nicht-donorspezifisch, können das Outcome einer Transplantation beeinflussen. (31), (32), (33) Deshalb müssen diese vor einer Transplantation ermittelt werden und auch nach dem Erhalt des Organs regelmäßig überwacht werden. Dies geschieht mit den bisher etablierten Testverfahren Lymphozytotoxizitätstest (LCT) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Diese Tests werden in den folgenden Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 genauer erläutert. Um die Immunisierung mit HLA-spezifischen Antikörpern nach der Testung einordnen zu können, wird das Ergebnis mit einem semiquantitativen Wert, dem panel reactive antibody (PRA), wiedergegeben. Dieser gibt einen Prozentsatz an, der aus den mit dem Patientenserum reagierenden und nicht reagierenden Feldern in diesen Tests berechnet wird. (24)



Für die Allokation von Spendernieren, die in Europa von Eurotransplant vorgenommen wird, werden die HLA-Antikörperspezifitäten, die vor der Transplantation ermittelt werden, als inakzeptable HLA-Antigene beim Spender gewertet. Der Grund hierfür ist, dass diese Antikörper zu einer Transplantatabstoßung führen können. Diese kann bei komplementaktivierenden Antikörpern hyperakut oder akut ablaufen oder bei Antikörpern, die ausschließlich die zelluläre Immunantwort aktivieren, eine chronische Transplantatabstoßung unterstützen. Die seit Jahrzehnten vor Transplantationen durchgeführte Crossmatchuntersuchung weist komplementaktivierende Antikörper nach. Ein positives Crossmatch stellt somit eine Kontraindikation für Transplantationen dar, sodass hyperakute oder akut ablaufende Organabstoßungen in den letzten Jahrzehnten meist vermieden werden konnten. (22) Um somit unnötige Verzögerungen bis zur Transplantation und Versand der Spenderniere durch positive Crossmatches zu vermeiden, werden diese Empfänger schon im Vorhinein ausgeschlossen. Dies bedeutet jedoch, dass die Chance, eine Spenderniere zu erhalten, mit steigender Anzahl an inakzeptablen Antigenen sinkt. (34)

Bei einem PRA-Wert über 85% gilt der Patient als hyperimmunisiert und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Patient ein Spenderorgan bekommt, bei dem das Crossmatch negativ ausfällt, ist sehr gering. Diese Patienten müssen mit sehr langen Wartezeiten auf ein Organ rechnen und nicht wenige versterben, während sie sich noch auf der Warteliste befinden. Außerdem ist durch die lange Dialysezeit und wegen der hohen Immunisierung das Outcome nach einer Transplantation schlechter. Als Lösung wurde hier das sog. „Acceptable mismatch program“ eingeführt. Hier darf die Spenderniere nur HLA-Merkmale aufweisen, gegen die der Empfänger noch nie Antikörper gebildet hat. Außerdem werden die Patienten bei der Organvergabe bevorzugt behandelt. Durch dieses Programm werden die Wartezeiten verringert und das Outcome entspricht ungefähr der Gruppe nicht immunisierter Patienten. (35)

Falls durch dieses Programm immer noch kein passender Spender gefunden wurde, kann eine Desensibilisierung erfolgen. Diese wird mithilfe einer Plasmapherese, Immunadsorption und intravenösen Immunglobulinen durchgeführt. (36), (37) Hierdurch kann ein anfangs positives Crossmatch negativ werden. Jedoch wird dauerhaft eine verstärkte Immunsuppression nötig, was langfristig zu einer

erniedrigten Überlebensrate – vor allem aufgrund vermehrter Infektionen und Malignomen – führt. (35)

Neben HLA-spezifischen Antikörpern gibt es Antikörper gegen Nicht-HLA-Antigene. Nicht-HLA-Antigene, die eine Rolle in Nierentransplantationen spielen könnten, sind Antigene auf Endothel- und Epithelzellen. Hierunter fallen zum einen Anti-endotheliale-Zell-Antikörper, die zu einer Zellaktivierung, Apoptose und Gewebeschädigung der Endothelzellen führen können. Andere Nicht-HLA-Antikörper sind gegen Major histocompatibility complex Class-I-chain related gene (MICA), Vimentin und Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 gerichtet. (38) Da die Rolle dieser Nicht-HLA-Antikörper jedoch nur vermutet wird und es keine gängigen Detektions-Tests für diese gibt, sollen sie nicht Bestandteil dieser Arbeit sein. (39)

Bei ABO-inkompatiblen Nierentransplantationen stellen Nicht-HLA-Antikörper, die gegen die ABO-Blutgruppen-Antigene des Spenders gerichtet sind, ein hohes Risiko für eine Transplantatabstoßung dar. (39) Eine vermehrte Immunsuppression und Desensibilisierung vor der Transplantation haben jedoch ABO-inkompatible Spenden möglich gemacht. Deren Outcome ist mittlerweile vergleichbar mit dem Outcome bei ABO-kompatiblen Spenden. (40), (41)

### 1.3 Detektion HLA-spezifischer Antikörper

#### 1.3.1 Lymphozytotoxizitätstest

Der Lymphozytotoxizitätstest ist eine zellbasierte Methode, um Antikörper im Patientenserum nachweisen zu können. (24)

Bei dem LCT wird Patientenserum auf Felder gegeben, deren Zellen einen bestimmten HLA-Typ besitzen. Nach Zugabe von Kaninchenserum, das als Komplementquelle dient, werden zusätzlich Färbemittel wie Trypanblau oder Eosinrot in die Panels gegeben. (42) Bei Lyse der Zellen, färben sich diese an. Die Färbung dient als Maßstab für die Zytotoxizität der im Patientenserum vorhandenen Antikörper. (43)

Ein Vorteil dieses Tests ist, dass nur komplementaktivierende Antikörper detektiert werden (24), denen man eine ursächliche Rolle bei der hyperakuten und akuten Transplantatabstoßung zusagt. (44)

Jedoch weist dieser Test sowohl eine geringe Sensitivität als auch eine geringe Spezifität auf. Zwar gibt es Techniken, wie verlängerte Inkubationszeiten oder der

Zusatz von Anti-Human-Globulin, die sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität erhöhen; allerdings werden diese in den meisten Instituten nicht angewandt. (45) Der LCT erkennt neben HLA-spezifischen Antikörpern auch HLA-unspezifische Antikörper und Auto-Antikörper, deren Bedeutsamkeit bei Transplantationen nicht erwiesen ist. (46) Der Test detektiert außerdem neben IgG-Antikörpern auch IgM-Antikörper. Dies kann durch die Gabe von Dithiothreitol (DTT) verhindert werden, indem die IgM-Antikörper eliminiert werden. (39) Bei Gabe von immunsuppressiven Medikamenten, wie z.B. Rituximab, das selbst ein Antikörper ist, oder antithymozytärem Globulin, kann das Ergebnis des LCT beeinflusst werden. (43), (47) Dies muss beim Auswerten immer berücksichtigt werden.

Die LCT-Technik stellt die Grundlage für das Crossmatch vor jeder Transplantation dar. Hier werden Donor-Lymphozyten mit dem entsprechenden Patientenserum inkubiert. Ein positives Crossmatch stellt eine Kontraindikation wegen der Gefahr einer hyperakuten Abstoßung dar. (22) Dies konnte eine Studie von *Patel et al.* zeigen, bei der 80% der Patienten mit einem positivem Crossmatch einen Funktionsverlust des Transplantats innerhalb der ersten beiden Tage erfuhren. (48) Es gibt zwei Arten des LCT-Crossmatch. Mit dem T-Zell-Crossmatch, bei dem Spender-T-Lymphozyten mit dem Patientenserum inkubiert werden, werden HLA-I-Antikörper durch die Zelllyse nachgewiesen. Da auf B-Zellen sowohl HLA-Klasse I als auch -Klasse II Antigene vorhanden sind, werden beim B-Zell-Crossmatch beide Antikörpergruppen berücksichtigt. (49) Da sowohl die Auswertung als auch die technische Durchführung von B-Zell-LCTs schwieriger als die Durchführung des T-Zell-LCTs ist und HLA-Klasse II Antikörper für die hyperakute und akute Abstoßung nur eine untergeordnete Rolle spielen, wurden früher vor Transplantationen HLA-Klasse II Antikörper in den meisten Transplantationszentren nicht mittels LCT untersucht. (50) Dies hat sich jedoch in den letzten Jahren geändert, um auch diese Antikörper bei der Allokation der Spendernieren zu berücksichtigen, da sie eine chronische Organabstoßung auslösen können.

Bei dem Nachweis von Antikörpern, weist der LCT die größte Signifikanz hinsichtlich des Transplantatüberlebens im Vergleich zu den Methoden ELISA und Luminex auf. (31)

### 1.3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay macht sich die Festphasen-Methode zur Grundlage und detektiert komplementbindende und nicht-komplementbindende Antikörper. (50)

Je nachdem, ob der ELISA als Screening- oder Differenzierungstest fungiert, werden HLA-Gruppen oder einzelne HLA-Moleküle verwendet, die fest auf der Oberfläche von Plastikvertiefungen gebunden sind. (43) Diese HLA-Moleküle kommen aus einem Pool von Thrombozyten-Antigenen unterschiedlicher ethnischer Gruppen (51) oder aus rekombinant hergestellten HLA-Molekülen. (50) Das Test-Serum wird auf die Vertiefungen gegeben und eventuell vorhandene Antikörper binden an den Antigenen. Ein zweiter Enzym-gekoppelter Antikörper kommt hinzu. Dieser ist gegen humanes IgG gerichtet. Bei Zugabe eines passenden Substrates kommt es zu einem Farbumschlag, wenn im Patientenserum Antikörper vorhanden sind. (43)

Das Ergebnis des ELISA ist semiquantitativ. Es wird als optische Dichte im Vergleich zu einer Negativkontrolle ausgewertet und als ein PRA-Wert angegeben. (39)

Der ELISA besitzt eine höhere Sensitivität als der LCT. Außerdem wird er weniger durch immunsuppressive Therapien beeinflusst. (24)

Jedoch besteht die Möglichkeit, dass der Test aufgrund von versteckten HLA-Antigenepitopen, die nach Denaturierung des HLA-Moleküls auf der Moleküloberfläche erscheinen, falsch positiv ausfällt. Zusätzlich sind falsch negative Ergebnisse beschrieben, die durch Konfigurationsänderungen bei der Isolierung der HLA-Moleküle zustande kommen. (24)

Die klinische Relevanz von Antikörpern, die im ELISA detektiert werden, konnte durch eine erhöhte Abstoßungsrate und ein kürzeres Transplantatüberleben gezeigt werden. (52), (53)

### 1.3.3 Luminex

Ein neuer Test zur Antikörperdetektion stellt der Luminex dar. Dieser ist wie der ELISA auch eine Festphasen-Methode. Jedoch stellt die Grundlage dieses Tests fluoreszierende Mikrokügelchen (Beads) dar. In einem Testansatz sind verschiedene Beadpopulationen enthalten, die durch unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften voneinander unterschieden werden können. Da bei der Single Antigen Technik eine

Beadpopulation jeweils nur ein definiertes HLA-Antigen trägt, ist eine eindeutige Identifikation der Antikörperspezifität möglich. Die genaue Funktionsweise des Luminex wird unter Punkt 2.2.3.1 erläutert.

Dieser Test weist die höchste Sensitivität unter den obengenannten Tests auf. (54), (39) Die Spezifität des Luminex ist jedoch geringer als beim LCT, da der Luminex auch viele Antikörper nachweist, die nicht relevant für Transplantatabstoßungen und -überleben zu sein scheinen. (55)

Der Luminex wird überwiegend zum Nachweis von Immunglobulinen vom Typ IgG durchgeführt, die gegen HLA-Antigene gerichtet sind. (56) Aufgrund der hohen Spezifität des Tests ist er weniger beeinflussbar durch immunsuppressive Medikamente als der LCT. (47)

#### 1.4 Transplantatabstoßung

Trotz immer neuer und verbesserter Medikamente, die die Immunabwehr des Empfängers gegen das Transplantat verhindern sollen, stellen Transplantatabstoßungen noch immer ein großes Problem dar. Diese sind die Hauptursache für eine schlechte Transplantatfunktion und letztendlich für den Verlust der Spenderniere. (57)

Um Abstoßungen beziehungsweise therapieren zu können, müssen die unterschiedlichen Arten der Abstoßungen sowie deren Ursachen und Eigenschaften bekannt sein. Diese sollen nun im Folgenden dargestellt werden.

Die hyperakute Abstoßung stellt die schwerste Form der Abstoßung dar. (58) Sie tritt innerhalb von 48 Stunden nach Anastomosierung der Spenderniere auf und zeigt sich durch Fieber und Anurie. Ursächlich sind vorbestehende zytotoxische Antikörper gegen die HLA- oder die ABO-Merkmale des Spenders, die an das Gefäßendothel binden und dadurch das Komplementsystem aktivieren. (15) Es kommt zu einer Thrombenbildung durch Aggregation von Thrombozyten und Neutrophilen, die zu einer kortikalen Nekrose führt. (26) Diese ist irreversibel und als Therapie kommt nur die Entfernung des Transplantats in Frage. Um eine hyperakute Abstoßung zu vermeiden, wird routinemäßig vor jeder Transplantation ein Crossmatch durchgeführt. Hierfür werden Empfängerserum und Spenderlymphozyten zusammengegeben und somit vorbestehende Antikörper nachgewiesen. (58) Ein positives Crossmatch ist

normalerweise eine Kontraindikation für eine Transplantation. (48) In Ausnahmefällen ist eine Transplantation nach einer Desensibilisierung jedoch trotzdem möglich. (53) Durch die Durchführung eines Crossmatches vor jeder Transplantation wurde das Auftreten hyperakuter Abstoßungen auf ein Minimum reduziert. (46)

Drei bis fünf Tage nach der Transplantation kann eine akzelerierte Abstoßung auftreten. Sie äußert sich in Form von Fieber, Oligurie, Transplantatschwellung und einer durch Schmerzen bedingten Abwehrspannung. Durch nicht komplementbindende Antikörper kommt es zu Gefäßrupturen und dadurch zu Blutungen im Spenderorgan. Als Therapie erfolgen eine Plasmapherese und die Gabe von antilymphozytären Medikamenten (Antilymphozytäres Globulin, Antithymocytäres Globulin, Anti-CD3-Antikörper). Ungefähr 60% der Transplantate können durch diese intensive Therapie gerettet werden. (58)

Die akute Abstoßung erfolgt normalerweise sechs bis 90 Tage nach der Transplantation. Bei ihr zeigt sich ein plötzlicher Serum-Kreatinin-Anstieg, Oligurie, Salz- und Flüssigkeitsretention, Transplantatschwellung, Abwehrspannung und teilweise Fieber. (58) Sie entsteht üblicherweise dadurch, dass Empfänger-T-Zellen die fremden HLA-Merkmale auf den Spenderzellen erkennen (direkter Weg). (15), (59) Bei der akuten Abstoßung unterscheidet man zwischen der T-Zell-vermittelten und der Antikörper-vermittelten Abstoßung.

Die T-zellvermittelte akute Abstoßung entsteht durch mononukleäre Zellen im Interstitium (vor allem CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten). Diese führen zu einer Entzündung der Tubuli und einer Endarteriitis durch eine subendotheliale und intimale Infiltration von T-Zellen und Makrophagen. (60) Manchmal kann auch eine Entzündung der Glomeruli gefunden werden.

Die akute antikörpervermittelte Abstoßung – auch akute humorale Abstoßung genannt – macht etwa 25% der akuten Abstoßungen aus und kann auch in Kombination mit der T-Zell-vermittelten akuten Abstoßung auftreten. (61), (62), (63) Neutrophile und Monozyten akkumulieren in peritubulären und glomerulären Kapillaren. Dadurch finden sich oft dilatierte Kapillaren in der Biopsie. (62) Ursächlich für diese Art der Abstoßung sind – wie es der Name schon sagt – HLA-spezifische Antikörper, die gegen das Transplantat gerichtet sind. Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Diagnose einer antikörpervermittelten Abstoßung ist der Nachweis von C4d in der

Histologie. C4d stellt ein inaktives Fragment des Komplementfaktors C4 dar, der im klassischen Weg der Komplementkaskade, die durch Antikörper aktiviert wird, entsteht. (64), (65) C4d verbleibt mehrere Tage nach der Freisetzung von C1 im Transplantat. (59) Ist C4d im Biopsat vorhanden, so sind auch zu 88-95% donorspezifische Antikörper nachweisbar. (61), (66)

Das Transplantat kann bei einer akuten Abstoßung mit einer Erfolgsrate von ungefähr 60-90% durch eine Therapie mit Steroiden und antilymphozytären Medikamenten erhalten werden. (58) Die antikörpervermittelte Abstoßung besitzt jedoch einen aggressiveren Verlauf als die T-Zell-vermittelte Abstoßung und spricht nicht so gut auf die herkömmlichen immunsuppressiven Therapien an. (61)

Die chronische Transplantatabstoßung tritt frühestens nach über zwei Monaten nach der Transplantation auf und stellt die häufigste Ursache für einen Transplantatverlust im Langzeitverlauf dar. (67) Der Patient weist eine leichtgradige Proteinurie und gelegentlich eine Hämaturie auf und leidet oft an einer arteriellen Hypertension und Ödemen. Im Labor zeigen sich langsam steigende Serum-Kreatinin-Werte. Histologisch findet man eine Glomerulopathie (Verdopplung bzw. Vervielfältigung der Schichten der Basalmembran), peritubuläre Kapillaropathie, Transplantatatheropathie (neointimale Verdickung und Einwanderung monozytärer Zellen) und eventuell eine interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie. (60) Diese chronische Form der Abstoßung entsteht unter anderem dadurch, dass die prozessierten Antigene des Spenders auf den antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers präsentiert werden und T-Zellen aktivieren (indirekter Weg). (15), (59) Gebildete Antikörper (68) binden dann an das Endothel und aktivieren das Komplementsystem. Schließlich kommt es aber zu einem Reparaturprozess des Endothels. Dieser führt jedoch zu einer Endothelproliferation und -verdickung, was sich letztendlich in einer Atherosklerose und Gefäßobstruktion widerspiegelt. (31) Es existiert keine spezifische Therapie. Die einzige Möglichkeit, diesen Prozess hinauszuzögern besteht darin, Risikofaktoren, die die Gefäßschäden noch verstärken würden, zu minimieren. Dies erfolgt in der Kontrolle des Blutdrucks sowie der Prävention und Behandlung von wiederkehrenden akuten Abstoßungen, Dyslipidämien, Diabetes und des Hyperparathyreoidismus. (67)

Als eine Unterform der chronischen Abstoßung wird die chronische humorale Abstoßung gesehen. Um diese diagnostizieren zu können, müssen donorspezifische

Antikörper detektiert sowie eine Transplantatglomerulopathie und C4d peritubulär im histologischen Präparat gefunden werden. (69)

### 1.5 Immunsuppression und Therapie der Transplantatabstoßung

Um eine Abstoßung des Empfängers gegenüber dem Spendertransplantat zu vermeiden, muss eine Immunsuppression durchgeführt werden. Da noch keine spezifische Immunsuppression vorhanden ist, die nur die Immunabwehr gegen das Spenderorgan verhindert, wird das komplette Immunsystem des Empfängers gedrosselt. (58), (70)

Die Grundlage der Immunsuppression stellen Kortikosteroide dar. Sie blockieren die Gentranskription von Zytokinen in Lymphozyten, antigenpräsentierenden Zellen und anderen Immunzellen. (2) Trotz neuerer und stärkerer Immunsuppressiva sind die Steroide immer noch essenziell, da sich bei deren Weglassen die Abstoßungsrate erhöht und sich sowohl die kurzfristige als auch die langfristige Transplantatfunktion verschlechtert. (71), (72)

Ein weiteres Immunsuppressivum ist Azathioprin. Dies inhibiert die Leukozytenproliferation. (2)

Azathioprin wurde jedoch weitestgehend von dem neueren Mycophenolat Mofetil abgelöst. (73) Dies blockiert ebenfalls die Leukozytenproliferation, wirkt jedoch etwas selektiver auf Lymphozyten (2) und besitzt eine stärkere Wirkung. (33), (74), (75)

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Immunsuppression sind Calcineurin-Inhibitoren. Durch die Blockade von Calcineurin wird die Synthese von Interleukin-2 (IL-2) und anderen Zytokinen verhindert. Die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen wird unterdrückt. (2), (58) Als Calcineurin-Inhibitoren sind das Cyclosporin und das stärker wirksame Tacrolimus bekannt. (76)

Sirolimus inhibiert die Signaltransduktion vieler Zytokinrezeptoren wie IL-2-, IL-4-, IL-10- und IL-15-Rezeptoren. Somit wird die Progression des T-Zell-Zyklus verhindert. (58) Die neueste Entwicklung in der Pharmazie sind monoklonale Antikörper. In der Immunsuppression bei Transplantationen werden antilymphozytäres Globulin (ALG), antithymozytäres Globulin (ATG), OKT3 (ein Antikörper gegen das T-Zell-Oberflächen-Antigen CD3) und Anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper (Daclizumab, Basiliximab) verwendet. (58)



In der Zeit direkt nach der Transplantation ist die Gefahr der Abstoßung am größten. Deshalb werden in dieser Zeit höhere Dosen der Immunsuppressiva verwendet. Nach dieser Anfangsphase können die Dosen individuell reduziert werden und eventuell kann sogar ein Immunsuppressivum abgesetzt werden. (70) Außerdem sind direkt nach der Transplantation so gut wie alle aktivierten T-Zellen gegen das Spenderorgan gerichtet. Da nur aktivierte T-Zellen IL-2-Rezeptoren auf der Oberfläche tragen, sind IL-2-Rezeptor-Blocker hier besonders effektiv. (2)

Am Universitätsklinikum Frankfurt am Main wird als initiale Immunsuppression direkt nach der Transplantation eine Quadrupel-Therapie durchgeführt. Diese besteht aus Steroiden, Mycophenolat Mofetil, einem Calcineurin-Inhibitor und einem Biologikum (meist ein IL-2-Inhibitor). (77)

Immunologische Risikopatienten, zu denen retransplantierte Patienten oder Patienten mit einem PRA über 10% oder Transplantationen mit fünf bis sechs Mismatches zählen, werden direkt bei der Organtransplantation mit ATG und intravenösen Immunglobulinen behandelt und dauerhaft mit Steroiden, Mycophenolat Mofetil und Tacrolimus therapiert. (77)

Bei ABO-inkompatiblen Lebendspenden wird 28 Tage vor der Transplantation das Immunsystem mit Rituximab/B-Zell-Antikörpern unterdrückt. 14 Tage vor der Spende wird mit der Dauer-Immunsuppression bestehend aus Steroiden, Mycophenolat Mofetil und Tacrolimus begonnen. An den Tagen vor der Operation wird zusätzlich eine Plasmaseparation oder Immunadsorption vorgenommen und es werden intravenöse Immunglobuline verabreicht, um die Isoagglutinine auf einen Titer  $\leq 4$  zu senken. (77)

Abstoßungen werden allgemein mit Steroiden und Tacrolimus behandelt. Wenn es sich um zelluläre Abstoßungen handelt, bevorzugt man neben Steroiden ATG, bei humoralen Abstoßungen eher eine Plasmapherese, Rituximab und/oder intravenöse Immunglobuline, die die vorhandenen Antikörper neutralisieren. (63), (66), (77)

Zu den häufigsten Nebenwirkungen dieser Immunsuppressiva zählen kardiovaskuläre Schäden, Infektionen und im Langzeitverlauf das Auftreten von Malignomen. Da diese schweren Nebenwirkungen das Überleben des Transplantatempfängers neben dem chronischen Transplantatversagen am meisten begrenzen, muss die immunsuppressive Therapie so gering wie möglich gehalten werden, ohne dabei das Risiko für eine

Abstoßung zu erhöhen. Deshalb ist eine individuelle Einstellung der Patienten notwendig. (70)

#### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der negative Einfluss HLA-spezifischer Antikörper, die im LCT nachgewiesen werden, auf die Abstoßungsrate von Nierentransplantaten und auf die Transplantatfunktion ist unumstritten. (31)

Jedoch ist es neueren Tests zur Antikörperdetektion wie der ELISA und vor allem der Luminex möglich, mit größerer Sensitivität Antikörper zu detektieren. (78) Der Luminex ist in der Lage, Antikörper zu finden, die sich nur in sehr geringer Konzentration im Serum befinden. (43)

Ob diese niedrigtitrigen Antikörper die Transplantatfunktion, Abstoßungsrate und letztendlich das Transplantatüberleben beeinflussen, ist noch nicht abschließend geklärt. Einige Studien konnten einen negativen Effekt dieser Antikörper aufdecken (47), (79), (80); andere Studien haben keinen Unterschied zwischen antikörperpositiven und -negativen Patienten festgestellt (34), (81), (82).

Durch die erhöhte Anzahl an Antikörpern, die der Luminex in den Patientenseren entdeckt, besteht aber die Gefahr, dass Patienten zu viele inakzeptable Antigene für die Organallokation bekommen. Je mehr inakzeptable Antigene Patienten auf der Warteliste für ein Organ besitzen, desto unwahrscheinlicher ist es, dass sie ein passendes Spenderorgan erhalten. Viele von diesen hochimmunisierten Patienten versterben, bevor sie transplantiert werden können. (39)

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob HLA-spezifische Antikörper, die im Luminex detektiert werden, zu einer erhöhten Abstoßungsrate, einer verminderten Transplantatfunktion und einem häufigeren Transplantatverlust führen. Wird diese Hypothese bestätigt, könnten die entsprechenden Ergebnisse das ausschlaggebende Argument für eine Anwendung des Luminex trotz der durch ihn verursachten erschwerten Organallokation sein, da dann der Luminex einen nicht vernachlässigbaren Beitrag zu einer Verlängerung der Überlebensdauer und einer Verbesserung der Funktionsfähigkeit von Transplantaten leistet.

Zudem soll untersucht werden, ob der Luminex einen Vorteil im Vergleich zu den alternativen Antikörperdetektionstests LCT und ELISA mit sich bringt.

Da bei der Auswertung des Luminex noch keine genauen Grenzen für positiv und negativ festgelegt werden konnten (50), (81), (83), sollen außerdem unterschiedliche Cut-off-Grenzwerte im Hinblick auf Transplantatfunktion und -verlust analysiert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien und Geräte

Folgende Reagenzien und Geräte wurden verwendet:

LABScreen Single Antigen class I – Combi (LOT 007 und 008)	One Lambda
LABScreen Single Antigen class II – Group 1 (LOT 009)	One Lambda
LS Negative Control Serum (LOT 12)	One Lambda
Wash Buffer (10X)	One Lambda
PE Conjugate Goat Anti-Human IgG	One Lambda
PBS Dulbecco (LOT 1232 W)	Biochrom AG
Aqua destillata	
Natriumchlorid 0,9%	Fresenius Kabi
Ethanol 70 %	Roth
Natriumhypochlorid 12%	Roth
Liqui Chip® System Fluid 10x concentrate	Qiagen
Zentrifuge Universal 320	Hettich
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Mikrotiterplatten 96 Well	Pittston
Plastik-Tubes 1,5 ml	Eppendorf
Rotilabo-Reaktionsgefäß	Roth
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Adhäsiver PCR-Film	ABgene
LABScan TM 100 Flow-Analyser Luminex	One Lambda

#### 2.1.2 Klinische Daten der Patienten und Patientenseren

In diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, die zwischen 1997 und 2010 eine Nieren-/Nieren-Pankreas-Transplantation erhalten haben. Dies umfasst Toten- als auch Lebendspenden.

Die passenden Spender wurden anhand des Allokationssystems des Eurotransplant Network Information System (ENIS) ermittelt. Hierbei wurden Transplantationen mit bereits vorhandenen donorspezifischen Antikörpern, die im ELISA und LCT ermittelt

wurden, gegen das Transplantat ausgeschlossen. Außerdem wurde vor der Transplantation ein Crossmatch durchgeführt und nur bei dessen Negativität wurde die Transplantation frei gegeben.

Die Seren der Patienten aus dem letzten Quartal vor der Transplantation wurden bei Routinekontrollen zur Testung ihrer Immunität gewonnen und als Forschungsseren bei -27°C eingefroren.

Die Nutzung der Patientenseren zu Forschungszwecken und das Erheben der klinischen Daten erfolgte nach Zustimmung der Patienten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Johann Wolfgang Goethe-Universität genehmigt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Erhebung der klinischen Daten

Die klinischen Daten der eingeschlossenen Patienten wurden aus den Krankenakten erhoben. Diese wurden vom Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt.

Erfasst wurden folgende Daten des Transplantatempfängers: Geburtsdatum, Geschlecht, Grunderkrankung und andere Erkrankungen, Infektionsstatus (Hepatitis, Zytomegalievirus und Humanes Immundefizienz-Virus), Transplantat-Mismatch, Lebend- oder Leichenspende, Transplantationsanzahl und -datum, Dialysezeitraum und -art, verspäteter Beginn der Transplantatfunktion und Rückkehr zur Dialyse, Abstoßungen und deren Therapie, Immunsuppression und -änderungen sowie deren Grund, Transplantatbiopsien, Kreatinin-Werte, Proteinurie (Einteilung nach dem Anteil von Protein im Urin: Grad 0 < 10mg/dl, Grad 1 > 30mg/dl, Grad 2 > 100mg/dl, Grad 3 > 300mg/dl, Grad 4 > 1000mg/dl), Eiweißnachweis im 24-Stunden-Urin, Tod und Todesursache des Transplantatempfängers. Bezüglich des Spenders wurden dessen Alter, sein Geschlecht, sein Infektionsstatus als auch dessen HLA-Typ erfasst.

Die HLA-Typisierungen von Empfänger und Spender erfolgten mit einer niedrig auflösenden serologischen Typisierung der HLA-Klasse I und einer niedrig-auflösenden molekulargenetischen Typisierung der HLA-Klasse I und II (2-digit). Es wurden Sequenz-spezifische Primer-(SSP)PCR-Kits von unterschiedlichen Anbietern oder sequenz-spezifische Oligonukleotide (SSOs) von Dynal RELI SSO HLAB Typing Kit (Invitrogen) verwendet.

Das Transplantatüberleben wurde in Monaten erfasst. Es wird definiert durch den Funktionsverlust der Transplantatniere und der damit einhergehenden Notwendigkeit einer Rückkehr zur Dialyse. Unberücksichtigt blieb hierbei der Tod des Patienten mit noch funktionierendem Transplantat.

Aufgrund der retrospektiven Erfassung der Antikörper vor Transplantation mit der Luminex-Technologie hatten die Ergebnisse keinen Einfluss auf die Therapie und das Outcome der Transplantation. Es wurde die zu diesem Zeitpunkt gängige Immunsuppression anhand der Immunität, die im LCT und ELISA festgestellt wurde, durchgeführt. Die Immunsuppression von Patienten, die keine HLA-Klasse I Antikörper aufwiesen, bestand aus Cyclosporin A, Mycophenolat Mofetil und Steroiden. Hingegen erhielten Patienten mit HLA-Klasse I Antikörpern eine intensivierete Immunsuppression mit Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Antithymozytenglobulin und Steroiden.

Die Therapie der Abstoßungen erfolgte nach gängigen Protokollen mit Steroidstoßtherapie, Plasmapherese und Immunsuppressiva wie Rituximab, Intratect, Immunglobuline etc.

### 2.2.2 Analyse der Patientenseren

In der Routinediagnostik wurden die Patientenseren auf HLA-Klasse I und -Klasse II Antikörper mit dem ELISA vierteljährlich untersucht. Zusätzlich wurden die HLA-Klasse I Antikörper zweimal pro Jahr mit dem LCT detektiert.

Für das Screening nach Antikörpern mit dem ELISA wurde das Lambda Antigen Tray – Mixed Class-I & Class-II der Firma One Lambda verwendet. Zur Differenzierung der HLA-Antikörper wurde Lambda Antigen Tray Class-I bzw. Class II, ebenfalls von One Lambda, benutzt. Der LCT erfolgte mithilfe eines hausinternen Panels mit ungetrennten T- und B-Zellen von mindestens 60 Spendern oder dem Lambda Cell Tray 1W60 von One Lambda.

Als positiv wurden der ELISA und der LCT jeweils gewertet, wenn der PRA-Wert, ein Maß für den Anteil von HLA-Antikörpern im Patientenserum, über 5% aufwies.

Die Ergebnisse dieser Tests wurden aus dem hausinternen Laborinformationssystem Swiss Lab gewonnen.

Die Patientenseren, die in dem der Transplantation vorangehenden Quartal gewonnen worden waren, wurden mit dem Luminex Screening-Test (LABScreen Mixed von One

Lambda) untersucht. Bei den Seren, die einen positiven Luminex Screening-Test aufwiesen (NBG-Ratio > 1,5), wurde ein Luminex Immunoassay mit dem LABScreen Single Antigen durchgeführt (siehe 2.2.3).

## 2.2.3 Luminex Immunoassay

### 2.2.3.1 Technischer Hintergrund

Eine neue Festphasen-Methode zur Detektion von HLA-spezifischen Antikörpern stellt die Luminex-Technologie dar.

Die Grundlage dieser Technik sind Mikrokugeln aus Polystyrol, sogenannte Beads. (84) Diese sind mit humanen Antigenen beschichtet, die aus lymphoblastoiden Zelllinien stammen. Für die HLA-Klasse I gibt es 97 verschiedene Antigene der HLA-Gruppen A, B und C und für die Klasse II 91 verschiedene Antigene der Gruppen DR, DQ und DP.

Bei dem Screening-Test befinden sich auf der Oberfläche jedes Beads verschiedene Antigene der HLA-Klasse I oder II. Somit dient dieser Test zur Einteilung in positiv und negativ der jeweiligen HLA-Klasse. (43)

Der Differenzierungs-Test „Single Antigen“ besitzt pro Bead nur ein Antigen, womit Antikörper gegen jedes einzelne Antigen nachgewiesen werden.

Jede Mikrokugel enthält unterschiedlich viele rote und infrarote Fluorochrome. Dadurch kann ein Laser die Lichtemission dem jeweiligen Bead zweifelsfrei zuordnen. (85)

Außerdem wird noch ein mit Phycoerythrin(PE) beladener Anti-IgG-Antikörper, der von der Ziege stammt und somit gegen humane Antikörper gerichtet ist, zugegeben. Die Lichtemissionen, die dieser ausstrahlt, werden von einem zweiten Laser gemessen. Hiermit wird das Vorhandensein von HLA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Stärke dieser Lichtemissionen wird in mean fluorescence intensity (MFI) angegeben. (84)

Bei jeder Durchführung werden ein Positivkontroll- und ein Negativkontroll-Bead mitgemessen. Durch das Positivkontroll-Bead, das gereinigte humane IgG-Antikörper gebunden hat, kann die Aktivität des PE bestimmt werden. Das Negativkontroll-Bead ohne jegliche Antigene auf der Oberfläche dient zur Bestimmung von unspezifischem Binden jeder einzelnen Probe.

Zusätzlich gibt es ein Negativkontrollserum, das zur Normalisierung der MFI-Werte dient, indem das Hintergrundrauschen abgezogen wird. (50)

#### 2.2.3.2 Durchführung des LABScreen Single Antigen

Zuerst wurden die LabScreen Beads durch Vortexen gemischt. Je HLA-Klasse I und II wurden 5µl der Beads pro Patientenserum in ein Well gegeben. Um die Kosten des Testes zu Forschungszwecken zu reduzieren, wurde eine 1 zu 4-Verdünnung der Beads-Flüssigkeit mit Natriumchlorid 0,9% angesetzt und von dieser je 5µl in ein Well pipettiert.

Die Patientenseren wurden aufgetaut und auf Zimmertemperatur gebracht. Zur Entfernung von Partikeln im Serum, die falsch positive Ergebnisse erzeugen können, wurde das Patientenserum 10 Minuten bei 11500g mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden 20µl der mittleren Phase des zentrifugierten Serums in jedes Well gegeben und gut gemischt. Die Negativkontrolle aus Ziegen Serum wurde pipettiert wie die Patientenseren. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde eine adhäsive Folie auf die Platte gegeben und das ganze bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Der Waschpuffer, der im Testkit der Firma One Lambda enthalten ist, wurde mit Aqua dest. zu einer 1 zu 10-Lösung verdünnt. Pro Patient und pro HLA-Klasse wurden 1500µl benötigt.

Nach der 30 minütigen Inkubation wurde in jedes Well 150µl der Waschpufferlösung gegeben, mit Adhäsiv-Folie abgedeckt und fünf Minuten bei 1300g mit Bremse zentrifugiert.

Anschließend wurde die Waschpufferlösung durch sanftes Ausklopfen aus den Vertiefungen der Platte entfernt.

Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Jedoch wurde statt der 150µl nun 200µl der Waschpufferlösung verwendet und mit der Pipette gut vermischt.

Um die PE-Lösung herzustellen, wurde pro Probe 1µl PE-konjugiertes Anti-Human-IgG mit 99µl Waschpufferlösung verdünnt. 100µl der PE-Lösung wurden in jedes Well gegeben und gut mit der Pipette gemischt. Nach dem Abdecken mit Adhäsiv-Folie wurde die Platte bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 Minuten inkubiert.



Hierauf wurde die Platte wieder zentrifugiert und die PE-Lösung durch sanftes Ausklopfen entfernt.

Nach erneutem zweimaligem Waschen wurde pro Vertiefung 80µl PBS zugegeben und gemischt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in den Vertiefungen der Platte befinden.

Die Proben wurden anschließend mit dem Flow-Analyzer Luminex analysiert.

#### 2.2.3.3 Verdünnungsevaluation

Da die Kosten der Luminexanalyse sehr hoch sind, wurde zur Kostenreduktion die Beads-Menge durch Verdünnung der Beads mit Natriumchlorid 0,9% verkleinert.

Fünf Patientenseren, die sowohl in HLA-Klasse I als auch in HLA-Klasse II stark immunisiert sind, wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen analysiert. Die Beads wurden mit Natriumchlorid 0,9% zu einer 1 zu 2-, 1 zu 4-, 1 zu 8-, 1 zu 10- und 1 zu 16-Verdünnung versetzt. Eine Verdünnung der Patientenseren wurde nicht durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Patientenseren mit unverdünnten Beads getestet.

Dieser Ansatz erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben und wurde an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

#### 2.2.3.4 Auswertung und Software

Die Auswertung des Luminex Assays erfolgte mit dem Programm HLA Fusion der Firma One Lambda. Anhand von software-unterstützten Berechnungen durch das Programm werden die normalisierten MFI-Werte ermittelt, welche die Stärke der Anti-HLA Reaktivität widerspiegeln. Diese werden in Gruppen unterschiedlicher Reaktionsstärken (X1- X8) eingeteilt.

HLA Fusion erstellt jeweils ein Diagramm für HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Antikörper. Die Ordinate zeigt die normalisierten MFI-Werte in Form von Balken an. Die Abszisse gibt die Spezifitäten der Antikörper wieder. Die Antikörper der HLA-Klasse I werden in die Gruppen HLA-A, -B, und -C aufgeteilt, die HLA-Klasse II in HLA-DQ, -DR und -DP. Unter den Balken befinden sich dann die genauen Untergruppen der Spezifitäten als Zahlen. Die Zahlen in der Farbe Lila werden von dem Programm als positiv gewertet. Das Programm reiht die MFI-Werte der Höhe nach auf. Dabei werden die Antikörper

mit der höchsten Reaktionsstärke X8 ganz links aufgereiht und als rote Balken dargestellt. Die mittleren Reaktionsstärken X6 werden als orange Balken wiedergegeben, Reaktionsstärken X4 als gelbe Balken und die grünen Balken (X2 und X1) besitzen die geringsten MFI-Werte und werden als negativ gewertet.

Zur Qualitätskontrolle des jeweiligen Assays werden die MFI-Werte der Negativ- und Positiv-Kontrolle beurteilt: Der MFI-Wert der Negativ-Kontrolle sollte einen MFI von 1500 nicht übersteigen, der MFI-Wert der Positiv-Kontrolle sollte mindestens 1500 betragen und mindestens zweimal so hoch wie die Negativ-Kontrolle sein.

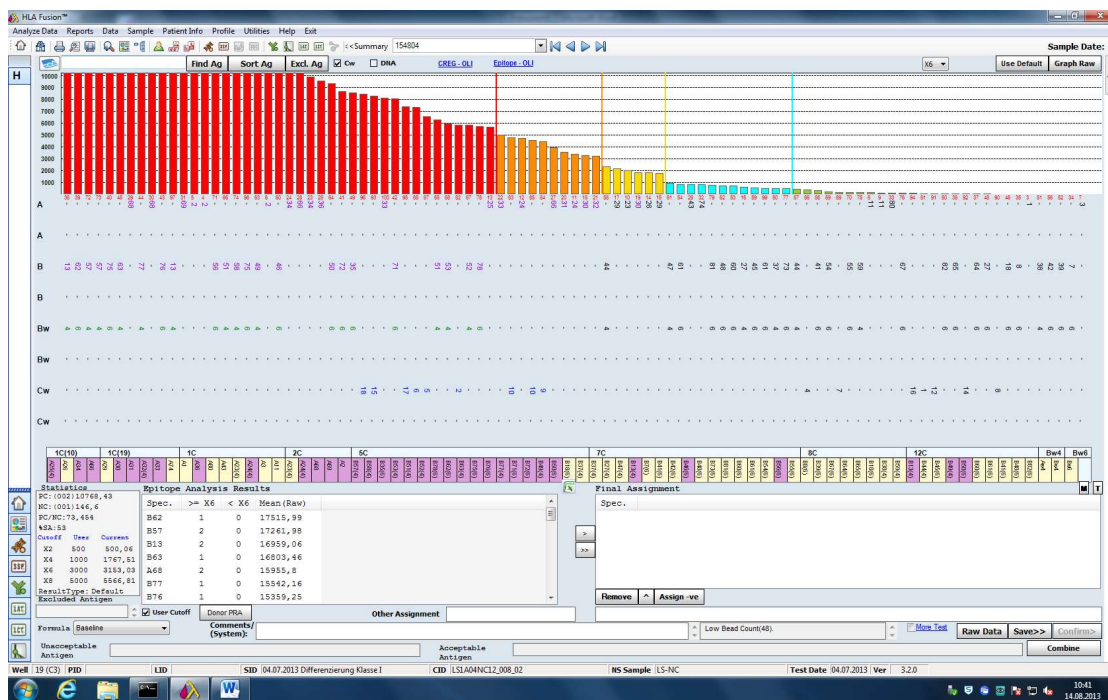


Abbildung 3: Screenshot aus dem Programm HLA Fusion 2 bei der Auswertung von HLA-Klasse I Antikörpern einer Probe mit dem Programm HLA Fusion.

Die normalisierten MFI-Werte wurden in dieser Studie in folgende Kategorien eingeteilt:

- Negativ: MFI < 1000
- Positiv: MFI ≥ 1000
- MFI ≥ 2000
- MFI ≥ 3000
- MFI ≥ 4000

#### 2.2.4 Statistische Analyse

Zur Auswertung des Transplantatüberlebens wurden Kaplan-Meier Kurven verwendet.

Deren Signifikanzen wurden mit dem Logrank-Test ermittelt.

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus bei den Unterschieden der Transplantat- und Patienteneigenschaften abhängig vom Antikörperstatus wurden der Mann-Whitney-U-Test oder der Chi<sup>2</sup>-Test benutzt. Um den Einfluss auf die Kreatinin-Werte, 24h-Eiweiss und Proteinurie abschätzen zu können, wurde der ungepaarte t-Test angewendet.

Das Signifikanzniveau lag bei  $p = 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Verdünnungsversuche

Zur Überprüfung, inwieweit eine Testdurchführung mit verdünnten Beads zu korrekten Testergebnissen führt, wurden fünf stark immunisierte Patientenserum in fünf Verdünnungsstufen (1 zu 2, 1 zu 4, 1 zu 8, 1 zu 10 und 1 zu 16) an drei unterschiedlichen Tagen getestet. Die Verdünnung wurde mit Natriumchlorid 0,9% durchgeführt.

##### 3.1.1 Differenz und Verhältnis der Verdünnungsreihen

Zunächst erfolgt die Evaluation der Verdünnungsreihen mit der Berechnung der absoluten Differenzen der normalisierten MFI-Werte.

$$\text{Differenz} = nMFI \text{ verdünnt} - nMFI \text{ unverdünnt}$$

Die Differenzen der normalisierten MFI-Werte aus den fünf Patientenserum der drei unterschiedlichen Testtage werden hinsichtlich der einzelnen Beads (97 Beads der HLA-Klasse I und 91 Beads der HLA-Klasse II) abhängig von der jeweiligen Verdünnungsstufe gemittelt (2820 Werte pro Verdünnungsstufe). Hierbei kommt es bei den niedrigeren Verdünnungsstufen zu geringen Abweichungen (1 zu 2-Verdünnung: Mittelwert 58,68, SD 322,76; 1 zu 4-Verdünnung: Mittelwert 17,34, SD 323,44; 1 zu 8-Verdünnung: Mittelwert 61,81, SD 324,13), jedoch bei den höheren Verdünnungsstufen ab einer Verdünnung von 1 zu 10 zu deutlichen Unterschieden (1 zu 10-Verdünnung: Mittelwert 115,22, SD 338,70; 1 zu 16-Verdünnung: Mittelwert 227,83, SD 354,95). Es zeigen sich keine vermehrten Abweichungen in der Höhe der Differenzen zugunsten der HLA-Klasse I oder HLA-Klasse II.

Des Weiteren werden die prozentualen Verhältnisse zwischen den verdünnten und unverdünnten MFI-Werten ermittelt. Dies erfolgt durch die Division der zuvor errechneten Differenz des normalisierten MFI-Wertes zwischen unverdünnter Probe und bestimmter Verdünnung durch den normalisierten MFI-Wert der unverdünnten Probe. Anschließend wird eine Multiplikation mit 100 durchgeführt, um einen prozentualen Wert zu erhalten.

$$\text{Prozentuales Verhältnis} = \frac{nMFI \text{ verdünnt} - nMFI \text{ unverdünnt}}{nMFI \text{ unverdünnt}} * 100\%$$

In Tabelle 1 sind die gemittelten prozentualen Verhältnisse und deren Standardabweichungen der HLA-Klasse I und der HLA-Klasse II sowie eine

Zusammenfassung beider HLA-Klassen zu sehen. Die gemittelten prozentualen Verhältnisse der 1 zu 8-Verdünnung sind durch ein höheres Signifikanzniveau gekennzeichnet als alle anderen Verdünnungen (ungepaarter T-Test: p-Wert  $<0,0001$ ). Außerdem war ein signifikanter Unterschied zwischen der 1 zu 10- und 1 zu 16-Verdünnung ersichtlich (ungepaarter T-Test: p-Wert  $=0,0123$ ). Zwischen den prozentualen Verhältnissen der anderen Verdünnungsstufen gab es keine signifikanten Unterschiede. In allen Verdünnungsstufen – ausgenommen der 1 zu 8-Verdünnung – ist eine stärkere Abweichung des prozentualen Verhältnisses der HLA-Klasse I als bei der HLA-Klasse II zu sehen. Diese Unterschiede zwischen den HLA-Klassen sind alle signifikant (ungepaarter T-Test: p-Wert 1 zu 2  $<0,0001$ ; p-Wert 1 zu 4  $=0,0002$ ; p-Wert 1 zu 8  $<0,0001$ ; p-Wert 1 zu 10  $=0,0036$ ; p-Wert 1 zu 16  $<0,0001$ ).

		<b>Verdünnung 1:2</b>	<b>Verdünnung 1:4</b>	<b>Verdünnung 1:8</b>	<b>Verdünnung 1:10</b>	<b>Verdünnung 1:16</b>
<b>HLA-Klasse I</b>	<b>Mittelwert [%]</b>	210,42	162,54	177,80	172,70	161,69
	<b>SD [%]</b>	794,58	684,18	686,37	570,67	761,68
	<b>p-Wert (vs. Unverdünnt)</b>	0,10	0,21	0,15	0,10	0,27
<b>HLA-Klasse II</b>	<b>Mittelwert [%]</b>	39,85	72,72	327,03	156,67	39,95
	<b>SD [%]</b>	182,81	460,66	1941,74	773,31	167,83
	<b>p-Wert (vs. Unverdünnt)</b>	0,66	0,62	0,17	0,18	0,63
<b>Gesamt</b>	<b>Mittelwert [%]</b>	127,86	119,06	250,03	164,94	102,76
	<b>SD [%]</b>	589,50	586,91	1435,98	674,58	561,35
	<b>p-Wert (vs. Unverdünnt)</b>	0,13	0,19	0,07	0,04	0,32

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verhältnisse der einzelnen Verdünnungsstufen unterteilt in HLA-Klasse I und HLA-Klasse II sowie deren Zusammenfassung. Signifikanzen berechnet mit dem ungepaarten T-Test.

Als Vergleichskontrolle werden die prozentualen Verhältnisse aus den Abweichungen der unverdünnten Proben an den drei unterschiedlichen Tagen berechnet, was in Tabelle 2 abgebildet ist. Der Mittelwert beträgt -59,64%, die Standardabweichung 208,08%. Diese Vergleichskontrolle weist signifikant geringere Abweichungen der prozentualen Verhältnisse im Vergleich zu den Verhältnissen der Verdünnungen auf (ungepaarter T-Test: p-Wert <0,0001).

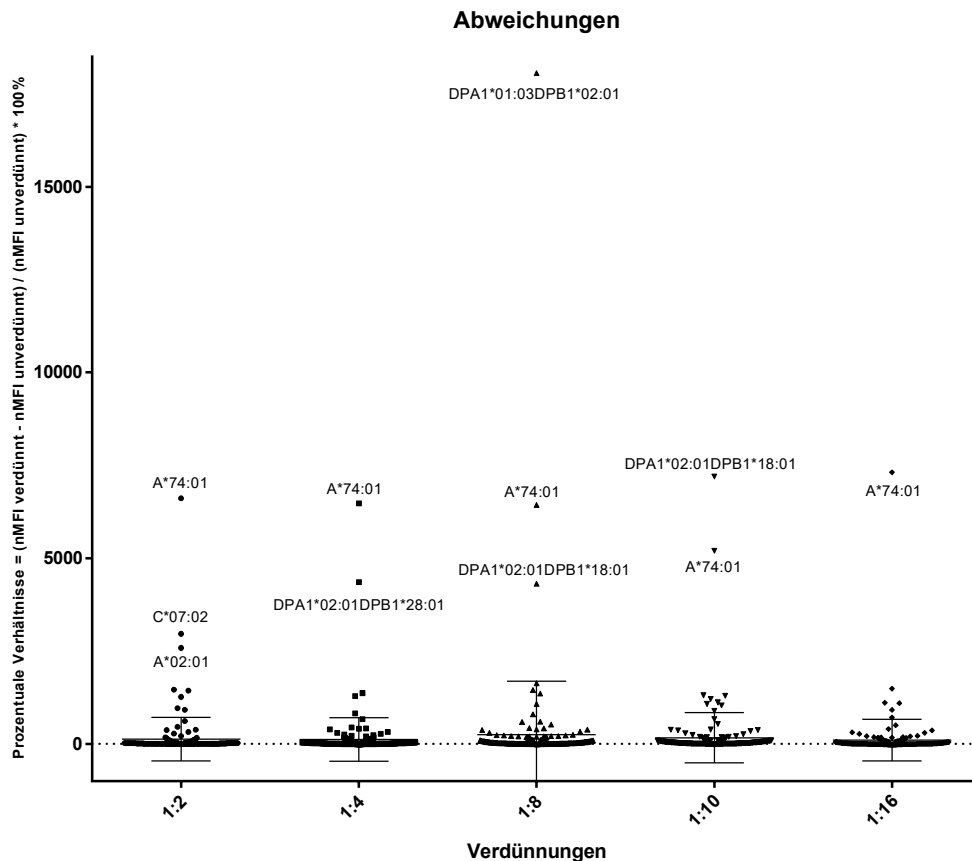
		<b>Unverdünnt</b>
<b>HLA-Klasse I</b>	<b>Mittelwert [%]</b>	-69,82
	<b>SD [%]</b>	275,02
<b>HLA-Klasse II</b>	<b>Mittelwert [%]</b>	-48,66
	<b>SD [%]</b>	90,91
<b>Gesamt</b>	<b>Mittelwert [%]</b>	-59,64
	<b>SD [%]</b>	208,08

Tabelle 2: Interassay-Varianz der Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Verhältnisse der unverdünnten Testdurchführungen unterteilt in HLA-Klasse I und II sowie deren Zusammenfassung.

Einige Beads offenbaren stark abweichende prozentuale Verhältnisse. Hierunter fallen in der HLA-Klasse I A\*36:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 905,88%), A\*74:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 6394,40%), A\*80:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 1245,34%), B\*18:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 1197,23%) und C\*07:02 (Mittelwert des Verhältnisses: 849,55%). In der HLA-Klasse II sind es die Beads DPA1\*01:03DPB1\*02:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 3984,56%), DPA1\*02:01DPB1\*18:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 2291,05%) und DPA1\*02:01DPB1\*28:01 (Mittelwert des Verhältnisses: 1003,13%).

Auffällig ist vor allem, dass die gemittelten prozentualen Verhältnisse stets positiv ausfallen, was bedeutet, dass eine Verdünnung der Beads im Allgemeinen zu einer Erhöhung der MFI-Werte führt. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Streuung der Mittelwerte (Mittelwert der fünf Patientenseren der drei Versuchstage) der prozentualen Verhältnisse in der Graphik 1 betrachtet. Der Maximalwert der gemittelten prozentualen Verhältnisse aller Verdünnungen liegt bei 18058,61% (1 zu 8-Verdünnung: DPA1\*01:03DPB1\*02:01), wohingegen der Minimalwert -31,02% (1 zu 16-Verdünnung: DQA1\*01:03DQB1\*06:03) beträgt. Im Mittel wurden 2,99% zusätzliche Spezifitäten als positiv bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich

1000 detektiert (Verdünnung 1 zu 2: 2,91%; Verdünnung 1 zu 4: 2,77%; Verdünnung 1 zu 8: 3,55%; Verdünnung 1 zu 10: 3,23%; Verdünnung 1 zu 16: 2,48%). Analog hierzu gingen 2,22% positive Spezifitäten verloren (Verdünnung 1 zu 2: 2,13%; Verdünnung 1 zu 4: 1,56%; Verdünnung 1 zu 8: 2,23%; Verdünnung 1 zu 10: 2,16%; Verdünnung 1 zu 16: 3,01%).



Graphik 1: Streuung der Mittelwerte (Mittelwert der fünf Patientenseren der drei Versuchstage) der prozentualen Verhältnisse der einzelnen Verdünnungsstufen.

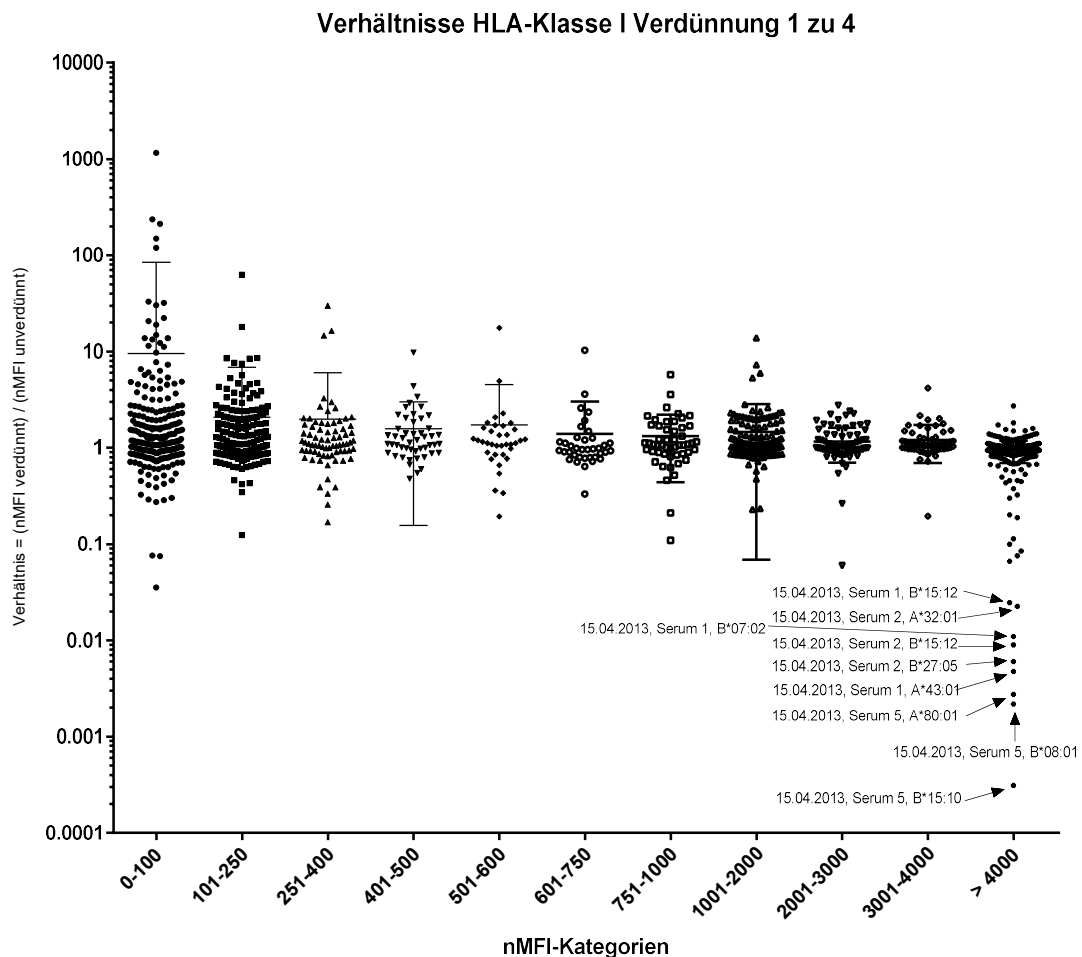
Zusätzlich zu den prozentualen Verhältnissen werden die reinen Verhältnisse bestimmt, die sich aus der Division des entsprechenden verdünnten normalisierten MFI-Wertes durch den unverdünnten normalisierten MFI-Wert ergibt.

$$\text{Verhältnis} = \frac{nMFI \text{ verdünnt}}{nMFI \text{ unverdünnt}}$$

Die Mittelwerte der Verhältnisse der einzelnen Beads werden in unterschiedliche Kategorien abhängig vom unverdünnten normalisierten MFI-Wert unterteilt: 0 – 100, > 100 – 250, > 250 – 400, > 400 – 500, > 500 – 600, > 600 – 750, > 750 – 1000, > 1000 – 2000, > 2000 – 3000, > 3000 – 4000, > 4000.

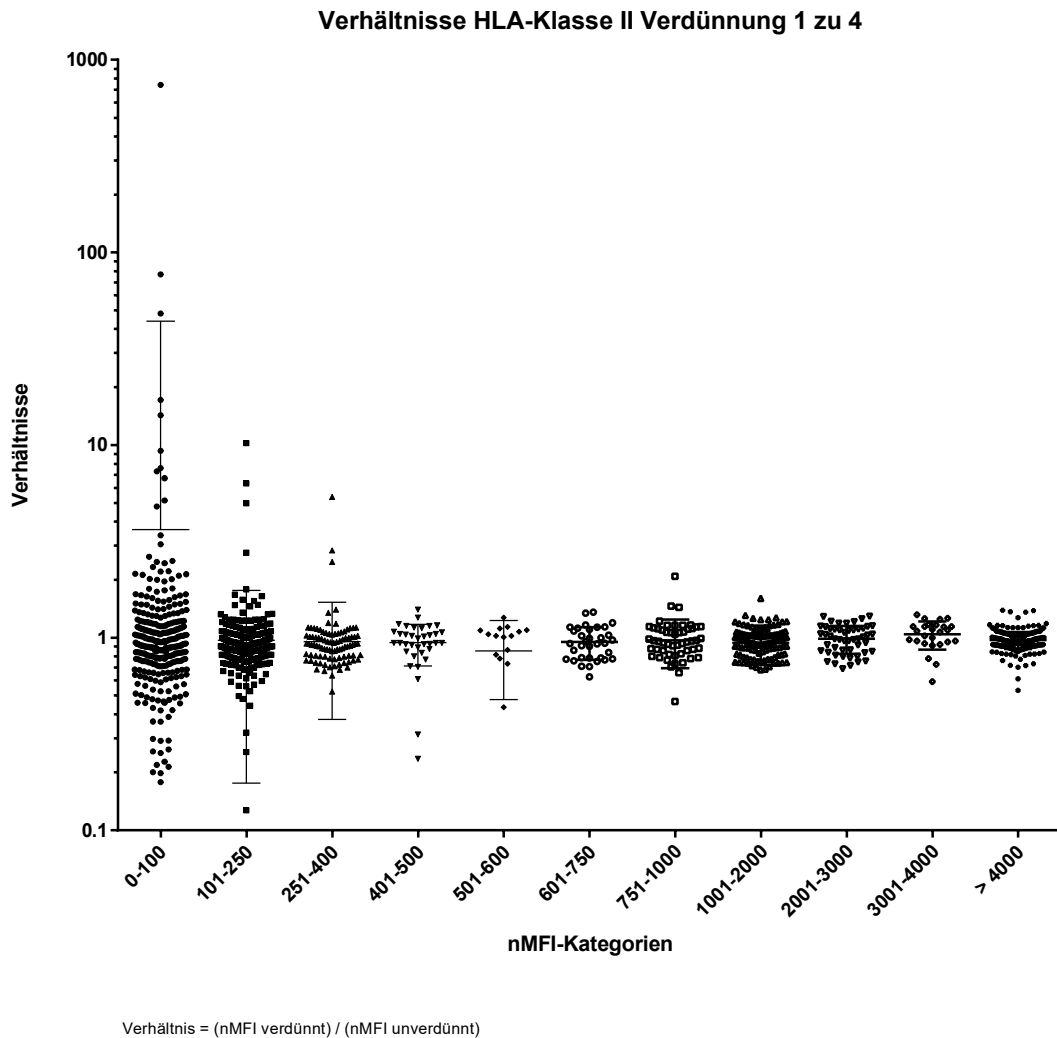


In der Graphik 2 sieht man die in Kategorien unterteilten reinen Verhältnisse (gemittelt aus den fünf Seren der drei Versuchstage) der einzelnen Beads der HLA-Klasse I in der Verdünnung 1 zu 4, welche auch bei den späteren Versuchen verwendet wurde. Hier zeigt sich, dass bei sehr kleinen MFI-Werten (vor allem bei einem MFI-Wert von  $\leq 100$ ) die Ergebnisse der Verdünnung stark abweichen können. Diese Abweichung zeigt eine Tendenz vor allem in Richtung höherer MFI-Werte bei der Verdünnung. Bei einem MFI-Wert von größer als 4000 ergeben sich zum Teil stark erniedrigte Werte in der Verdünnung. Die starken Abweichungen im Bereich der sehr hohen MFI-Werte  $> 4000$  sind auf den dritten Versuchstag zurückzuführen. Hierbei kam es bei einzelnen Spezifitäten, die im unverdünnten Test sehr hohe normalisierte MFI-Werte aufwiesen, zu negativen Ergebnissen in allen durchgeführten Verdünnungsstufen. Dies war an den ersten beiden Versuchstagen nicht erkennbar.



**Graphik 2: Mittelwert der Verhältnisse (Mittelwert der fünf Patientenserum der drei Versuchstage) der Beads der HLA-Klasse I der Verdünnungsstufe 1 zu 4 unterteilt in elf nMFI-Kategorien abhängig von unverdünnter Kontrolle.**

Die Graphik 3 präsentiert die reinen Verhältnisse der Beads der HLA-Klasse II. Es zeigen sich ebenfalls Abweichungen mit der Neigung zu höheren MFI-Werten in der Verdünnung bei ursprünglich kleinen MFI-Werten.



**Graphik 3: Mittelwert der Verhältnisse (Mittelwert der fünf Patientenseren der drei Versuchstage) der Beads der HLA-Klasse II der Verdünnungsstufe 1 zu 4 unterteilt in elf nMFI-Kategorien abhängig von unverdünnter Kontrolle.**

Die Abweichungen der reinen Verhältnisse der Verdünnungsstufe 1 zu 4 ist in den anderen Verdünnungsstufen in ähnlichem Ausmaß erkennbar.

### 3.1.2 Sensitivität und Spezifität der Verdünnungsversuche

Zur weiteren Auswertung der Validität der Verdünnungsreihe werden die Sensitivität, die Spezifität, der positive prädiktive Wert (PPW) und der negative prädiktive Wert (NPW) ermittelt. Die Sensitivität wird aus der Division des Anteils der richtig positiv getesteten Ergebnisse durch alle tatsächlich positiven Ergebnisse berechnet.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Richtig positiv getestete Ergebnisse}}{\text{Tatsächlich positive Ergebnisse}}$$

Dementsprechend ist die Spezifität der Quotient aus dem Anteil der richtig negativ getesteten Ergebnisse aus allen negativen Ergebnissen.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Richtig negativ getestete Ergebnisse}}{\text{Tatsächlich negative Ergebnisse}}$$

Zur Berechnung des positiven prädiktiven Wertes werden die richtig positiv getesteten Ergebnisse durch die Summe der richtig positiv und falsch positiv getesteten Ergebnisse geteilt.

$$\text{PPW} = \frac{\text{Richtig positiv getestete Ergebnisse}}{\text{Richtig positiv getestete Ergebnisse} + \text{falsch positiv getestete Ergebnisse}}$$

Der negative prädiktive Wert ist das Resultat aus der Division der richtig negativen Ergebnisse durch die Summe der richtig negativ und falsch negativ getesteten Ergebnisse.

$$\text{NPW} = \frac{\text{Richtig negativ getestete Ergebnisse}}{\text{Richtig negativ getestete Ergebnisse} + \text{falsch negativ getestete Ergebnisse}}$$

Als negativ werden die Ergebnisse bei einem normalisierten MFI-Wert von unter 1000 gewertet, als positiv bei einem MFI-Wert von größer oder gleich 1000. Die Kontrolle besteht aus der Luminex-Testung der Seren mit den unverdünnten Beads des ersten Test-Tages. Die Validierung der Verdünnungsreihe mit den entsprechenden Sensitivitäten, Spezifitäten, positiven und negativen prädiktiven Werten ist in Tabelle 3 zu sehen.

Es zeigt sich ab einer Verdünnungsstufe von 1 zu 10 eine Abnahme der Sensitivität, der Spezifität, des positiven prädiktiven Wertes und des negativen prädiktiven Wertes. Mit Ausnahme der Sensitivität in der 1 zu 10-Verdünnung gibt es keine großen Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisse der Validierung zwischen der HLA-Klasse I und der HLA-Klasse II.

Zur Vergleichskontrolle werden diese Gütemerkmale ebenfalls zwischen den Ergebnissen der unverdünnten Testdurchführungen der drei verschiedenen Testtage ermittelt. Hierbei ergeben sich eine Sensitivität von 0,99, eine Spezifität von 0,94, ein positiver prädiktiver Wert von 0,92 und ein negativer prädiktiver Wert von 0,99.

Verdünnung		Sensitivität	Spezifität	PPW	NPW
<b>1:2</b>	<b>HLA-Klasse I</b>	0,95	0,96	0,95	0,96
	<b>HLA-Klasse II</b>	0,96	0,96	0,95	0,97
	<b>Gesamt</b>	0,95	0,96	0,95	0,96
<b>1:4</b>	<b>HLA-Klasse I</b>	0,96	0,96	0,95	0,97
	<b>HLA-Klasse II</b>	0,97	0,97	0,97	0,98
	<b>Gesamt</b>	0,96	0,97	0,96	0,97
<b>1:8</b>	<b>HLA-Klasse I</b>	0,95	0,95	0,94	0,96
	<b>HLA-Klasse II</b>	0,95	0,95	0,93	0,96
	<b>Gesamt</b>	0,95	0,95	0,94	0,96
<b>1:10</b>	<b>HLA-Klasse I</b>	0,95	0,95	0,94	0,96
	<b>HLA-Klasse II</b>	0,87	0,93	0,93	0,96
	<b>Gesamt</b>	0,92	0,94	0,93	0,96
<b>1:16</b>	<b>HLA-Klasse I</b>	0,87	0,93	0,93	0,94
	<b>HLA-Klasse II</b>	0,85	0,93	0,94	0,96
	<b>Gesamt</b>	0,86	0,93	0,94	0,95

Tabelle 3: Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert der einzelnen Verdünnungsstufen unterteilt in HLA-Klasse I und II sowie deren Zusammenfassung.

### 3.2 Patienten- und Transplantateigenschaften

Die Untersuchung erfolgt an insgesamt 197 Patienten mit einem mittleren Beobachtungszeitraum von  $52,01 \pm 29,26$  Monaten. Die Transplantation wurde in dem Zeitraum von 1997 bis 2010 am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt. Es wurden 171 reine Nierentransplantationen vollzogen sowie 23 kombinierte Pankreas-Nieren-Transplantationen als auch drei kombinierte Leber-Nieren-Transplantationen. Die Eigenschaften dieser Patienten und deren Transplantate kann der Tabelle 4 entnommen werden.

Die Ursachen für die terminale Niereninsuffizienz sind Glomerulonephritis (36%), diabetische Nephropathie (15%), polyzystische Nierenerkrankungen (15%), interstitielle Nephritis (7%), Lupus-erythematodes-Nephropathie (2%), vesikorenaler Reflux (2%) und andere (23%) wie beispielsweise hypertensive Nephropathien. Sowohl das mittlere Empfänger- als auch das mittlere Spenderalter betragen ca. 51 Jahre. Das Geschlecht der Spender ist ausgeglichen, wohingegen mehr Männer (121) als Frauen

(76) ein Transplantat erhielten. Ihr erstes Transplantat erhielten 160 Empfänger, retransplantiert wurden 37 Patienten. Einen positiven Zytomegalievirus-Titer haben 104 Empfänger und 94 Spender. Eine Abweichung des Zytomegalievirus-Titers zwischen Empfänger und Spender liegt bei 93 Transplantationen vor. Die Anzahl der Mismatches beträgt im Mittel drei, kein Mismatch liegt bei 29 Patienten vor, zwölf Transplantationen erfolgten mit sechs Mismatches.

Es wurden deutlich mehr Leichenspenden (173) als Lebendspenden (24) durchgeführt. Die kalte Ischämiezeit liegt im Mittel bei ca. 13 Stunden, die warme Ischämiezeit bei ca. 50 Minuten. Bei 69 Patienten nahm das Transplantat verspätet seine Funktion auf. Abstoßungen traten bei 52 Patienten auf, ein Transplantatverlust erfolgte bei 28 Empfängern.

<b>Allgemeine Charakteristika</b>	<b>Insgesamt n=197</b>
<b>Empfängeralter [Jahre; Mittelwert ± Standardabweichung]</b>	51,18 ± 14,02
<b>Männliche Empfänger [Anzahl]</b>	121
<b>Weibliche Empfänger [Anzahl]</b>	76
<b>Ersttransplantation [Anzahl]</b>	160
<b>Retransplantation [Anzahl]</b>	37
<b>Empfänger CMV positiv [Anzahl] n=160</b>	104
<b>Spender CMV positiv [Anzahl] n=169</b>	94
<b>Empfänger CMV negativ und Spender CMV positiv [Anzahl]</b>	42
<b>Empfänger CMV positiv und Spender CMV negativ [Anzahl]</b>	51
<b>0 Mismatch n=191</b>	29
<b>6 Mismatch n=191</b>	12
<b>Mismatch [Mittelwert] n=186</b>	2,91
<b>Spenderalter [Mittelwert ± Standardabweichung]</b>	51,53 ± 16,00
<b>Leichenspender [Anzahl]</b>	173
<b>Lebendspender [Anzahl]</b>	24
<b>Weibliche Spender [Anzahl]</b>	99
<b>Männliche Spender [Anzahl]</b>	98
<b>Kalte Ischämiezeit [Minuten, Mittelwert ± Standardabweichung]</b>	754,2 ± 260,0 (n=174)
<b>Warme Ischämiezeit [Minuten, Mittelwert ± Standardabweichung]</b>	50,01 ± 34,17 (n=178)
<b>Verspätete Transplantatfunktion [Anzahl] n=187</b>	69
<b>Transplantatverlust [Anzahl]</b>	28
<b>Abstoßungen [Anzahl]</b>	52

Tabelle 4: Allgemeine Charakteristika der Transplantatempfänger und -spender sowie des Transplantates.

### 3.3 Patienten- und Transplantateigenschaften in Abhängigkeit vom Antikörperstatus im Luminex

Die Patienten- und Transplantateigenschaften abhängig vom Antikörperstatus finden sich in Tabelle 5.

Ein positiver Antikörperstatus wird durch ein Vorhandensein von HLA-Klasse-I- und/oder HLA-Klasse-II-Antikörpern definiert, die mit der LABScreen Single Antigen-Technik von Luminex einen MFI-Wert von größer oder gleich 1000 aufweisen. Dieser Antikörperstatus wurde mit Seren ermittelt, die vor der Transplantation gewonnen worden sind. Die Signifikanz der Unterschiede wird mit dem Mann-Whitney-U-Test oder dem Chi<sup>2</sup>-Test berechnet. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Empfänger- und Spenderalter, dem Geschlecht der Spender und Empfänger, Leichen- und Lebendspenden, kalter und warmer Ischämiezeit und der Abstoßungshäufigkeit. Bei Retransplantationen weisen die Patienten signifikant häufiger HLA-spezifische Antikörper auf als bei Ersttransplantationen (95% vs. 47%,  $p < 0,0001$ ). Bei Empfängern mit positivem Zytomegalievirus-Status können häufiger HLA-spezifische Antikörper detektiert werden als bei Zytomegalievirus-negativen Empfängern (41% vs. 24%,  $p = 0,023$ ). Der Zytomegalievirus-Status der Spender und ein abweichender Zytomegalievirus-Status zwischen Empfänger und Spender ergeben keine signifikanten Unterschiede. Bei Transplantationen mit sechs Mismatches weisen die Empfänger signifikant seltener HLA-spezifische Antikörper auf (75% vs. 25%,  $p = 0,026$ ). Ein leichter Trend zu einer häufigeren Abstoßungsrate kann bei HLA-Antikörperpositiven Patienten verzeichnet werden (65% vs. 35%,  $p = 0,11$ ). Außerdem zeigt sich ein Trend zu einer häufiger verspäteten Aufnahme der Transplantatfunktion bei positivem Antikörperstatus (64% vs. 36%,  $p = 0,077$ ). Signifikant mehr HLA-Antikörperpositive Empfänger erlitten einen Verlust des Transplantats im Vergleich zu HLA-Antikörpernegativen Patienten (79% vs. 21%,  $p = 0,009$ ).

Antikörperstatus-abhängige Charakteristika	HLA AK pos n=110	HLA AK neg n=87	P-Wert
Empfängeralter [Jahre; Mittelwert ± Standardabweichung]	50,94±13,07	51,48±15,53	0,74 <sup>(a)</sup>
Männliche Empfänger [Anzahl]	65	56	0,45 <sup>(b)</sup>
Weibliche Empfänger [Anzahl]	45	31	
Ersttransplantation [Anzahl]	75	85	<0,0001 <sup>(b)</sup>
Retransplantation [Anzahl]	35	2	
Empfänger CMV positiv [Anzahl] n=160	66	38	0,023 <sup>(b)</sup>
Spender CMV positiv [Anzahl] n=169	54	40	0,66 <sup>(b)</sup>
Empfänger CMV negativ und Spender CMV positiv [Anzahl]	22	20	0,73 <sup>(b)</sup>
Empfänger CMV positiv und Spender CMV negativ [Anzahl]	34	18	0,27 <sup>(b)</sup>
0 Mismatch [Anzahl] n=191	15	14	0,63 <sup>(b)</sup>
6 Mismatch [Anzahl] n=191	3	9	0,026 <sup>(b)</sup>
Mismatch [Mittelwert] n=186	2,72±0,16	3,15±0,21	0,072 <sup>(a)</sup>
Spenderalter [Mittelwert ± Standardabweichung]	51,58±13,94	51,47±18,97	0,67 <sup>(a)</sup>
Leichenspender [Anzahl]	96	77	0,79 <sup>(b)</sup>
Lebendspender [Anzahl]	14	10	
Weibliche Spender [Anzahl]	54	45	0,71 <sup>(b)</sup>
Männliche Spender [Anzahl]	56	42	
Kalte Ischämiezeit [Minuten, Mittelwert ± Standardabweichung]	773,8±355,0 (n=100)	727,6±379,5 (n=74)	0,21 <sup>(a)</sup>
Warme Ischämiezeit [Minuten, Mittelwert ± Standardabweichung]	50,41±37,76 (n=100)	49,51±34,53 (n=78)	0,66 <sup>(a)</sup>
Verspätete Transplantatfunktion [Anzahl] n=187	44 (n=103)	25 (n=83)	0,077 <sup>(b)</sup>
Transplantatverlust [Anzahl]	22	6	0,009 <sup>(b)</sup>
Abstoßungen [Anzahl]	34	18	0,11 <sup>(b)</sup>

Mann-Whitney-U-Test <sup>(a)</sup>

Chi<sup>2</sup>-Test <sup>(b)</sup>

Tabelle 5: Charakteristika der Transplantatempfänger und -spender sowie des Transplantates abhängig vom Antikörperstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Immunstatus berechnet mit Mann-Whitney-U-Test bzw. Chi<sup>2</sup>-Test.

### 3.4 Transplantatüberleben

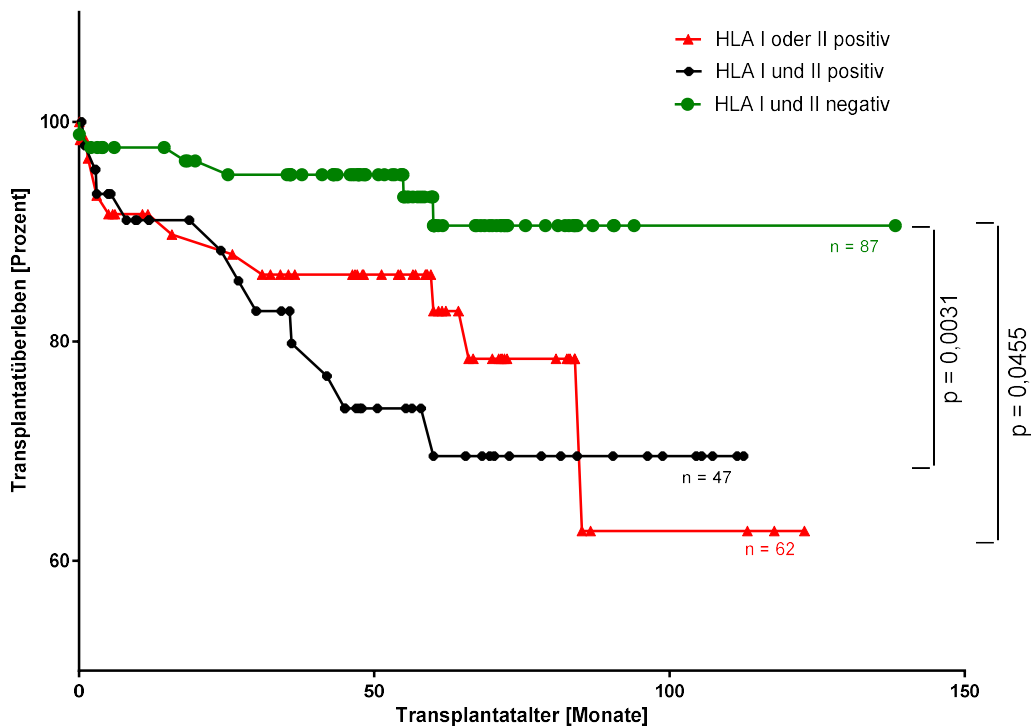
#### 3.4.1 Transplantatüberleben in Abhängigkeit der im Luminex nachgewiesenen Antikörper

Die Auswertung des Transplantatüberlebens erfolgt mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven. Der Verlust des Transplantats wird durch die dauerhafte Notwendigkeit der Rückkehr zur Dialyse oder durch die Notwendigkeit einer Retransplantation definiert. Zur Einteilung des Immunisierungsstatus als positiv oder negativ wird der MFI-Wert verwendet, der mit der LabScreen Single Antigen-Technik des Luminex ermittelt wurde. Es werden vier unterschiedliche Grenzen für positive Testergebnisse gesetzt:  $\geq 1000$ ,  $\geq 2000$ ,  $\geq 3000$  und  $\geq 4000$ . Die Signifikanz der Unterschiede der einzelnen Überlebenskurven wird mit dem Logrank-Test und einem Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  berechnet.

Die Einteilung der Patientengruppen anhand des Immunstatus erfolgt in HLA-Klasse I und HLA-Klasse II negativ, in HLA-Klasse I oder II positiv und in HLA-Klasse I und II positiv. In der Graphik 4 ist das Transplantatüberleben bei der Einordnung des Immunstatus als positiv ab einem MFI-Wert größer oder gleich 1000 zu sehen. Hier zeigt sich ein signifikant besseres Transplantatüberleben bei der Gruppe mit fehlender Immunisierung (90,6% nach 138 Monaten) im Vergleich zur Gruppe mit HLA-Klasse-I- oder -II-Antikörpern (67,7% nach 123 Monaten,  $p$ -Wert = 0,0455) und im Vergleich zur Gruppe mit HLA-Klasse-I- und -II-Antikörpern (69,6% nach 113 Monaten,  $p$ -Wert = 0,0031).



### Transplantatüberleben abhängig von Luminex MFI > 1000

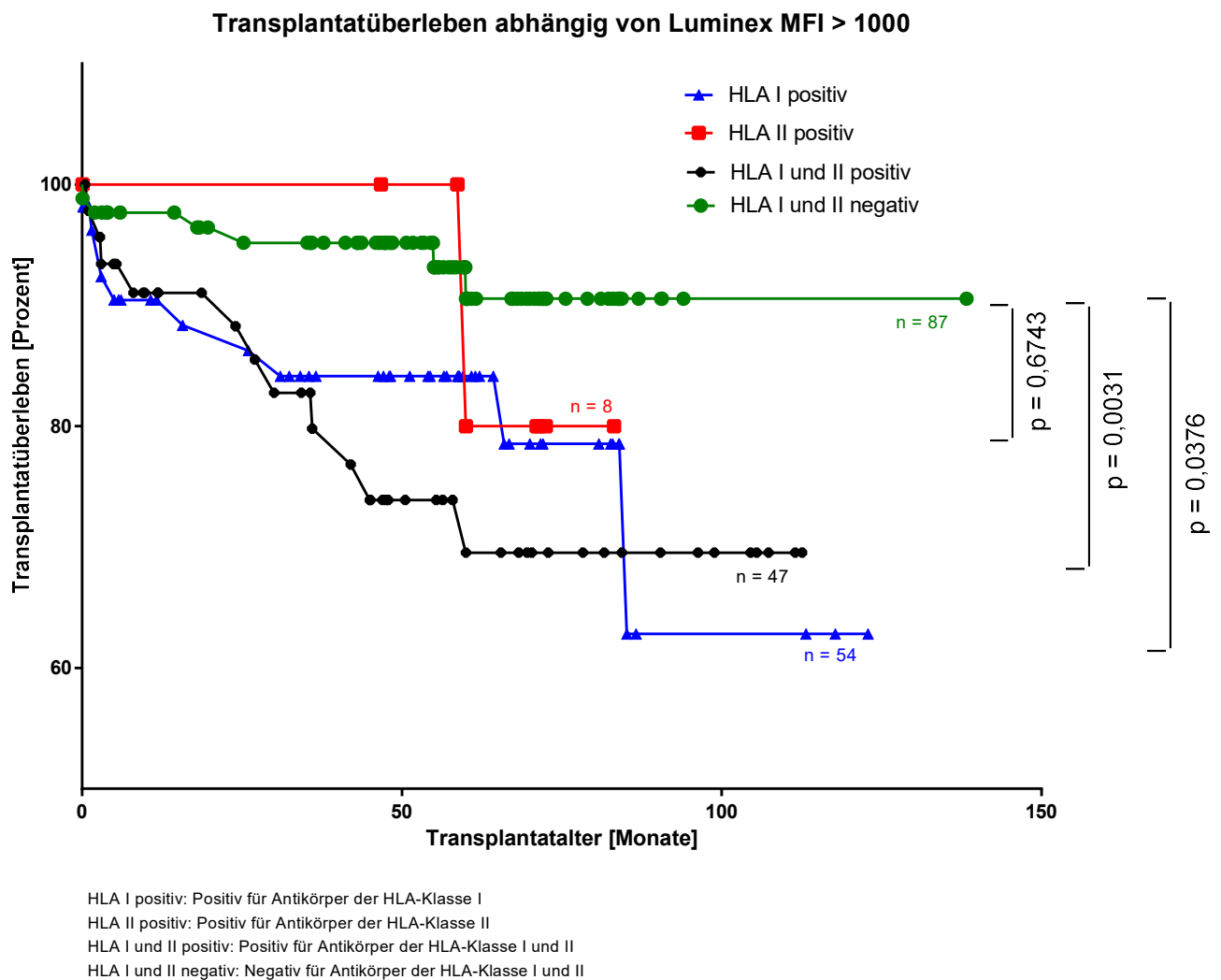


HLA I oder II positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse I oder HLA-Klasse II  
 HLA I und II positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse I und II  
 HLA I und II negativ: Negativ für Antikörper der HLA-Klasse I und II

**Graphik 4: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus (HLA-Klassen I und II kombiniert) mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

Bei der Einteilung des Immunstatus als positiv ab einem MFI-Wert von größer oder gleich 2000 ist ein signifikant besseres Transplantatüberleben bei fehlender Immunisierung zu erkennen (87,4% nach 138 Monaten) als bei einem Antikörperstatus mit HLA-Klasse-I- und -II-Antikörpern (68,8% nach 113 Monaten, p-Wert = 0,0411). Der Unterschied ist beim Vergleich zur Gruppe mit HLA-Klasse-I- oder -II-Positivität nicht mehr signifikant (57,6% nach 123 Monaten, p-Wert = 0,2724). Die Einordnung in eine immunisierte Patientengruppe ab einem MFI-Wert größer oder gleich 3000 und ab einem MFI-Wert von größer oder gleich 4000 ergibt ebenfalls ein besseres Transplantatüberleben bei der nichtimmunisierten Patientengruppe, jedoch waren diese Unterschiede nicht mehr signifikant (MFI  $\geq$  3000: p-Wert = 0,0765 bei HLA-Klasse I oder II positiv und p-Wert = 0,1198 bei HLA-Klasse I und II positiv; MFI  $\geq$  4000: p-Wert = 0,2419 bei HLA-Klasse I oder II positiv und p-Wert = 0,2164 bei HLA-Klasse I und II positiv).

Bei einer weiteren Unterteilung des Immunisierungsstatus nach den HLA-Klassen zeigt sich bei einer Obergrenze für Negativität bei einem MFI-Wert von unter 1000, wie in Graphik 5 ersichtlich, ein signifikant besseres Überleben der Nichtimmunisierten (90,6% nach 138 Monaten) gegenüber den ausschließlich HLA-Klasse-I-positiven Patienten (62,8% nach 138 Monaten, p-Wert = 0,0376). Für die ausschließlich HLA-Klasse-II-positive Patientengruppe ist der Unterschied nicht signifikant (80,0% nach 83 Monaten, p-Wert = 0,6743).

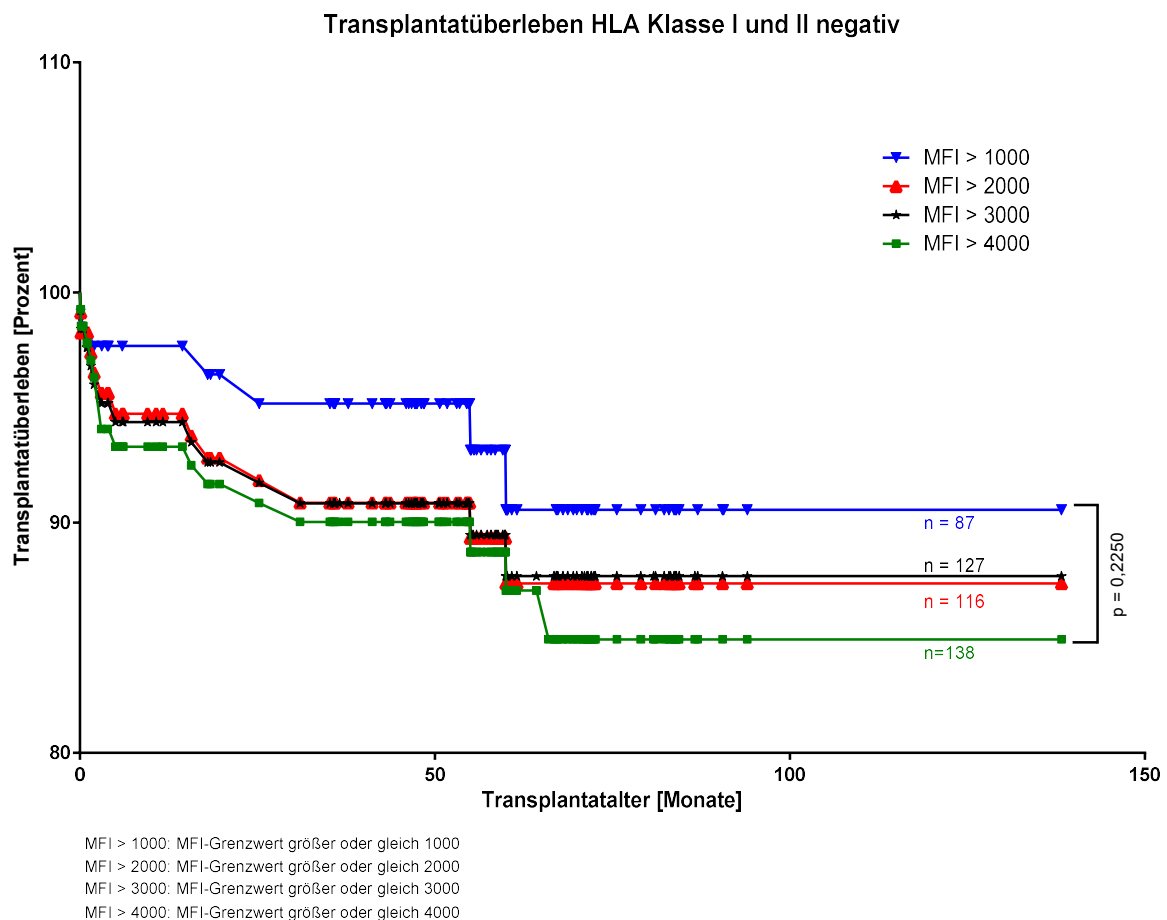


**Graphik 5: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

Bei den Obergrenzen für einen positiven MFI-Wert ab 2000 ist das Transplantatüberleben bei der Antikörper-negativen Patientengruppe signifikant besser als bei den HLA-Klasse-II-positiven Patienten (MFI  $\geq$  2000: p-Wert = 0,0050; MFI  $\geq$  3000: p-Wert = 0,0061; MFI  $\geq$  4000: p-Wert = 0,0482). Dieser Unterschied ist für die

ausschließlich HLA-Klasse-I-positive Patientengruppe nicht signifikant (MFI  $\geq$  2000: p-Wert = 0,7866; MFI  $\geq$  3000: p-Wert = 0,2194; MFI  $\geq$  4000: p-Wert = 0,6040).

Graphik 6 präsentiert Transplantatüberlebenskurven von nichtimmunisierten Patienten mit unterschiedlichen Grenzwerten für die Bestimmung des Immunstatus. Hierbei fällt auf, dass das Transplantatüberleben bei einem MFI-Grenzwert von 1000 am höchsten ist (90,6% nach 138 Monaten) und dementsprechend mit Heraufsetzung des Grenzwertes abnimmt. Diese Tendenz ist jedoch nicht signifikant (MFI  $\geq$  4000: 84,9% nach 138 Monaten; p-Wert = 0,2250).



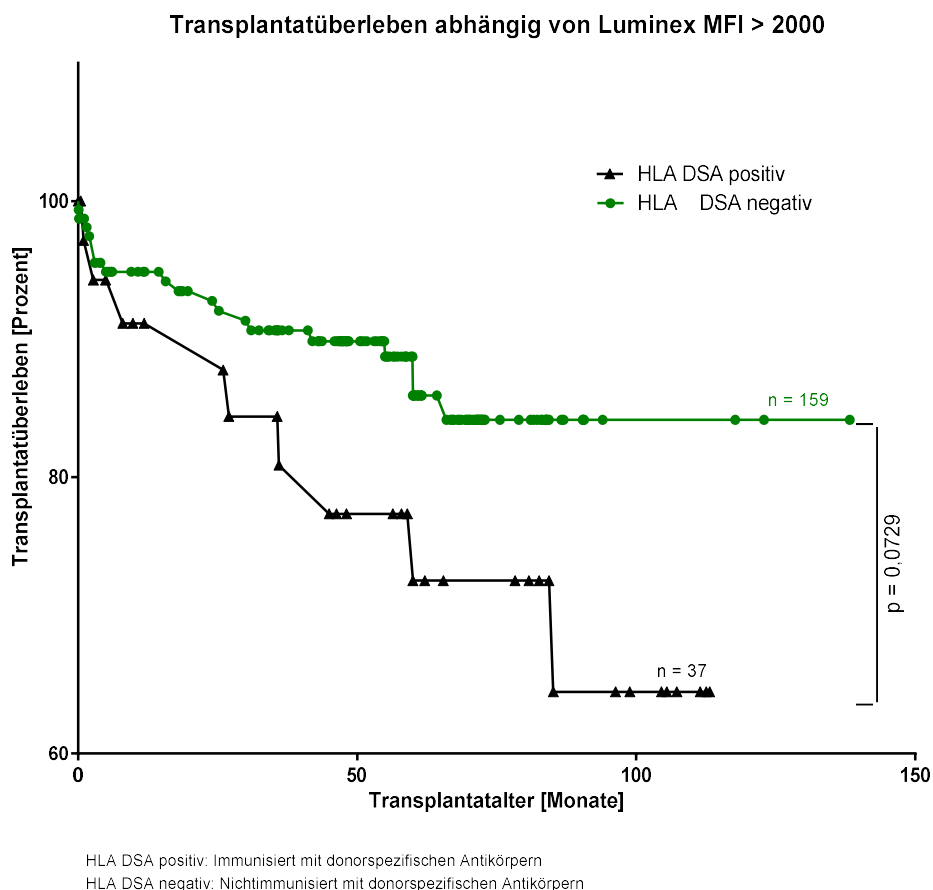
**Graphik 6: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten der nicht im Luminex immunisierten Patienten abhängig vom MFI-Grenzwert. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

### 3.4.2 Transplantatüberleben in Abhängigkeit von donorspezifischen Antikörpern im Luminex

Das Transplantatüberleben wird zusätzlich hinsichtlich des Vorhandenseins von donorspezifischen Antikörpern analysiert. Als donorspezifisch werden diejenigen Antikörper bezeichnet, die gegen die HLA-Merkmale des Spenders gerichtet sind. Die

Detektion der Antikörper erfolgte mit der LabScreen Single Antigen-Technik des Luminex.

Empfänger ohne donorspezifische Antikörper weisen ein höheres Transplantatüberleben auf (MFI  $\geq 1000$ : 84,0% nach 138 Monaten; MFI  $\geq 2000$ : 84,2% nach 138 Monaten; MFI  $\geq 3000$ : 76,0% nach 138 Monaten; MFI  $\geq 4000$ : 75,1% nach 138 Monaten), als Empfänger mit donorspezifischen Antikörpern (MFI  $\geq 1000$ : 67,3% nach 113 Monaten; MFI  $\geq 2000$ : 64,5% nach 113 Monaten; MFI  $\geq 3000$ : 73,5% nach 113 Monaten; MFI  $\geq 4000$ : 79,3% nach 113 Monaten). Dies ist beispielsweise in der Graphik 7 zu sehen, die das Transplantatüberleben abhängig von dem Vorhandensein donorspezifischer Antikörper ab einem MFI-Grenzwert von 2000 zeigt. Dieser Unterschied ist jedoch in allen vier Grenzwerteinteilungen nicht signifikant (MFI  $\geq 1000$ : p-Wert = 0,1649; MFI  $\geq 2000$ : p-Wert = 0,0729; MFI  $\geq 3000$ : p-Wert = 0,3946; MFI  $\geq 4000$ : p-Wert = 0,9916).



**Graphik 7: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom Vorhandensein donorspezifischer Antikörper im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000. Signifikanz des Unterschiedes bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

Tabelle 6 zeigt den Anteil immunisierter (37 Patienten, 18,9%) und nichtimmunisierter (159 Patienten, 81,1%) Patienten mit donorspezifischen Antikörpern, die einen Transplantatverlust erlitten haben, im Vergleich zu Patienten, die ein funktionsfähiges Transplantat besitzen. Dabei ist ersichtlich, dass Patienten, die ihr Transplantat verloren haben, häufiger donorspezifische Antikörper aufweisen. Der Unterschied ist am größten bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000 (Chi<sup>2</sup>-Test: p-Wert = 0,0663), jedoch sind die Unterschiede weder beim MFI-Grenzwert von 2000 noch bei den anderen Grenzwerten signifikant.

	<b>TX-Verlust (28)</b>	<b>Kein TX-Verlust (169)</b>	<b>P-Wert</b>
<b>DSA positiv (MFI≥1000)</b>	10 (36%)	39 (23%)	0,16
<b>DSA negativ (MFI≥1000)</b>	18 (64%)	130 (77%)	
<b>DSA positiv (MFI≥2000)</b>	9 (32%)	28 (17%)	0,0663
<b>DSA negativ (MFI≥2000)</b>	19 (68%)	141 (83%)	
<b>DSA positiv (MFI≥3000)</b>	8 (29%)	24 (14%)	0,0917
<b>DSA negativ (MFI≥3000)</b>	20 (71%)	145 (86%)	
<b>DSA positiv (MFI≥4000)</b>	4 (14%)	22 (13%)	0,77
<b>DSA negativ (MFI≥4000)</b>	24 (86%)	147 (87%)	

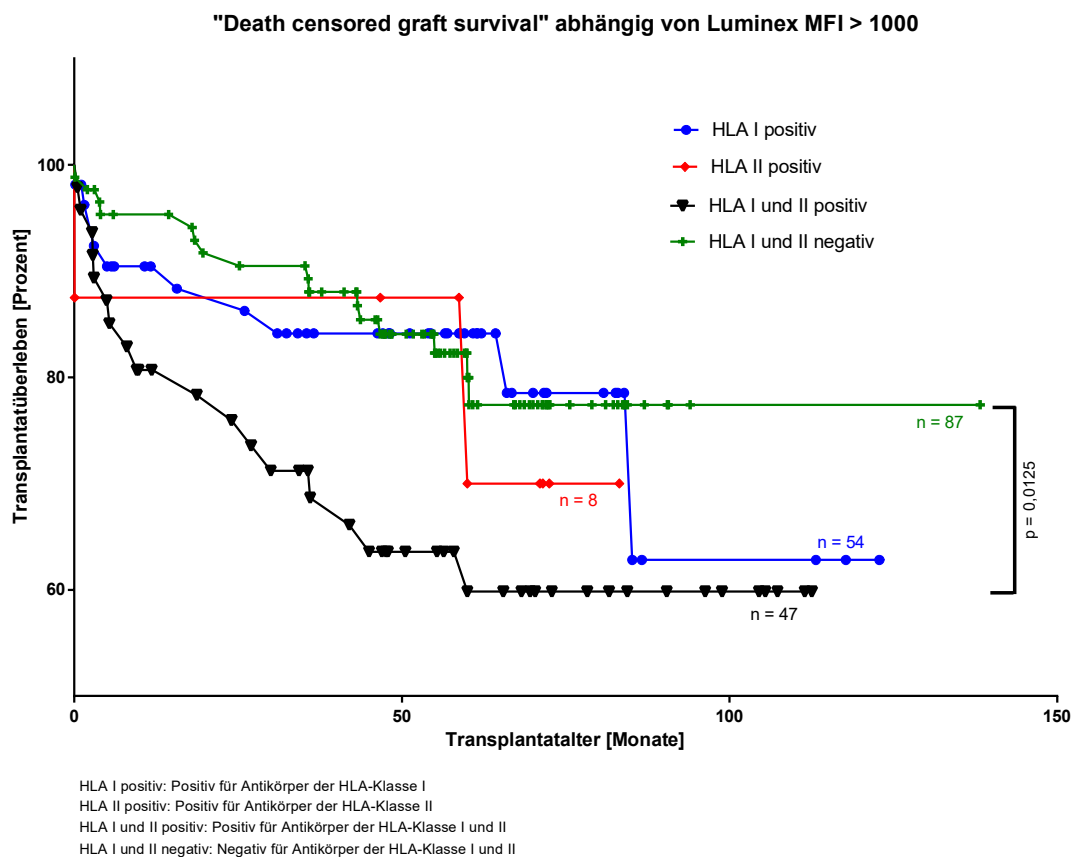
Tabelle 6: Vorhandensein donorspezifischer Antikörper im Luminex mit vier unterschiedlichen MFI-Grenzwerten in Abhängigkeit von einem Transplantatverlust. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich Verlust oder kein Verlust des Transplantats berechnet mit Chi<sup>2</sup>-Test.

### 3.4.3 „Death censored graft survival“ in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Luminex

Zur weiteren Auswertung wurde das sogenannte „death censored graft survival“ beleuchtet. Dies definiert den Endpunkt eines funktionsfähigen Transplantats als Notwendigkeit der dauerhaften Rückkehr zur Dialyse oder einer Retransplantation, aber auch als Tod des Empfängers mit noch funktionierendem Transplantat.

Dieses „death censored graft survival“ wird in Abhängigkeit zu dem Immunisierungsstatus gesetzt, der mit der LabScreen Single Antigen-Technik des Luminex mithilfe unterschiedlicher MFI-Grenzwerte bestimmt wurde. Hierbei zeigt sich

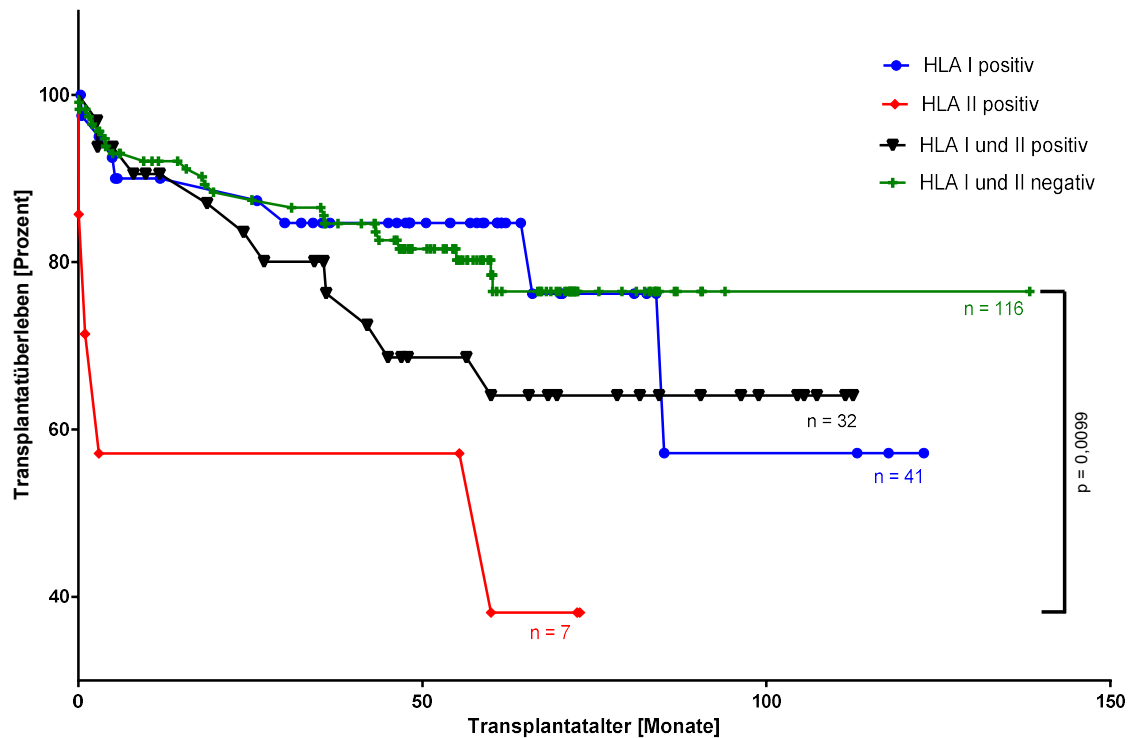
unabhängig von allen MFI-Grenzwerten, dass Patienten ohne Immunisierung das beste „death censored graft survival“ besitzen (MFI  $\geq 1000$ : 77,4% nach 138 Monaten; MFI  $\geq 2000$ : 76,5% nach 138 Monaten; MFI  $\geq 3000$ : 77,1% nach 138 Monaten; MFI  $\geq 4000$ : 74,4% nach 138 Monaten). Im Vergleich hierzu weist bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 die Gruppe der Empfänger, die Antikörper gegen die HLA-Klasse I und II haben, das schlechteste „death censored graft survival“ auf (59,8% nach 113 Monaten), das anhand des Logrank-Tests (p-Wert = 0,0125) signifikant ist. Dies ist in der Graphik 8 ersichtlich.



**Graphik 8:** „Death censored graft survival“ in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.

Ab einem MFI-Grenzwert von 2000 oder mehr ergibt sich, wie auszugsweise bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000 in Graphik 9 abgebildet, in der Kohorte mit vorhandenen HLA-Klasse-II-Antikörpern das niedrigste „death censored graft survival“, welches ebenfalls signifikant ist (MFI  $\geq 2000$ : 38,1% nach 73 Monaten, p-Wert = 0,0099; MFI  $\geq 3000$ : 25% nach 73 Monaten, p-Wert = 0,0026; MFI  $\geq 4000$ : 25% nach 73 Monaten, p-Wert = 0,0251).

"Death censored graft survival" abhängig von Luminex MFI > 2000



HLA I positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse I  
 HLA II positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse II  
 HLA I und II positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse I und II  
 HLA I und II negativ: Negativ für Antikörper der HLA-Klasse I und II

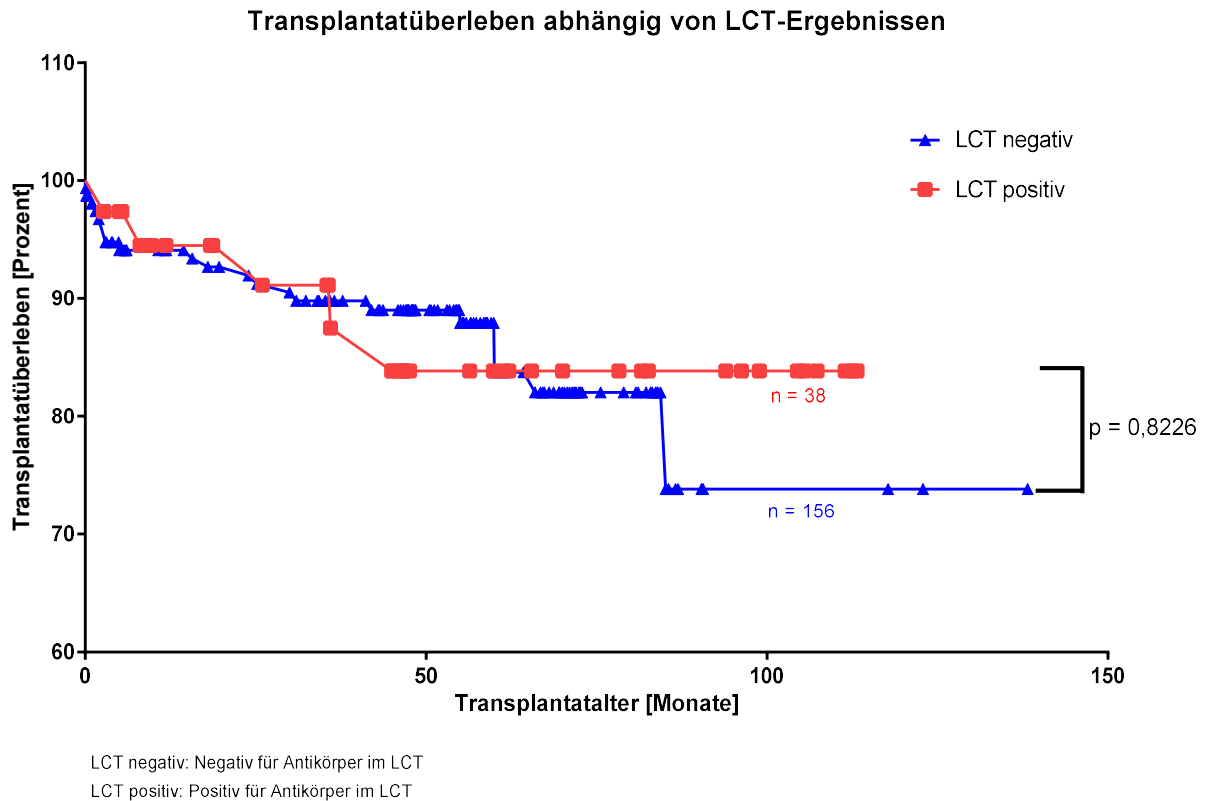
**Graphik 9: „Death censored graft survival“ in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

### 3.4.4 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Vergleich LCT, ELISA und Luminex

#### 3.4.4.1 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im LCT

Eine Testung mit dem LCT von 194 Patientenseren vor der Transplantation hat bei 38 Patienten (19,6%) einen positiven Antikörperstatus ergeben, von denen fünf Patienten (13,2%) ihr Transplant verloren haben. Im Vergleich hierzu mussten 22 Patienten (14,1%) der nichtimmunisierten Gruppe (n = 156) an die Dialyse zurückkehren. Ein positiver Antikörperstatus im LCT wird ab einem PRA-Wert von über 5% gewertet.

In der Graphik 10 sieht man das Transplantatüberleben abhängig vom Immunstatus, der im LCT getestet wurde. Es ergibt sich ein geringfügig besseres Transplantatüberleben bei der antikörperpositiven Patientengruppe (83,8% nach 113 Monaten im Vergleich zu 73,8% nach 138 Monaten), das aber nicht signifikant ist (p-Wert = 0,8226).



**Graphik 10: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im LCT gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5%. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

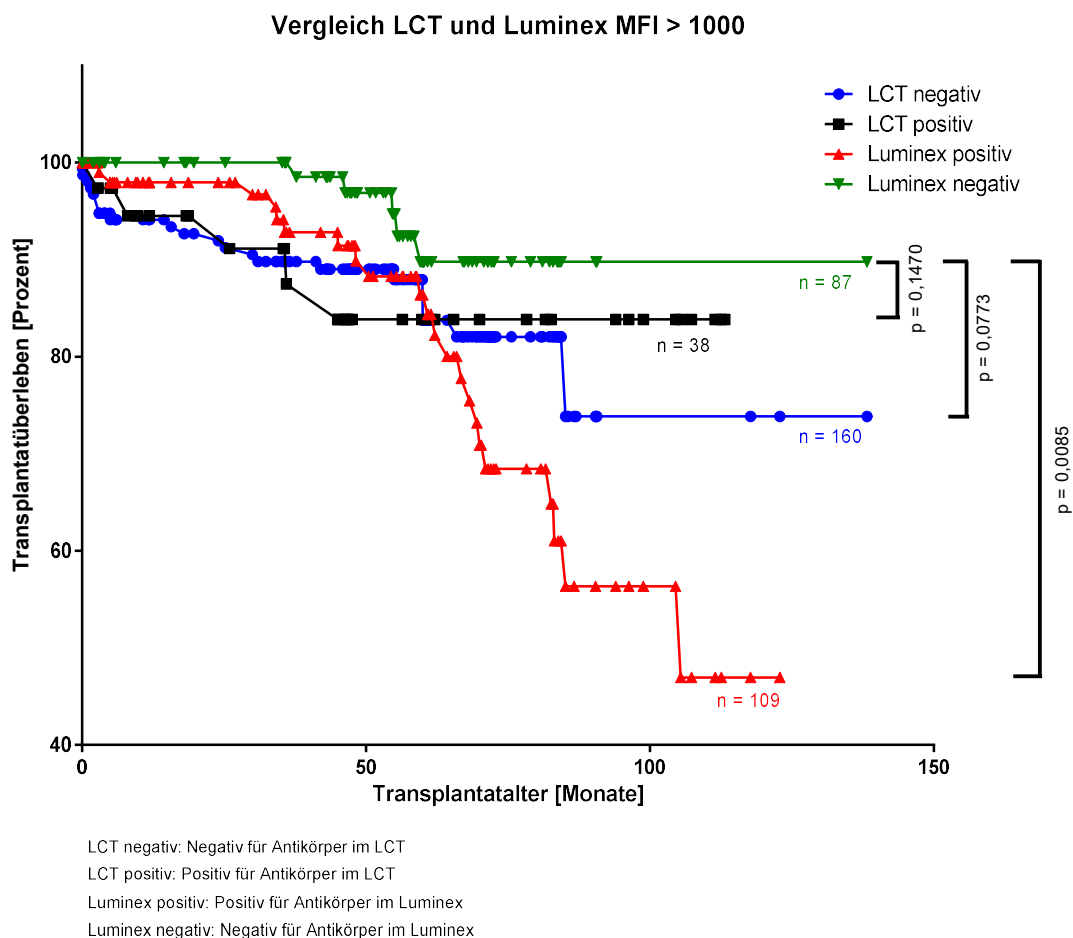
### 3.4.4.2 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im LCT im Vergleich zu Luminex

Ein Vergleich der Ergebnisse des Immunstatus bei Testung mittels LCT oder Luminex ergibt, dass von 156 im LCT negativ getesteten Patienten 89 Patienten (57,0%) auch im Luminex nicht immunisiert sind, jedoch 67 Patienten (43,0%) Antikörper im selbigen aufweisen. 38 Patienten haben einen positiven Immunstatus im LCT, hiervon zeigen auch 33 Patienten (86,8%) Antikörper im Luminex, bei fünf Patienten (13,2%) hingegen kann der Luminex keine Antikörper nachweisen.

In der Graphik 11 ist ein Vergleich des Transplantatüberlebens in Abhängigkeit vom Immunstatus zu sehen, der einmal mittels des LCT erfasst wurde und zum anderen mit der LabScreen Single Antigen-Technik des Luminex ermittelt wurde. Ein positiver Antikörpernachweis im Luminex wird durch das Vorhandensein von Antikörpern der HLA-Klasse I und/ oder II ab einem MFI-Wert von größer oder gleich 1000 gewertet. Eine Positivität im LCT ist ab einem PRA-Wert von über 5% definiert.



Die Patientengruppe, die im Luminex keine Antikörper aufweist, besitzt das beste Transplantatüberleben mit 89,8% nach 138 Monaten. Das Überleben ist gering besser im Vergleich zur Patientengruppe mit positivem (83,8% nach 113 Monaten, p-Wert = 0,1470) als auch negativem (73,8% nach 138 Monaten, p-Wert = 0,0773) Antikörperstatus im LCT, was jedoch nicht signifikant ist. Das schlechteste Transplantatüberleben weist die Gruppe mit positivem Immunstatus im Luminex auf (46,9% nach 123 Monaten, p-Wert = 0,0085 im Vergleich zu negativem Antikörpernachweis im Luminex).

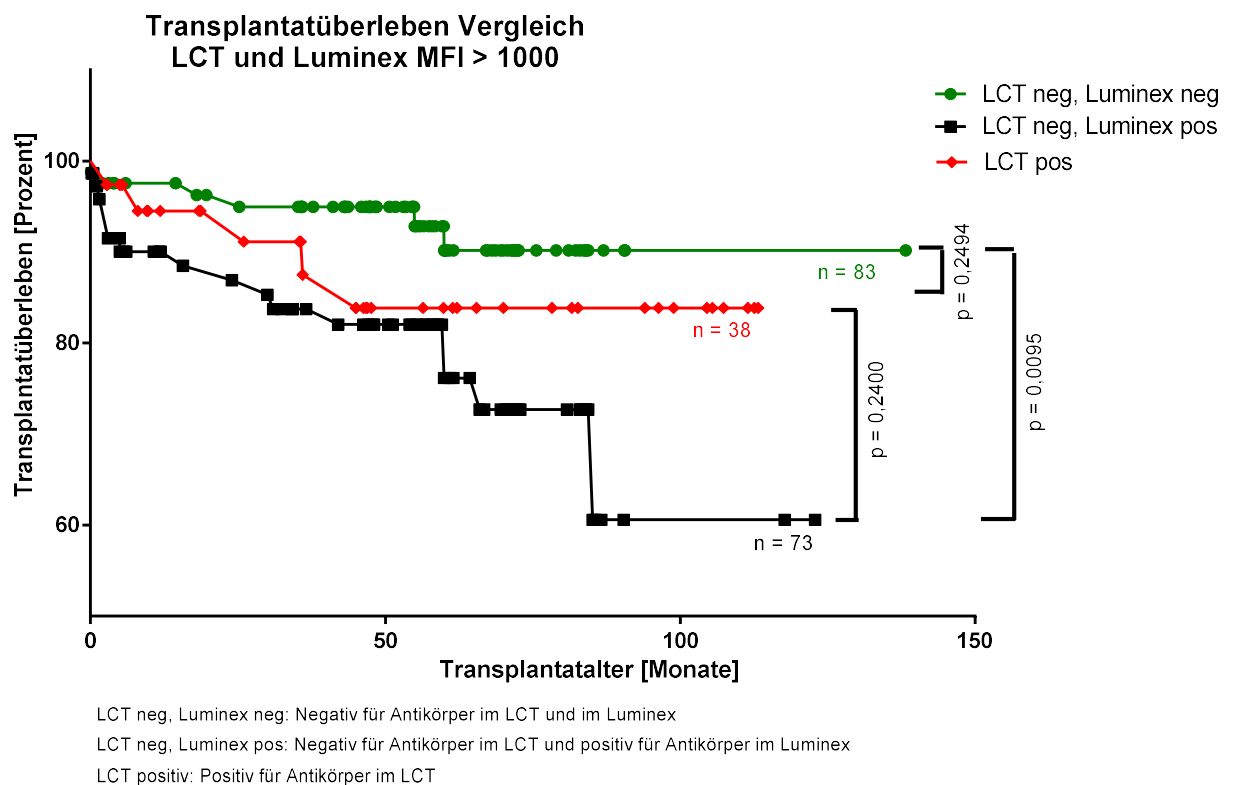


**Graphik 11: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im LCT gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

In der Graphik 12 wird die Patientengruppe, die keine Antikörper im LCT aufweist, unterteilt in eine Gruppe, die auch im Luminex nicht immunisiert ist und in eine Gruppe, die Antikörper bei der Luminex-Testung ergibt. Hier zeigt sich ein deutlich besseres Transplantatüberleben bei der Gruppe, die sowohl im LCT als auch im

Luminex keine Antikörper besitzt (90,2% nach 138 Monaten) im Vergleich zu der Gruppe, die einen positiven Immunstatus im Luminex hat (60,6% nach 123 Monaten, p-Wert = 0,0095).

Das Transplantatüberleben der Patientenkohorte mit positivem LCT-Ergebnis ist leicht geringer (83,8% nach 113 Monaten) als bei den im LCT und Luminex nicht immunisierten Patienten (p-Wert = 0,2494) und etwas besser als bei der Kohorte mit positivem Luminex-Antikörperstatus bei Negativität im LCT (p-Wert = 0,2400), deren Unterschiede jedoch nicht signifikant sind.



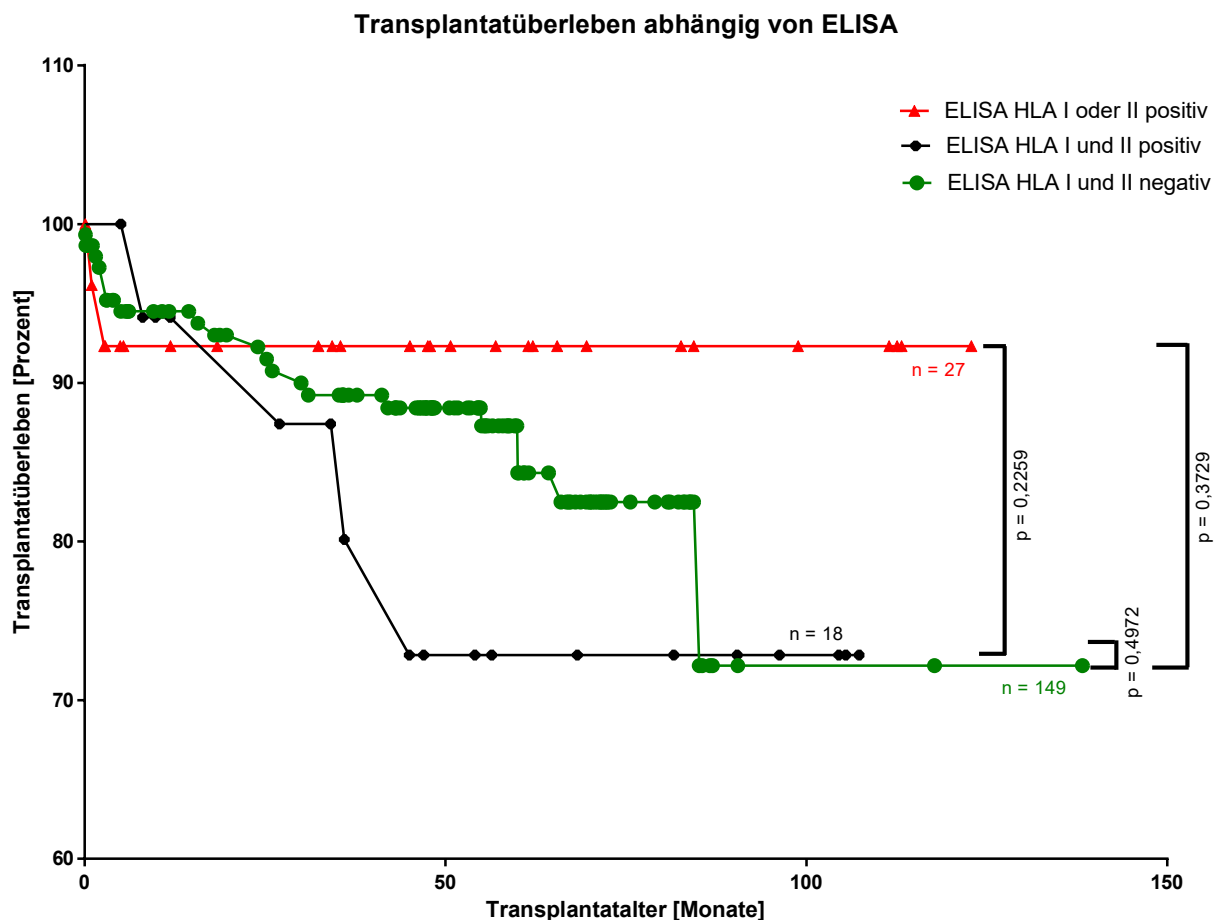
**Graphik 12:** Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im LCT gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 (LCT negativ und Luminex positiv kombiniert). Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.

#### 3.4.4.3 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörnernachweis im ELISA

Eine Testung von 194 Patientenseren mittels ELISA vor der bevorstehenden Transplantation ergab 149 Patienten (76,8%) ohne Immunisierung, 23 Patienten (11,9%), die Antikörper der HLA-Klasse I aufweisen, vier Patienten (2,1%) mit Antikörpern der HLA-Klasse II und 18 Patienten (9,3%), die sowohl Antikörper der HLA-

Klasse I als auch der HLA-Klasse II besitzen. Der Immunstatus wird als positiv bewertet ab einem PRA-Wert von über 5%.

Abhängig vom Immunstatus, der mit dem ELISA bestimmt wurde, zeigt Graphik 13 das Transplantatüberleben. Die Patientengruppe mit Antikörpern der HLA-Klasse I oder II besitzt das beste Transplantatüberleben (92,3% nach 123 Monaten) gegenüber der Patientenkohorte mit Antikörpern der HLA-Klasse I und II (72,8% nach 107 Monaten, p-Wert = 0,2259) und der Patientenkohorte ohne Immunisierung (72,2% nach 138 Monaten, p-Wert = 0,3729), deren Unterschiede jedoch nicht signifikant sind.



HLA I oder II positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse I oder HLA-Klasse II  
 HLA I und II positiv: Positiv für Antikörper der HLA-Klasse I und II  
 HLA I und II negativ: Negativ für Antikörper der HLA-Klasse I und II

**Graphik 13: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im ELISA gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5%. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

### 3.4.4.4 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im ELISA im Vergleich zu Luminex

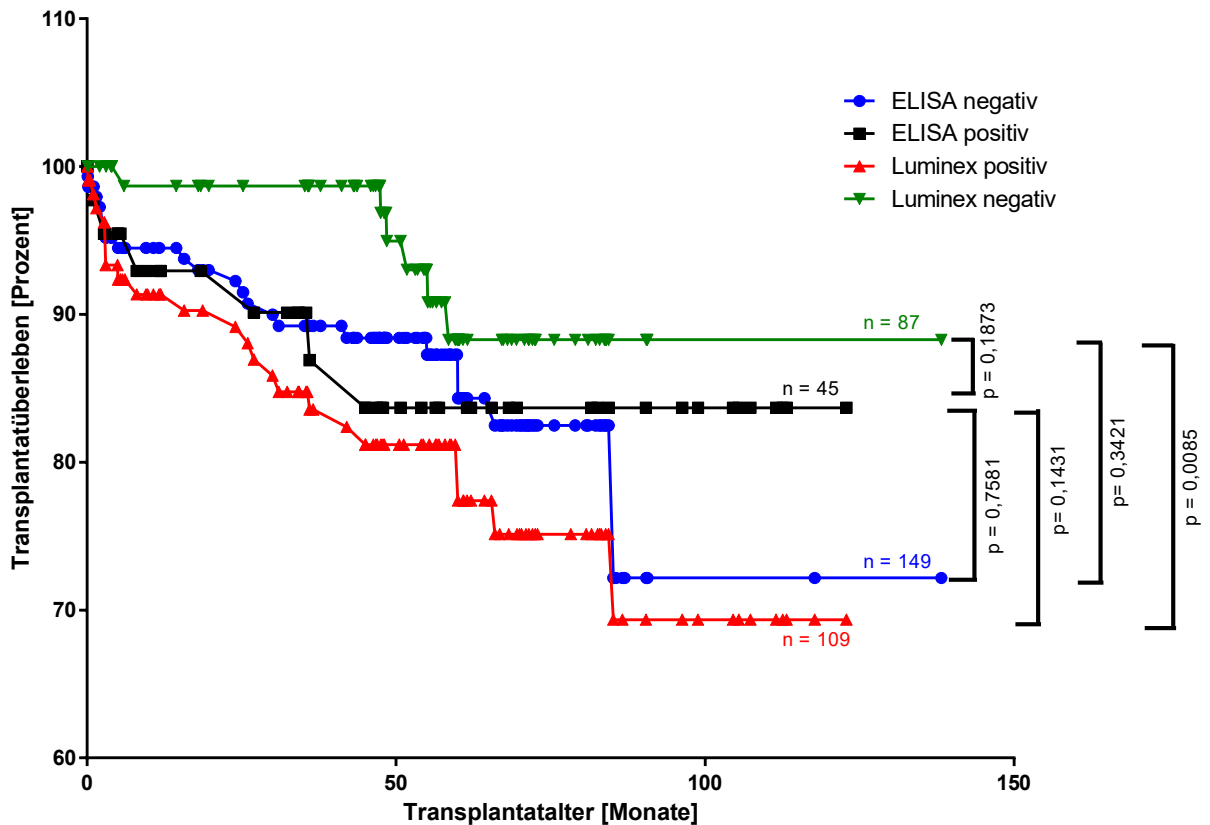
Der Anteil immunisierter und nichtimmunisierter Patienten in den beiden Testverfahren ELISA und Luminex wird in Tabelle 7 dargestellt. Ein positives Testergebnis des Luminex ist definiert durch das Vorhandensein von Antikörpern mit einem MFI-Wert von größer oder gleich 1000, ein positives Resultat im ELISA ab einem PRA-Wert von 5%.

<b>Vergleich ELISA und Luminex (MFI ≥ 1000)</b>		
<b>HLA Klasse I</b>	<b>Luminex positiv</b>	<b>Luminex negativ</b>
<b>ELISA positiv</b>	40 (20,5%)	2 (1,0%)
<b>ELISA negativ</b>	61 (31,3%)	92 (47,2%)
<b>HLA Klasse II</b>	<b>Luminex positiv</b>	<b>Luminex negativ</b>
<b>ELISA positiv</b>	20 (10,4%)	2 (1,0%)
<b>ELISA negativ</b>	33 (17,1%)	138 (71,5%)

Tabelle 7: Immunstatus (absolut und prozentual) unterteilt in HLA-Klasse I und HLA-Klasse II getestet im ELISA mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und getestet im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000.

In der Graphik 14 ist ein Vergleich des Transplantatüberlebens abhängig vom Immunisierungsstatus im ELISA und im Luminex zu sehen. Wie bereits oben erwähnt, besitzen die Patienten, die nicht im Luminex immunisiert sind, das beste Transplantatüberleben. Hingegen hat die Kohorte, die Antikörper im Luminex aufweist, das schlechteste Transplantatüberleben. Patienten, die im ELISA Antikörper aufweisen, haben ein schlechteres Transplantatüberleben (83,7% nach 123 Monaten) als nichtimmunisierte Patienten im Luminex (88,3% nach 138 Monaten, p-Wert = 0,1873). Nichtimmunisierte Empfänger im ELISA besitzen ein nicht signifikant schlechteres Transplantatüberleben (72,2% nach 138 Monaten) als immunisierte Empfänger im ELISA (83,7% nach 123 Monate, p-Wert = 0,7581), jedoch ein besseres als antikörperpositive Patienten im Luminex (69,4% nach 123 Monaten, p-Wert = 0,2141).

### Vergleich ELISA und Luminex

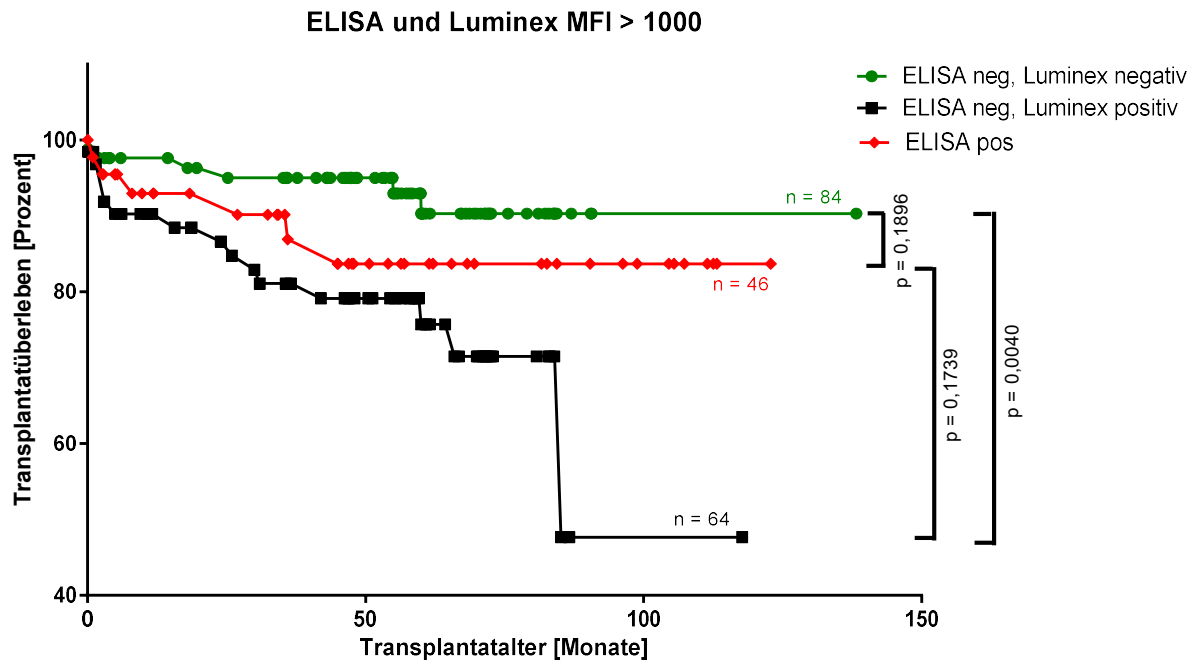


ELISA negativ: Negativ für Antikörper im ELISA  
 ELISA positiv: Positiv für Antikörper im ELISA  
 Luminex positiv: Positiv für Antikörper im Luminex  
 Luminex negativ: Negativ für Antikörper im Luminex

**Graphik 14: Vergleich des Transplantatüberlebens in Prozent und Transplantalter in Monaten abhängig vom im ELISA gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

Zur weiteren Auswertung wird die Patientenkohorte, die keine Antikörper im ELISA aufweist, in eine Gruppe mit fehlender Immunisierung und in eine Gruppe mit positivem Immunstatus im Luminex aufgeteilt. Die Empfänger, bei denen weder im ELISA noch im Luminex Antikörper nachgewiesen werden können, zeigen das beste Transplantatüberleben (90,3% nach 138 Monaten). Im Vergleich hierzu besitzen Patienten mit positivem Immunstatus im ELISA ein schlechteres Outcome (83,7% nach 123 Monaten, p-Wert 0,1896). Das geringste Transplantatüberleben weisen die Empfänger auf, die keine Immunisierung im ELISA zeigen, jedoch einen positiven Antikörperstatus im Luminex haben (47,7% nach 118 Monaten). Diese Verminderung des Transplantatüberlebens ist signifikant im Vergleich zur Gruppe mit fehlender

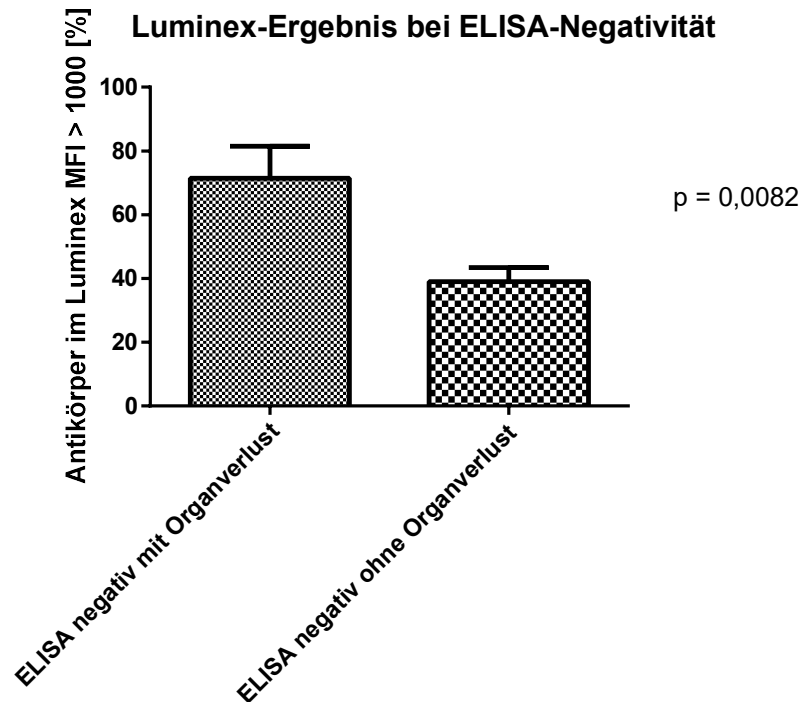
Immunisierung im ELISA und im Luminex (p-Wert = 0,0040). Dies ist in der Graphik 15 ersichtlich.



ELISA neg, Luminex neg: Negativ für Antikörper im ELISA und im Luminex  
 ELISA neg, Luminex pos: Negativ für Antikörper im ELISA und positiv für Antikörper im Luminex  
 ELISA positiv: Positiv für Antikörper im ELISA

**Graphik 15: Transplantatüberleben in Prozent und Transplantatalter in Monaten abhängig vom im ELISA gemessenen Immunstatus mit einem PRA-Grenzwert von über 5% und abhängig vom im Luminex gemessenen Immunstatus mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 (ELISA negativ und Luminex positiv kombiniert). Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Transplantatüberlebens berechnet mit Logrank-Test.**

Patienten, die keine Antikörper im ELISA aufweisen, jedoch einen Organverlust erlitten haben (71,4%), besitzen prozentual häufiger Antikörper im Luminex als Patienten, die noch ein funktionierendes Spenderorgan haben (39,1%). In der Graphik 16 wird dies anhand eines Säulendiagramms verdeutlicht. Hier wurde ein positiver Antikörperstatus im Luminex ab einem MFI-Wert von 1000 bestimmt und eine fehlende Immunisierung im ELISA bei einem PRA-Wert von unter 5%. Dieser prozentuale Unterschied ist unabhängig vom MFI-Grenzwert anhand des Fisher's Exact Test stets signifikant (MFI  $\geq$  1000: p-Wert = 0,0082; MFI  $\geq$  2000: p-Wert = 0,0256; MFI  $\geq$  3000: p-Wert = 0,0026; MFI  $\geq$  4000: p-Wert = 0,0121).



**Graphik 16:** Vorhandensein von Antikörpern in Prozent gemessen im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 bei negativem Immunstatus im ELISA (PRA-Wert unter 5%) in Abhängigkeit vom Transplantatverlust. Signifikanz des Unterschiedes bezüglich des Verlustes oder keines Verlustes des Transplantats berechnet mit Fisher's Exact Test.

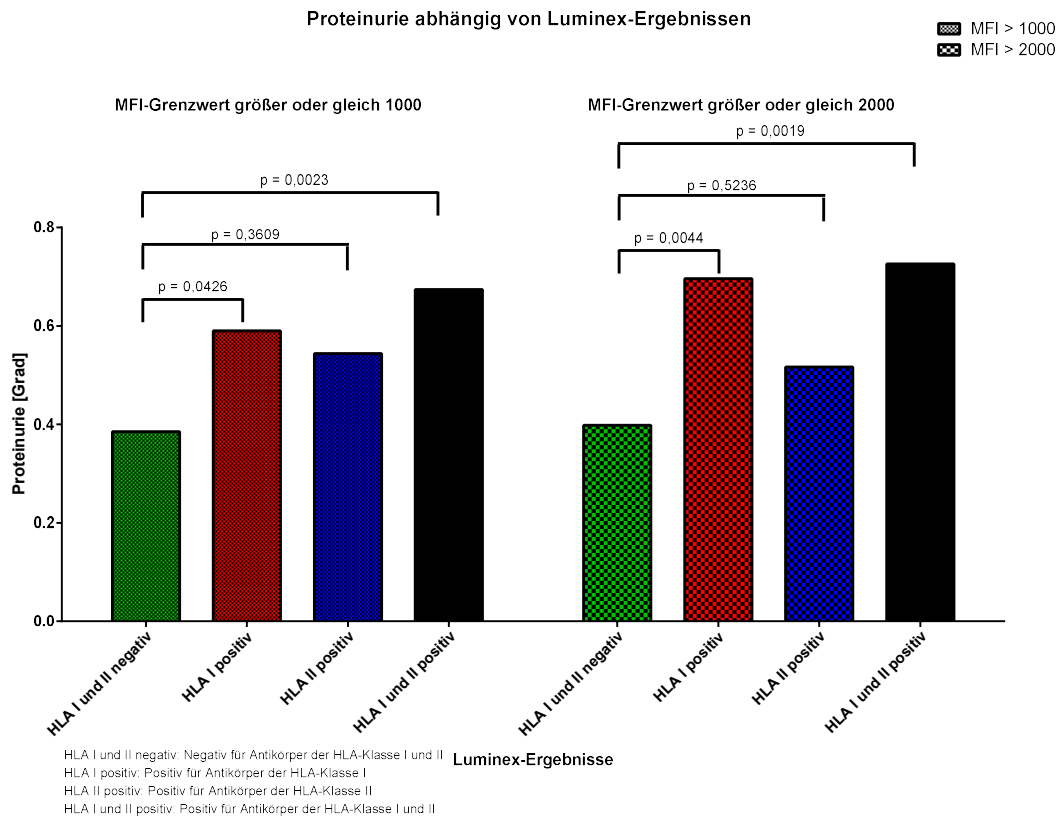
### 3.5 Verlaufparameter in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Luminex

#### 3.5.1 Proteinurie

Bei den Transplantatempfängern erfolgte eine Bestimmung der Proteinausscheidung im Urin zum einen mit handelsüblichen Urinstreifentests. Dies erfolgte in regelmäßigen Abständen nach dem Erhalt des Spenderorgans (nach drei Monaten, nach sechs Monaten und anschließend in jährlichem Abstand). Die Menge des ausgeschiedenen Proteins im Urin wird in unterschiedliche Grade eingeteilt: Grad 0 < 10mg/dl, Grad 1 > 30mg/dl, Grad 2 > 100mg/dl, Grad 3 > 300mg/dl, Grad 4 > 1000mg/dl. Zur weiteren Auswertung wird der Mittelwert der ermittelten Proteinausscheidung berechnet und in Abhängigkeit zu dem Antikörperstatus gesetzt, der mittels der LabScreen Single Antigen Luminex-Technologie ermittelt wurde.

Die Graphik 17 zeigt die renale Proteinausscheidung in Abhängigkeit der Immunisierung im Luminex bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und bei einem MFI von größer oder gleich 2000. Die Proteinurie ist in der Gruppe der nichtimmunisierten Transplantatempfänger (MFI  $\geq$  1000 Grad 0,39; MFI  $\geq$  2000 Grad 0,40) geringer als bei den antikörperpositiven Patienten. Dieser Unterschied ist

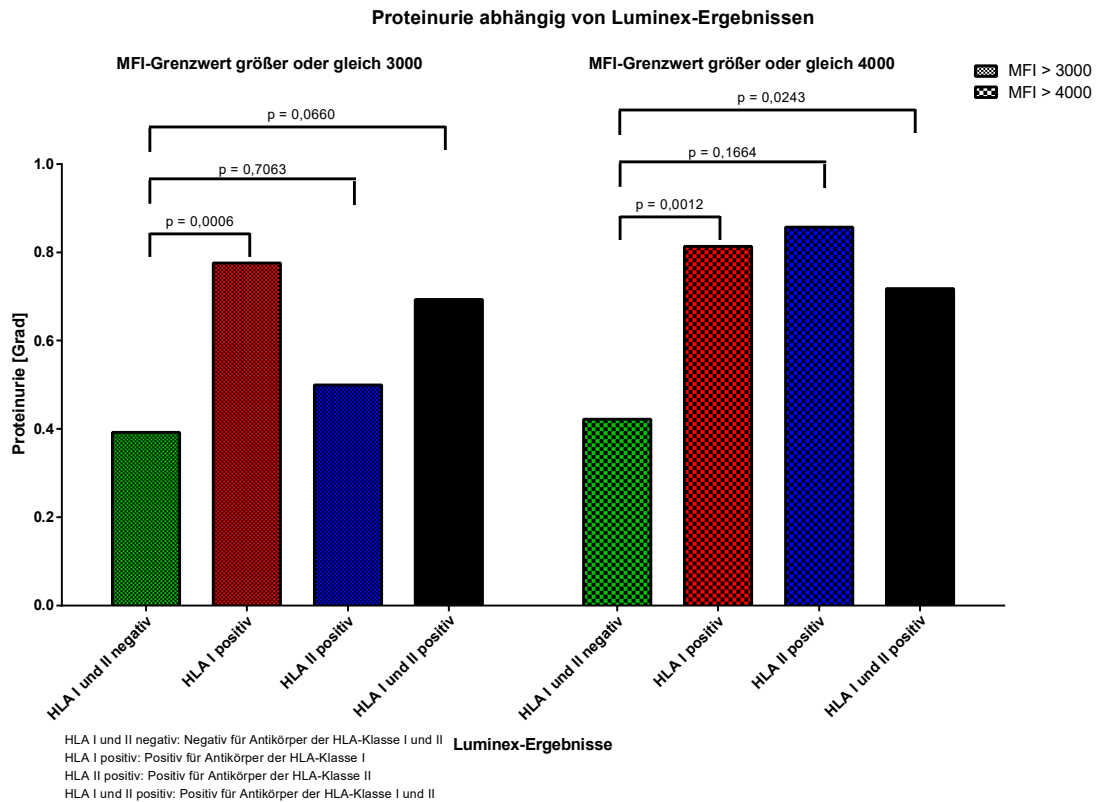
signifikant anhand des ungepaarten T-Tests bei der Kohorte mit Antikörpern der HLA-Klasse I (MFI  $\geq 1000$ : Grad 0,59, p-Wert = 0,0462; MFI  $\geq 2000$ : Grad 0,70, p-Wert = 0,0044) und bei den Empfängern, die sowohl Antikörper der HLA-Klasse I als auch der HLA-Klasse II aufweisen (MFI  $\geq 1000$ : Grad 0,67, p-Wert = 0,0023; MFI  $\geq 2000$ : Grad 0,73, p-Wert = 0,0019).



**Graphik 17: Proteinurie in Grad abhängig vom Immunstatus gemessen im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test.**

Analog hierzu findet sich in der Graphik 18 die Grade der Proteinausscheidung bei Grenzwerten der Luminex-Auswertung bei einem MFI von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Auch hier scheiden die antikörpernegativen Patienten (MFI  $\geq 3000$  Grad 0,39; MFI  $\geq 4000$  Grad 0,42) weniger Protein aus als beim Vorhandensein von HLA-spezifischen Antikörpern. Die Proteinurie ist signifikant geringer bei den Patienten mit Antikörpern der HLA-Klasse I (MFI  $\geq 3000$ : Grad 0,78, p-Wert = 0,0006; MFI  $\geq 4000$ : Grad 0,81, p-Wert = 0,0012) und bei den Empfängern ab einem MFI-Grenzwert von 4000, die Antikörper der HLA-Klasse I und II besitzen (Grad 0,72, p-Wert = 0,0243).





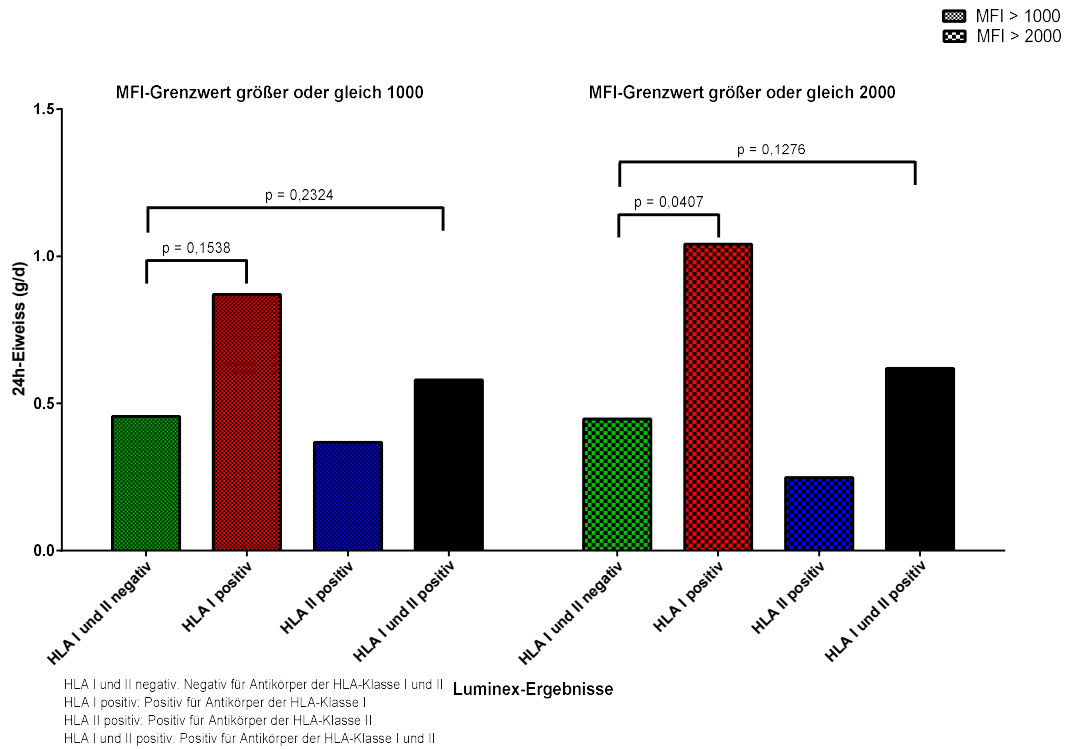
**Graphik 18: Proteinurie in Grad abhängig vom Immunstatus gemessen im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test.**

Zum anderen erfolgt die Analyse der renalen Proteinausscheidung mit der Gewinnung von 24-Stunden-Sammelurin und der daraus bestimmten Proteinmenge (nach zwei, drei und sechs Monaten, anschließend jährlich), die in g/d angegeben wird. Das Resultat hieraus wird ebenfalls als Mittelwert abhängig vom Immunisierungsstatus mit unterschiedlichen MFI-Grenzwerten ausgewertet.

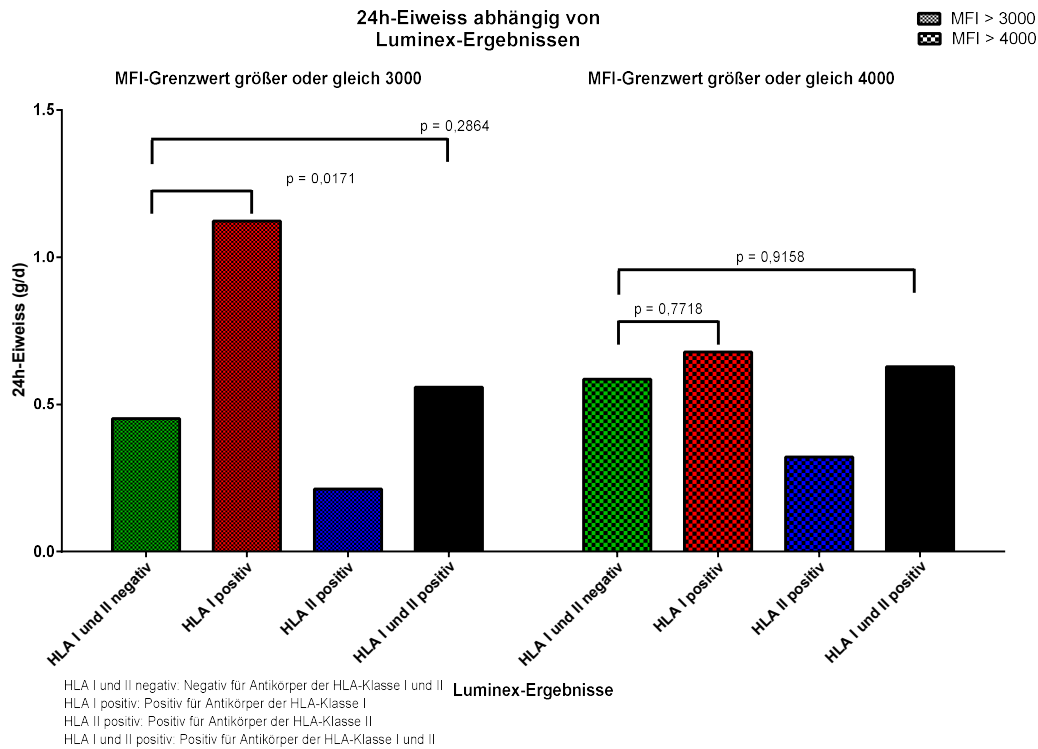
In den Graphiken 19 und 20 wird ersichtlich, dass die Proteinurie gemessen im 24-Stunden-Sammelurin bei der Gruppe der antikörpernegativen Empfängern (MFI  $\geq$  1000 0,46g/d; MFI  $\geq$  2000 0,45g/d; MFI  $\geq$  3000 0,45g/d; MFI  $\geq$  4000 0,59g/d) geringer ist als bei den Patienten mit Antikörpern der HLA-Klasse I (MFI  $\geq$  1000 0,84g/d; MFI  $\geq$  2000 1,04g/d; MFI  $\geq$  3000 1,12g/d; MFI  $\geq$  4000 0,68g/d) und bei der Kohorte mit Antikörpern der HLA-Klasse I und II (MFI  $\geq$  1000 0,58g/d; MFI  $\geq$  2000 0,62g/d; MFI  $\geq$  3000 0,56g/d; MFI  $\geq$  4000 0,63g/d). Die Proteinurie ist anhand des ungepaarten T-Tests signifikant höher bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000 und 3000 bei der Patientengruppe mit HLA-Klasse-I-Antikörpern (MFI  $\geq$  2000 p-Wert = 0,0407; MFI  $\geq$  3000 p-Wert = 0,0171). Die Kohorte, die mit Antikörpern der HLA-Klasse II immunisiert

ist, besitzt eine leicht geringere renale Eiweißausscheidung (MFI  $\geq$  1000 0,37g/d; MFI  $\geq$  2000 0,25g/d; MFI  $\geq$  3000 0,21g/d; MFI  $\geq$  4000 0,32g/d), was jedoch nicht signifikant ist (MFI  $\geq$  1000 p-Wert = 0,6715; MFI  $\geq$  2000 p-Wert = 0,4866; MFI  $\geq$  3000 p-Wert-Berechnung nicht möglich wegen n=1; MFI  $\geq$  4000 p-Wert = 0,7196).

24h-Eiweiß abhängig von Luminex-Ergebnissen



**Graphik 19: Renale Proteinausscheidung in g/d gemessen im 24-Stunden-Sammelurin abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test.**

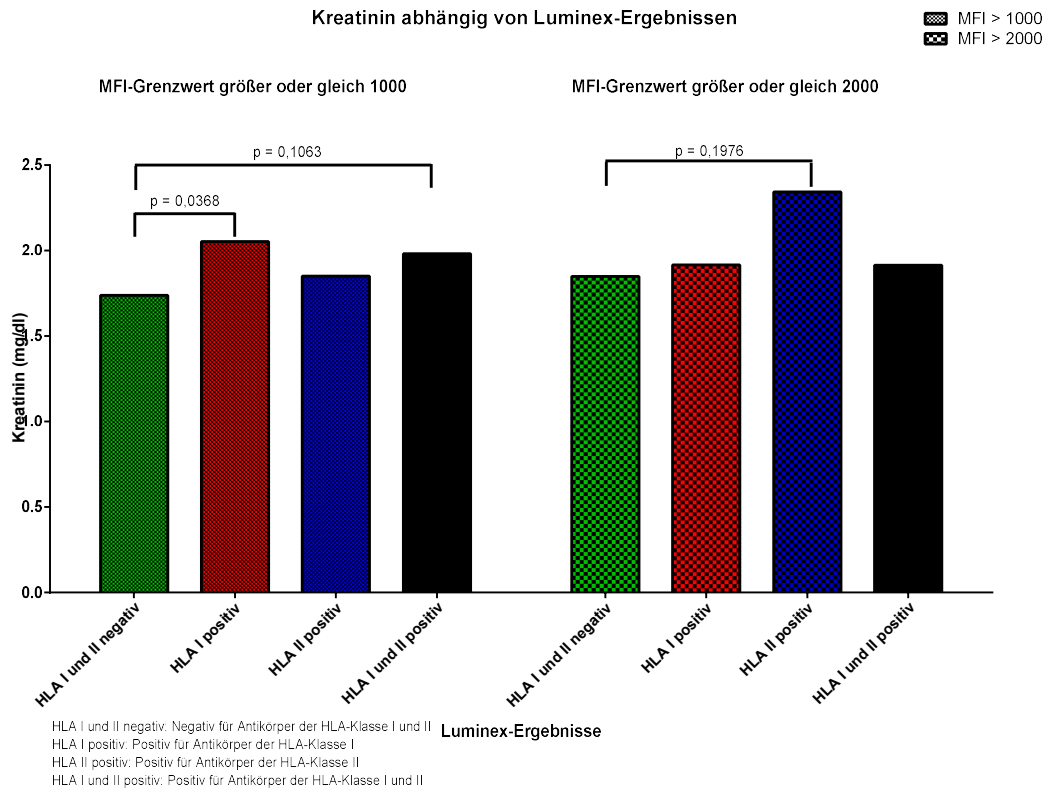


**Graphik 20: Renale Proteinausscheidung in g/d gemessen im 24-Stunden-Sammelurin abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich der Proteinurie berechnet mit ungepaartem T-Test.**

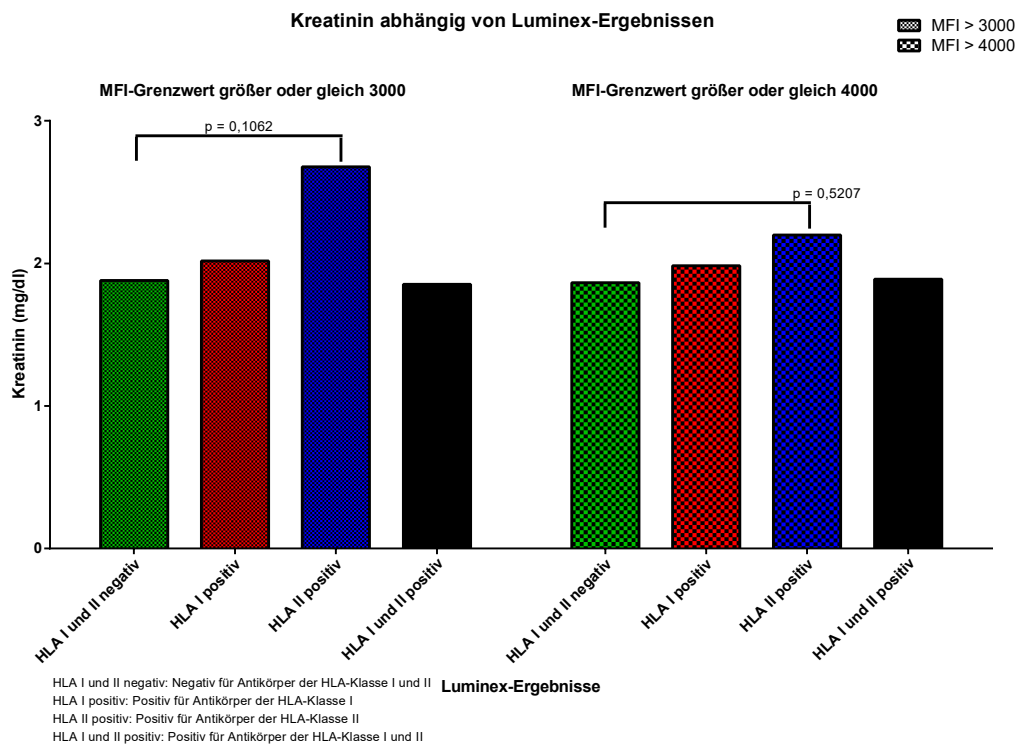
### 3.5.2 Verlauf des Serumparameters Kreatinin

Ein weiterer Parameter, um die Nierenfunktion zu überprüfen, ist das Serum-Kreatinin. Dies wurde einen, drei, sieben, 14, 21 und 28 Tage postoperativ bestimmt, außerdem beim Zeitpunkt der Entlassung, nach zwei, drei und sechs Monaten sowie anschließend in jährlichem Abstand. In den Graphiken 21 und 22 ist der Mittelwert der bestimmten Kreatinin-Werte in Abhängigkeit vom Ergebnis des Luminex mit der LabScreen Single Antigen-Technik bei unterschiedlichen MFI-Grenzwerten zu erkennen.

Es zeigt sich, dass der mittlere Kreatinin-Wert außer bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 stets am niedrigsten bei den nicht immunisierten Patienten ist (MFI ≥ 1000 1,74mg/dl; MFI ≥ 2000 1,85mg/dl; MFI ≥ 3000 1,88mg/dl; MFI ≥ 4000 1,87mg/dl). Dieser Unterschied ist signifikant im Vergleich zur Gruppe der Empfänger mit Antikörpern der HLA-Klasse I bei einem MFI-Grenzwert von 1000 (MFI ≥ 1000: 2,05mg/dl, p-Wert = 0,0368). Ansonsten weisen bei einem MFI-Grenzwert ab 2000 die Patienten mit Antikörpern der HLA-Klasse II die höchsten Kreatinin-Werte auf (MFI ≥ 2000 2,34mg/dl; MFI ≥ 3000 2,68mg/dl; MFI ≥ 4000 2,20mg/dl).



**Graphik 21: Serum-Kreatinin in mg/dl abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und größer oder gleich 2000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Serum-Kreatinins berechnet mit ungepaartem T-Test.**



**Graphik 22: Serum-Kreatinin in mg/dl abhängig vom Immunstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 3000 und größer oder gleich 4000. Signifikanzen der Unterschiede bezüglich des Serum-Kreatinins berechnet mit ungepaartem T-Test.**

#### 4. Diskussion

Die ursächliche Rolle an hyperakuten Abstoßungen von präformierten donorspezifischen Antikörpern, die ein positives Crossmatch im LCT auslösen, ist unumstritten. Im Zusammenhang mit Nierentransplantationen konnte dies erstmals von *Patel* und *Terasaki* belegt werden. (48)

Trotz eingeschränkter Sensitivität des LCT führte die Testung von Patientenserum vor einer Transplantation auf das Vorhandensein donorspezifischer Antikörper zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens. (86) Der Nachweis von weiteren präformierten donorspezifischen Antikörpern mit sensitiveren Methoden wie dem ELISA ergab einen Ausschluss dieser Antikörper für eine Transplantation, was weitere Abstoßungen verringern und das Transplantatüberleben zusätzlich verbessern konnte. (32), (52), (53)

Der Luminex ist eine neue Technik zur Antikörperdetektion aus dem Bereich der Festphasen-Methoden und weist eine höhere Sensitivität als der LCT und auch als der ELISA auf. (51), (78), (87), (88), (89), (90), (91) Ob die Feststellung weiterer Immunisierungen durch den Luminex zu einer erneuten Verbesserung des Transplantatüberlebens führt, war Hauptgegenstand vorliegender Untersuchungen.

##### 4.1 Verdünnung

Die Evaluation einer Verdünnung der Beads-Reagenzien zeigte steigende Differenzen und prozentuale Abweichungen sowie absolute Abweichungen zwischen den normalisierten MFI-Werten der Verdünnung und der unverdünnten Probe mit zunehmender Verdünnung. Diese Differenzen und Abweichungen waren ca. eineinhalb bis dreieinhalb mal so groß wie die Differenzen und Abweichungen der Interassay-Varianz. Die größten Differenzen und Abweichungen waren bei sehr niedrigen (MFI < 100) und sehr hohen (MFI > 4000) normalisierten MFI-Werten der unverdünnten Proben zu sehen. Die starken Abweichungen im Bereich der sehr hohen MFI-Werte > 4000 sind auf den dritten Versuchstag zurückzuführen. Hierbei kam es bei einzelnen Spezifitäten, die im unverdünnten Test sehr hohe normalisierte MFI-Werte aufwiesen zu negativen Ergebnissen in allen durchgeführten Verdünnungsstufen. Dies war an den ersten beiden Versuchstagen nicht erkennbar, was möglicherweise auf einen

systematischen Fehler zurückzuführen ist, der jedoch nicht identifiziert werden konnte.

Insgesamt kam es zu einer Verschiebung der normalisierten MFI-Werte hin zu höheren Ergebnissen. Dadurch kam es in allen Verdünnungsstufen zusammen zu einem Nachweis zusätzlicher positiver Spezifitäten von ca. 2,99% und analog hierzu wurden 2,22% der Spezifitäten als falsch negativ erkannt.

Des Weiteren wurden die Sensitivitäten, Spezifitäten sowie der positive und negative prädiktive Wert bestimmt. Diese waren bei der 1 zu 4-Verdünnung am höchsten mit einer Sensitivität von 0,96 und einer Spezifität von 0,97 und nahmen mit zunehmender Verdünnung immer mehr ab. Im Vergleich hierzu lagen bei der Interassay-Varianz die Sensitivität bei 0,99 und die Spezifität bei 0,94.

Die größeren Differenzen und Abweichungen der Verdünnungen im Vergleich zur Interassay-Varianz sind auf die geringere Anzahl von Beads pro Antigen-Spezifität in einer Probe zurückzuführen. Hierbei kann es zu Verschiebungen des MFI-Wertes kommen, wenn sich beispielsweise Antikörper, die eigentlich nur in geringem Maße vorhanden sind, an einzelne wenige Beads binden: Steht einer geringeren Anzahl an Beads eine gleich bleibende Anzahl an Antikörpern gegenüber, binden jeweils mehr Antikörper an ein Bead als bei der nicht verdünnten Variante. Durch diese vermehrte Besetzung der einzelnen Beads entsteht eine höhere Fluoreszenz, was zu einem höheren MFI-Wert führt. Dieses Problem wird dadurch verstärkt, dass die einzelnen Beads eine unterschiedliche Antigen-Dichte aufweisen, was auch schon bei unverdünnten Testdurchführungen zu abweichenden Ergebnissen führen kann. (39)

Gegenstand aktueller Diskussionen ist der sogenannte Prozonen-Effekt. Er beschreibt das Phänomen, dass manche Antikörper trotz hoher Titer nicht oder nur in geringem Maße nachweisbar sind, was aber durch eine Verdünnung des Patientenserums wieder aufgehoben werden kann. (92) Für diesen Effekt kommen unterschiedliche Ursachen in Frage. Zum einen kann er dadurch entstehen, dass im Serum vorhandene IgM Bindestellen sowohl für IgG aus dem Patientenserum als auch für die mit PE beladenen Anti-IgG-Antikörper zur Fluoreszenz verdecken. Eine Lösung für diese Problematik bietet der Einsatz von Dithiothreitol, das die IgM denaturiert. (93) Zum anderen kann auch das Komplement C1 an die hochtitrigen Antikörper des Patienten binden, was wiederum ein Anheften des mit PE beladenen Anti-IgG-Antikörpers verhindert. (92),

(94) Das Komplement kann mithilfe von Dithiothreitol, Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Hitze zerstört werden. (94) Es wäre denkbar, dass eine Verdünnung der Beads-Reagenzien zu einer Verstärkung des Prozone-Effektes führen kann und dadurch falsch negative Ergebnisse entstehen würden. Verdünnungsreihen mit oben genannten Reagenzien oder einer Verdünnung des Patientenserums wurden im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt, was ein Ansatz für zukünftige Studien sein könnte.

Einige Antigen-Spezifitäten zeigten besonders hohe Differenzen und Abweichungen. Zu diesen Antigenen gehören A\*36:01, A\*74:01, A\*80:01, B\*18:01, C\*07:02, DPA1\*01:03DPB1\*02:01, DPA1\*02:01DPB1\*18:01 und DPA1\*02:01DPB1\*28:01.

Auffällig war, dass diese großen Abweichungen immer nur an einem der drei Versuchstage – meist am dritten Versuchstag – und immer nur bei einem bestimmten Patientenserum auftraten. Bei den Spezifitäten der HLA-Klasse I waren alle Verdünnungsstufen betroffen, bei der HLA-Klasse II nur immer eine oder maximal zwei Verdünnungsstufen. Die Ursache dieser starken Abweichung konnte nicht geklärt werden.

*Middleton* et al. zeigten, dass einige Beads besonders häufig im Luminex positiv sind, obwohl das Auftreten dieser Spezifitäten in der Bevölkerung sehr selten ist. (95) Zu diesen Spezifitäten zählen unter anderem auch die obengenannten Allele A\*36:01, A\*74:01 und A\*80:01. Diese Diskrepanz zwischen der Häufigkeit in der Bevölkerung und dem Auftreten im Luminex ist nicht abschließend geklärt, könnte jedoch auf falsch positive oder aber auf für die Organallokation unerhebliche Ergebnisse hindeuten. Dies wird unter 4.3 noch weiter erläutert.

Abschließend muss gesagt werden, dass zur Klärung, ob eine Verdünnung der Beads-Reagenzien noch zu ausreichend validen Ergebnissen im Luminex führt und somit zu Forschungs- als auch zu Diagnostikzwecken eingesetzt werden kann, noch weitere Untersuchungen nötig sind.

#### 4.2 Antikörperstatus im LCT, ELISA und Luminex

Die Untersuchung mit der LabScreen Single Antigen Technik des Luminex mit einem MFI-Grenzwert von 1000 an 197 Patientenseren vor der Transplantation ergab keine Immunisierung bei 87 Patienten. 54 Empfänger wiesen Antikörper der HLA-Klasse I auf,

acht Patienten hatten ausschließlich Antikörper der HLA-Klasse II und 47 Patienten waren sowohl mit Antikörpern der HLA-Klasse I als auch der HLA-Klasse II immunisiert. Somit zeigten insgesamt 55,8% der Transplantatempfänger einen positiven Antikörperstatus. Dieser Prozentsatz an Immunisierungen im Luminex liegt deutlich über dem Schnitt anderer Studien, was unter anderem auf die eingeschlossenen Retransplantationen zurückgeführt werden kann. Wenn man nur die Ersttransplantationen betrachtet, liegt eine Immunisierung von insgesamt 38,1% vor, was immer noch etwas über dem Durchschnitt anderer Studien liegt. (97), (98)

Im Vergleich zum Luminex waren im LCT nur bei 38 Patienten (19,6%) Antikörper nachzuweisen. Mit dem ELISA konnten 64 immunisierte Transplantatempfänger (32,8%) detektiert werden. Dies zeigt, dass der Luminex im Vergleich zum LCT und zum ELISA eine deutlich höhere Sensitivität aufweist, was auch schon in anderen Studien belegt werden konnte. (43), (51), (88), (91), (99)

Bei einer Analyse der Donorspezifität im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 zeigen 37 (18,9%) von den insgesamt 197 Patienten donorspezifische Antikörper. Dieser Anteil entspricht weitestgehend dem anderer Studien. (97), (98), (100)

#### 4.3 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Immunstatus im Luminex

Eine Betrachtung des Transplantatverlustes in Abhängigkeit vom Antikörperstatus im Luminex mit einem MFI-Grenzwert von 1000 zeigte, dass nur 6,9% der nicht immunisierten Patienten ihr Transplantat verloren haben. Hingegen mussten 20,0% der Empfänger mit positivem Antikörperstatus zur Dialyse zurückkehren (p-Wert = 0,009). In anderen Studien war der Unterschied nicht ganz so deutlich zu erkennen (55). Bei *Terasaki* et al. war kein Unterschied ersichtlich (33), wobei hier nur ein Beobachtungszeitraum von einem Jahr angewandt wurde.

Eine Untersuchung des Transplantatüberlebens in Abhängigkeit vom Antikörpernachweis im Luminex ungeachtet der Donorspezifität ergab das beste Transplantatüberleben bei Patienten mit fehlender Immunisierung. Dies lag bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 bei 90,6% nach 138 Monaten und war signifikant höher im Vergleich zur Gruppe mit HLA-Klasse-I- oder -II-Antikörpern (67,7% nach 123 Monaten, p-Wert = 0,0455) und im Vergleich zur Gruppe mit HLA-Klasse-I-



und -II-Antikörpern (69,6% nach 113 Monaten, p-Wert = 0,0031). Diese Unterschiede waren auch bei den anderen MFI-Grenzwerten von 2000, 3000 und 4000 zu sehen. Jedoch nahm die Signifikanz mit steigendem MFI-Grenzwert ab bzw. war ab einem MFI-Grenzwert von 3000 nicht mehr vorhanden. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch *Caro-Oleas et al.* (55), *Gupta et al.* (97) und *Poli et al.* (101). Jedoch muss angemerkt werden, dass bei *Caro-Oleas et al.* und *Gupta et al.* kein Unterschied hinsichtlich des Transplantatüberlebens zwischen der Gruppe von antikörperpositiven Patienten ohne Donorspezifität und nicht immunisierten Patienten ersichtlich war.

Die Differenzierung des Immunstatus im Luminex in Bezug auf die einzelnen HLA-Gruppen zeigt, dass bei einem MFI-Grenzwert von 1000 die Patientengruppen mit Antikörpern der HLA-Klasse I (62,8% nach 123 Monaten) und mit Antikörpern der HLA-Klasse I und II zusammen (69,6% nach 113 Monaten) ein signifikant vermindertes Transplantatüberleben im Vergleich zu den nicht immunisierten Empfängern (90,6% nach 138 Monaten) besitzen. Ab einem MFI-Grenzwert 2000 und höher zeigt sich jedoch eine Signifikanz nur noch bezüglich eines verminderten Transplantatüberlebens der Patienten mit ausschließlich vorhandenen Antikörpern der HLA-Klasse II. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl der mit Antikörpern der HLA-Klasse II immunisierten Patienten nur sehr gering war: Acht Patienten bei einem MFI-Grenzwert von 1000, sieben Patienten bei einem MFI-Grenzwert von 2000 und jeweils vier Patienten bei einem MFI-Grenzwert von 3000 und 4000. Einige Studien kamen zu dem Ergebnis, dass der Einfluss von HLA-Klasse I Antikörpern auf das Transplantatüberleben deutlich größer ist als der von Antikörpern der HLA-Klasse II. (102), (55) Andere Studien stellten jedoch genau das Gegenteil fest. (79), (98), (103) *Taylor et al.* diskutierten darüber, dass Antikörper der HLA-Klasse I einen größeren Einfluss auf das kurzfristige Transplantat-Outcome haben und HLA-Klasse II Antikörper von höherer Relevanz für die langfristige Transplantatfunktion sind. (93), (104)

Bei alleiniger Betrachtung donorspezifischer Antikörper besitzen die Patienten ohne Immunisierung (MFI  $\geq$  1000: 84,0% nach 138 Monaten; MFI  $\geq$  2000: 84,2% nach 138 Monaten; MFI  $\geq$  3000: 76,0% nach 138 Monaten; MFI  $\geq$  4000: 75,1% nach 138 Monaten) ein besseres Transplantatüberleben als Patienten mit vorhandenen donorspezifischen Antikörpern (MFI  $\geq$  1000: 67,3% nach 113 Monaten; MFI  $\geq$  2000:

64,5% nach 113 Monaten; MFI  $\geq$  3000: 73,5% nach 113 Monaten; MFI  $\geq$  4000: 79,3% nach 113 Monaten). Dieser Unterschied ist am ausgeprägtesten bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 2000, erreicht jedoch auch hier keine Signifikanz (p-Wert = 0,0729). Der Einfluss donorspezifischer Antikörper im Luminex auf das Transplantatüberleben ist mit Ausnahme weniger Studien (34), (82) häufig belegt worden. (40), (55), (97), (98), (101), (102), (105), (106), (107), (108), (109), (110), (111), (112), (113), (114) Einige Studien zeigten ausschließlich erhöhte Abstoßungsraten bei einem Vorhandensein von donorspezifischen Antikörpern, jedoch keinen Unterschied hinsichtlich des Transplantatüberlebens, was gegebenenfalls an zu kurzen Beobachtungszeiträumen liegen könnte. (47), (79), (80)

Diese Studie bestätigte die Beeinflussung des Transplantates durch donorspezifische Antikörper. Ein zusätzlicher Nutzen der Beachtung nichtdonorspezifischer Antikörper war aber deutlich ersichtlich. Zu ähnlichen Ergebnissen waren auch *Poli et al.* gekommen. (101) Eine mögliche Ursache für den verhältnismäßig geringen Einfluss donorspezifischer Antikörper in dieser Studie könnte sein, dass eine HLA-Typisierung des Spenders und Empfängers nur hinsichtlich der HLA-Moleküle A, B und DR durchgeführt wurde. Dadurch können donorspezifische Antikörper, die gegen HLA-C, HLA-DQ und HLA-DP gerichtet sind, vernachlässigt worden sein. Diese Antikörper sind aber im Gegensatz zur früher vorherrschenden Meinung ebenfalls entscheidend für die Transplantatfunktion. (49), (93), (115), (116)

Ein weiteres Problem stellen mögliche falsch positive und falsch negative Ergebnisse im Luminex dar, die durch denaturierte Antigene entstehen. Bei der Anheftung der gereinigten Antigene an die Beads kann es zu Konformationsänderungen der Tertiärstruktur kommen, wodurch es zum Verlust ursprünglich vorhandener Antikörperbindestrukturen kommen kann oder aber auch neue geschaffen werden können. (49), (99), (117) Einige Arbeiten kamen zu dem Ergebnis, dass das Vorhandensein von Antikörpern gegen denaturierte Antigene unerheblich für die Transplantatfunktion sind. (118), (119), (120)

In dieser Studie fand keine Berücksichtigung einer Komplementaktivierung der Antikörper statt. Die Rolle der im LCT nachgewiesenen, komplementaktivierenden Antikörper bei der Auslösung von Abstoßungen ist unumstritten. (48) Aufgrund dessen wurden Nachweisverfahren zur Detektion einer Komplementaktivierung auch in der

Luminex-Technologie entwickelt. Dies erfolgt einmal durch den Nachweis des Komplements C4d (121) und zum anderen des Komplements C1q (122). Inwieweit der Nachweis von komplementaktivierenden Antikörpern mit diesen Techniken einen Vorteil für die Transplantatfunktion mit sich bringt, ist noch nicht gänzlich geklärt. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass der Nachweis dieser komplementaktivierenden Antikörper im Luminex das Transplantatüberleben deutlich einschränkt. (122), (123) Eine Arbeit von *Arnold* et al. ergab jedoch auch einen Einfluss nicht komplementbindender Antikörper (IgG2, IgG4 und IgA) auf die Transplantatfunktion, weshalb diese nicht vernachlässigt werden sollten. (124) Sicherlich sind noch weitere Untersuchungen nötig, um die Rolle des Nachweises einer Komplementaktivierung im Luminex genauer bestimmen zu können.

Im Luminex werden ausschließlich HLA-spezifische Antikörper vom IgG-Typ nachgewiesen. Bislang wurde davon ausgegangen, dass IgM-Antikörper, insbesondere wenn sie als Autoantikörper fungieren, keine Abstoßungen hervorrufen (88), (125) oder sogar einen positiven Effekt auf das Transplantat besitzen. (126) Allerdings wiesen *Stastny* et al. eine höhere Rate an Transplantatabstoßungen bei IgM-positiven Patienten nach. (127)

Auch die Rolle nicht HLA-spezifischer Antikörper, also von Antikörpern gegen Strukturen epithelialer und endothelialer Zellen wie Vimentin, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 oder MICA, ist noch nicht geklärt. (38), (128) Bisherige Studien befassten sich vor allem mit den Anti-MICA-Antikörpern. Einige konnten einen negativen Effekt dieser auf die Abstoßungsrate und das Transplantatüberleben feststellen (129), (130), (131), *Lemy* et al. konnten jedoch keinen Hinweis auf deren Einfluss auf die Transplantatfunktion ableiten (132).

In dieser Studie erfolgte der Nachweis der Donorspezifität durch die HLA-Typisierung und der Betrachtung der Antigene. Neuere Studien konnten jedoch belegen, dass die Antikörper nicht an die Antigene binden, sondern an eines ihrer Epitope, was nur einem kleinen Bereich des Antigens entspricht. (133) Eine Untersuchung, gegen welche Epitope die Antikörper gerichtet sind, wurde hier jedoch nicht durchgeführt. Ein bestimmtes Epitop kann sich auf mehreren Antigenen befinden, was dann mit „public/öffentlichem“ Epitop bezeichnet wird. (134), (135) Somit können bei der Antikörperdetektion mit dem Luminex Antikörper, die eigentlich gegen den Donor

gerichtet sind, als nicht donorspezifisch übersehen werden. Dies könnte unter anderem eine Ursache für den verhältnismäßig geringen Einfluss donorspezifischer Antikörper in dieser Studie sein. Mehrere Studien haben deshalb zur Verbesserung der Organvergabe das Verwenden eines Programmes wie beispielsweise den „HLA-Matchmaker“ empfohlen, das das Matching anhand der Epitope vornimmt. (35), (133), (136), (137)

#### 4.4 Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Immunstatus im Vergleich Luminex mit LCT und ELISA

In dieser Studie zeigte sich, dass der Nachweis von Antikörpern im Luminex (27,6% mit Antikörpern der HLA-Klasse I immunisiert) deutlich sensitiver war als im LCT (19,6% mit Antikörpern der HLA-Klasse I immunisiert), was konkordant zu anderen Studien ist. (51), (87), (91), (99)

Bei der Betrachtung des Transplantatüberlebens in Bezug auf die Immunisierung im LCT ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Immunisierten (83,8% nach 113 Monaten) und Patienten ohne Antikörper (73,8% nach 138 Monaten). Dieses Ergebnis entspricht nicht den Ergebnissen anderer Studien und gängiger Erkenntnisse. (86), (138) Daraufhin erfolgte eine Unterteilung der Empfänger, die im LCT nicht immunisiert sind, in eine Gruppe, die Antikörper im Luminex aufweist, und in eine andere Gruppe, die auch im Luminex einen negativen Antikörperstatus hat. Hier fällt auf, dass die weder im LCT noch im Luminex immunisierten Patienten das beste Transplantatüberleben besitzen (90,2% nach 138 Monaten) und die Gruppe, die im LCT nicht immunisiert ist, aber einen positiven Antikörperstatus im Luminex besitzt, das schlechteste Transplantatüberleben aufweist (60,6% nach 123 Monaten). Das Transplantatüberleben der Patienten mit vorhandenen Antikörpern im LCT liegt zwischen den beiden Gruppen (83,3% nach 113 Monaten).

Ursächlich für dieses Ergebnis könnte sein, dass der Antikörperstatus im LCT vor der Durchführung der Transplantation stattgefunden hat und bei positiver Befundung eine intensivierte Immunsuppression (Tacrolimus, Mycophenolat Mofetil, Antithymozytenglobulin und Steroide) durchgeführt wurde. Die Antikörperdetektion im Luminex erfolgte jedoch retrospektiv, weshalb eine Immunisierung hier keinerlei Konsequenzen auf die Immunsuppression hatte. Einige Studien konnten bereits zeigen,

dass eine intensivierete Immunsuppression bei antikörperpositiven Patienten zu akzeptablen bis sehr guten Ergebnissen im Langzeitverlauf führen kann. (36), (37), (139), (140)

Der Luminex (55,6% der Patienten immunisiert) besaß in dieser Arbeit auch im Vergleich zum ELISA (23,3% der Patienten immunisiert) eine höhere Sensitivität, was andere Studien ebenfalls bestätigen. (89), (99) Das Transplantatüberleben abhängig vom Immunstatus im ELISA zeigt keine signifikanten Unterschiede (Patienten mit Antikörpern der HLA-Klasse I oder II: 92,3% nach 123 Monaten; Patienten mit Antikörpern der HLA-Klasse I und II: 72,8% nach 107 Monaten und Patienten ohne Immunisierung 72,2% nach 138 Monaten). Die meisten Studien erhielten jedoch gegensätzliche Ergebnisse. (32), (52), (53), (138)

Eine analoge Unterteilung wie beim LCT ergibt, dass Patienten, die weder im ELISA noch im Luminex immunisiert sind, das beste Transplantatüberleben besitzen (90,3% nach 138 Monaten). Signifikant am schlechtesten ist das Transplantatüberleben bei den Empfängern, die einen negativen Antikörperstatus im ELISA aufweisen, jedoch antikörperpositiv im Luminex sind (47,7% nach 118 Monaten, p-Wert 0,0040). Patienten mit Antikörpern, die im ELISA detektiert wurden, weisen ein mittleres Transplantatüberleben auf (83,7% nach 123 Monaten). Auch besitzen ELISA-negative Patienten, die ein Organ verloren haben, signifikant häufiger Antikörper im Luminex im Vergleich zu Patienten, die keinen Organverlust erlitten haben (MFI-Grenzwert  $\geq 1000$ : 71,4% vs. 39,1%). Analog zu dem Ergebnis des Antikörpernachweises im LCT wurden Transplantationen mit einem positiven Immunstatus im ELISA mit einer intensivierten Immunsuppression durchgeführt. Jedoch wurde die Immunisierung im Luminex erst retrospektiv analysiert, was die Ursache für die ungewöhnlichen Ergebnisse des Transplantatüberlebens abhängig vom ELISA sein könnte.

Die beiden Untersuchungen des Transplantatüberlebens abhängig vom Immunstatus im LCT und im ELISA im Vergleich zum Luminex legen nahe, dass eine Berücksichtigung der Immunisierungen im Luminex einen zusätzlichen Nutzen für das Transplantat mit sich bringt. Einige Studien kamen zu ähnlichen Schlussfolgerungen (97), (107), (141), andere sahen keinen Vorteil in der zusätzlichen Benutzung des Luminex (34), (82).

#### 4.5 Verlaufsp Parameter der Nierenfunktion in Abhängigkeit vom Immunstatus im Luminex

Zur Untersuchung der Transplantatfunktion wurden in dieser Arbeit zum einen die Proteinexkretion im Urin und zum anderen das Kreatinin im Serum abhängig von der Immunisierung im Luminex bestimmt. Die Proteinurie wurde mittels eines Urinstreifentests, dessen Ergebnisse in Grade eingeteilt wurden, sowie durch die Gewinnung von 24-Stunden-Sammerlurin bestimmt. Bei der Methode mit dem Urinstreifentest zeigte sich, dass immunisierte Patienten eine signifikant höhere Proteinurie besaßen als Empfänger ohne vorhandene Antikörper (MFI  $\geq$  1000 Grad 0,39; MFI  $\geq$  2000 Grad 0,40; MFI  $\geq$  3000 Grad 0,39; MFI  $\geq$  4000 Grad 0,42). Dieser Unterschied war signifikant bei der Betrachtung der ausschließlich HLA-Klasse I antikörperpositiven Patienten (MFI  $\geq$  1000: Grad 0,59, p-Wert = 0,0462; MFI  $\geq$  2000: Grad 0,70, p-Wert = 0,0044; MFI  $\geq$  3000: Grad 0,78, p-Wert = 0,0006; MFI  $\geq$  4000: Grad 0,81, p-Wert = 0,0012) und bei den Patienten mit Antikörpern der HLA-Klasse I und II außer bei einem MFI-Grenzwert von 3000 (MFI  $\geq$  1000: Grad 0,67, p-Wert = 0,0023; MFI  $\geq$  2000: Grad 0,73, p-Wert = 0,0019; MFI  $\geq$  3000: Grad 0,69, p-Wert = 0,07; MFI  $\geq$  4000 Grad 0,72, p-Wert = 0,0243). Bei der Betrachtung der Proteinmenge im 24-Stunden-Sammelurin fällt auf, dass die Patientenkohorte mit Antikörpern der HLA-Klasse I stets die höchste Proteinausscheidung besitzt, was bei einem MFI-Grenzwert von 2000 und 3000 auch die Signifikanz erreicht (MFI  $\geq$  2000 p-Wert = 0,0407; MFI  $\geq$  3000 p-Wert = 0,0171).

Die Analyse des Serum-Kreatinins erbrachte tendenziell höhere Werte bei immunisierten Patienten im Vergleich zu Patienten ohne Antikörper (MFI  $\geq$  1000 1,74mg/dl; MFI  $\geq$  2000 1,85mg/dl; MFI  $\geq$  3000 1,88mg/dl; MFI  $\geq$  4000 1,87mg/dl). Dies erreichte die Signifikanz jedoch nur bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 und bei Empfängern, die ausschließlich Antikörper der HLA-Klasse I besitzen (Kreatinin 2,05mg/dl, p-Wert = 0,0368). Als Nachteil der hier durchgeführten Studie muss angemerkt werden, dass keine glomeruläre Filtrationsrate berechnet wurde, welche die Nierenfunktion besser abbildet als die alleinige Betrachtung des Serum-Kreatinins.

Zusammenfassend ist in dieser Arbeit erkennbar, dass der Nachweis von Antikörpern im Luminex, vor allem bei Vorhandensein von Antikörpern der HLA-Klasse I oder bei

gleichzeitiger Anwesenheit von Antikörpern der HLA-Klasse I und II eine Erhöhung der Funktionsparameter der Transplantatnieren mit sich bringt. Einige Studien zeigten ähnliche Ergebnisse, die besagen, dass Antikörper, die im Luminex detektiert werden, zu erhöhten Serum-Kreatinin-Werten und einer erhöhten Proteinurie führen. Dies kommt durch antikörpervermittelte Abstoßungen zustande, die das Transplantat schädigen und somit dessen Funktion einschränken. (57), (98), (104), (105), (113), (142)

Andere Arbeiten sahen keinen Vorteil durch die Bestimmung von Antikörpern im Luminex hinsichtlich der Transplantatfunktion. (97), (100), (102), (143)

#### 4.6 MFI-Grenzwert

Gegenstand aktueller Diskussionen bei der Interpretation der Ergebnisse im Luminex ist immer noch der MFI-Grenzwert, ab dem ein Antikörpernachweis als positiv festgelegt wird. In bisherigen Studien variierte dieser zwischen einem MFI-Wert von 300 und über 4000. Durch diese fehlende Einheitlichkeit ist es schwierig, Ergebnisse unterschiedlicher Laboratorien und unterschiedlicher Studien miteinander zu vergleichen. (144)

Einige Arbeiten konnten bestimmte MFI-Grenzwerte identifizieren, die zu einem Nutzen für Organtransplantationen führen. *Caro-Oleas* et al. zeigten bei Vorhandensein von Antikörpern bei einem MFI-Grenzwert von 1500 den stärksten Einfluss auf das Transplantatüberleben. (55) Den größten Profit bei Betrachtung des Spitzen-MFI-Wertes im Vergleich zum aktuellen MFI-Wert sahen *Lefaucheur* et al. (107) Sie wiesen nach, dass die Abstoßungsrate signifikant erhöht ist bei einem MFI-Grenzwert von über 465, das Transplantatüberleben jedoch am niedrigsten ist bei einem MFI-Grenzwert von über 3000. Eine Korrelation zwischen dem Spitzen-MFI-Wert und dem Transplantatverlust konnten auch *Mizutani* et al. feststellen. (145) *Riethmüller* et al. fanden heraus, dass der MFI-Grenzwert von über 900 die größte Sensitivität (75%) und Spezifität (90%) zusammen aufweist, die Spezifität mit steigendem MFI-Grenzwert zunimmt und bei einem MFI-Grenzwert von 5200 100% erreicht. (102) Ein MFI-Grenzwert von über 4000 oder 8000 ist laut *Middleton* et al. mit einem positiven LCT-Crossmatch assoziiert. (95) Anhand des größten Einflusses auf das Transplantatüberleben haben *Otten* et al. einen MFI-Grenzwert von größer als 1000

retrospektiv festgesetzt. (108) Song et al. zeigten, dass die Rate an antikörpervermittelten Abstoßungen proportional mit dem MFI-Wert zunimmt und ein MFI-Grenzwert von 4478 die größte Sensitivität und Spezifität bei Antikörpern der HLA-Klasse II besitzt. (79)

Andere Studien hingegen konnten keinen Unterschied im Zusammenhang zwischen dem MFI-Wert der vorhandenen Antikörper und der Abstoßungsrate sowie des Transplantatüberlebens feststellen. (81), (110), (122)

In dieser Studie wurde anhand unterschiedlicher MFI-Grenzwerte zum einen die Transplantatfunktion untersucht. Hier zeigten sich vor allem bei niedrigeren MFI-Grenzwerten von 1000, 2000 und 3000 signifikant bessere Transplantatfunktionen in Form von renaler Proteinausscheidung und Serum-Kreatinin bei den nicht immunisierten Patienten. Zum anderen wurde das Transplantatüberleben der Empfänger, die keine Antikörper im Luminex aufwiesen, hinsichtlich der verschiedenen MFI-Grenzwerte analysiert. Das Transplantatüberleben bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 war am größten (90,6% nach 138 Monaten) und nahm mit steigenden MFI-Grenzwerten ab, wobei die Unterschiede allesamt nicht signifikant waren (MFI  $\geq$  4000: 84,9% nach 138 Monaten; p-Wert = 0,2250). Zusätzlich wurde noch das Transplantatüberleben in Abhängigkeit des Immunstatus im Luminex mit unterschiedlichen MFI-Grenzwerten geprüft. Nicht immunisierte Patienten besaßen das beste Transplantatüberleben im Vergleich zu antikörperpositiven Empfängern vor allem bei geringeren MFI-Grenzwerten. Die größte Signifikanz war bei einem MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 zu erkennen. In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigt sich in dieser Studie ein MFI-Grenzwert von größer oder gleich 1000 am geeignetsten, um den größtmöglichen Nutzen für Transplantatempfänger zu erzielen.



## 5. Zusammenfassung

Der negative Einfluss auf die Abstoßungsrate, die Transplantatfunktion und das Transplantatüberleben bei Nierentransplantationen von Antikörpern, die im Serum von Transplantatempfängern nachgewiesen werden, ist unumstritten. Die Entwicklung immer sensitiverer Methoden zur Antikörperdetektion wie beispielsweise die Luminex-Technologie wirft jedoch neue Fragen auf: Sind die hier nachgewiesenen, zum Teil sehr niedrigtitrigen Antikörper immer noch relevant für das Outcome von Transplantationen? Oder bergen die hier zusätzlich aufgedeckten Antikörper nur die Gefahr in sich, die Organallokation zu erschweren und mögliche komplikationslose Transplantationen zu verhindern? Zur Beantwortung dieser Fragen erfolgte die Durchführung dieser retrospektiven Studie.

In die Studie wurden Seren von 197 Nierentransplantatempfängern eingeschlossen. Diese Seren wurden vor der Transplantation auf Antikörper im Luminex untersucht und anschließend deren Transplantatfunktion und das Transplantatüberleben in Abhängigkeit vom Antikörperstatus ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine Gegenüberstellung mit den Ergebnissen aus den im Rahmen der aktuellen Richtlinien zur Transplantationskompatibilität durchgeführten Testmethoden LCT und ELISA.

Bei einem Vergleich der drei unterschiedlichen Techniken zum HLA-Antikörpernachweis zeigte sich, dass der Luminex eine deutlich größere Sensitivität als der ELISA und insbesondere als der LCT besitzt. Außerdem war nachweisbar, dass die mittels Luminex Technology nachgewiesenen HLA-Antikörper ein schlechteres Transplantatüberleben bewirken (Graphik 4). Dies zeigte sich insbesondere, wenn HLA-Klasse I oder gleichzeitig HLA-Klasse I und HLA-Klasse II Antikörper bei Patienten vorhanden sind (Graphik 5). Im Gegensatz dazu fanden sich bei der Betrachtung der Patienten mit im LCT oder im ELISA nachgewiesenen HLA-Antikörpern deutlich geringere, klinisch prognostische Hinweise auf das Transplantatüberleben (Graphik 10 und 13).

Das Transplantatüberleben war signifikant besser bei nicht-immunisierten Patienten als bei der Kohorte, die mittels einer der Nachweismethoden HLA-spezifische Antikörper aufwies. Eine Analyse der Transplantatfunktion, die mithilfe der Proteinurie und des Serum-Kreatinins bestimmt wurde, ergab, dass nicht immunisierte Patienten ein besser funktionierendes Transplantat besitzen als antikörperpositive Empfänger.

Ein besonders negativer Einfluss donorspezifischer Antikörper konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die klinische Relevanz der nachgewiesenen HLA-Antikörper erfolgte die Auswertung mit unterschiedlichen MFI Kategorien (MFI 1000, 2000, 3000 und 4000). Anhand dieser Arbeit wurde ein MFI-Grenzwert zur Bestimmung des Antikörperstatus im Luminex von größer oder gleich 1000 im Luminex festgelegt, der am besten mit dem Transplantatoutcome korrelierte. Ein negativer Einfluss donorspezifischer Antikörper konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich dennoch bei MFI Werten über 2000 ein tendenziell schlechteres Transplantatüberleben, wenn donorspezifische Antikörper vorliegen (Graphik 7).

Bei der Betrachtung des Antikörperstatus im LCT und im ELISA war kein Unterschied hinsichtlich des Transplantatüberlebens in Abhängigkeit vom Antikörperstatus sichtbar. Jedoch wurden die Patientenserien mit diesen beiden Methoden vor der Durchführung der Transplantation auf präformierte Antikörper untersucht und bei positiver Befundung eine intensivierete Immunsuppression veranlasst, was zu einer Beeinflussung des Transplantatoutcomes führt. Eine Unterteilung der nicht immunisierten Patienten im LCT und im ELISA anhand des Luminex-Ergebnisses zeigt, dass Patienten, die sowohl im LCT bzw. ELISA als auch im Luminex keine Antikörper aufweisen ein signifikant besseres Transplantatüberleben besitzen als Empfänger, die nur im Luminex immunisiert sind, jedoch nicht im LCT bzw. im ELISA. Dies lässt darauf schließen, dass die Beachtung von Antikörpern, die ausschließlich im Luminex nachgewiesen werden können, zu einem besseren Transplantatoutcome führt. Somit ist eine Durchführung des Luminex in Kombination mit anderen Antikörpernachweisverfahren von Vorteil.

Zur genauen Beantwortung der anfangs aufgeworfenen Fragen bedarf es sicherlich trotz einiger bereits vorhandener Arbeiten – mit zum Teil jedoch sehr unterschiedlichen Ergebnissen – noch zusätzlicher Studien. Auch sollte die Rolle der Denaturierung der HLA-Antigene auf den Beads, die zu falsch positiven und negativen Resultaten führen können, weiter analysiert werden. Außerdem muss der Einfluss komplementaktivierender Antikörper, wie mit der C1q- und C4d-Technik im Luminex nachweisbar, und der Einfluss nicht HLA-spezifischer Antikörper noch genauer erläutert werden.

## 6. Summary

The negative impact of antibodies which are detected in the serum of kidney transplant recipients on the rejection rate, on the graft function and on the graft survival in kidney transplantations is indisputable. The development of increasingly sensitive methods for the detection of antibodies, such as the luminex technology, raises new questions though: Are the antibodies which are detected by the luminex technology and which are partly of low titre still relevant for the outcome of transplantations? Or do the additional antibodies that are discovered just pose the danger of complicating graft allocation and prevent possibly trouble-free transplantations? To answer these questions, this retrospective study has been carried out.

The sera of 197 kidney transplant recipients have been included into this study. First of all, these sera have been tested for antibodies with the luminex technology. Then function and survival of the graft have been evaluated depending on the antibody status. Additionally, these test results have been compared with the results of the LCT and ELISA test methods – the methods suggested by the current guidelines for transplant compatibility.

It has been shown by the comparison of the three different technologies for detection of HLA-antibodies that the sensitivity of luminex is significantly higher than those of ELISA and in particular the LCT. In addition it was verifiable, that the HLA-antibodies detected with the luminex technology cause a more negative graft survival (chart 4). This is the case especially when patients have HLA-class I or both, HLA-class I and II antibodies (chart 5). In contrast to this, the examination of patients with HLA-antibodies detected in the LCT and in the ELISA revealed that there were significantly fewer clinical prognostic indicators for the graft survival (chart 10 and 13).

The graft survival was significantly better with non-immunised patients than with the cohort of patients which had shown HLA-antibodies detected by one of the analytic methods. An analysis of the graft function, which was diagnosed by the proteinuria and the serum creatinine, has shown, that non-immunised patients have a better graft function than antibody-positive recipients. Yet, a particular negative influence of donor specific antibodies could not be detected.

With regard to the clinical relevance of HLA-antibodies, the evaluation was conducted with different MFI categories (MFI 1000, 2000, 3000 and 4000). On the basis of this analysis, an MFI cut-off of higher or equal 1000 in the luminex was determined for the assessment of the antibody status within the luminex as these MFI categories had proven to correlate best with the transplantation outcome. Yet again, a negative influence of donor specific antibodies could not be proved. With regard to MFI categories higher than 2000, however, a rather negative graft survival has been revealed if there were donor specific antibodies (chart 7).

When examining the antibody status within LCT and ELISA, no difference was noted with regard to the graft survival depending on the antibody status. It is to be mentioned, though, that the sera of the patients had been tested with these two methods for preformed antibodies before the transplantation and that a more intensive immunosuppression had been induced when there was a positive test result, which influences the transplantation outcome. A separate evaluation of the non-immunised patients in the LCT and the ELISA on the basis of the luminex result illustrates that patients who neither have antibodies in the LCT or the ELISA respectively nor in the luminex have a significantly better graft survival than recipients, who are immunised only by the Luminex but not by the LCT or the ELISA respectively. This suggests that the notice of antibodies which exclusively can be detected in the Luminex leads to a better transplant outcome. Therefore, it is beneficial to perform luminex in combination with other antibody detection methods.

In order to answer the questions raised above precisely, more studies seem to be necessary – despite the existence of some other analyses which in part arrive at very different conclusions. Also the role of the denaturation of HLA-antigens on the surface of the beads, which can lead to false positive and negative results, should be analysed further. Additionally, the influence of complement-activating antibodies, as detectable with the C1q- and C4d-technique of the luminex, and the influence of non-HLA-specific antibodies is to be further evaluated.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Herold G. Innere Medizin; 2013.
2. Magee CC, Pascual M. Update in Renal Transplantation. Archives of Internal Medicine 2004; 164(3):1373–88.
3. Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H. A Study of the Quality of Life and Cost-utility of Renal Transplantation. Kidney International 1996; 50(1):235–42.
4. Russell JD, Beecroft ML, Ludwin D, Church DN. The Quality of Life in Renal Transplantation – a Prospective Study. Transplantation 1992; 54(4):656–60.
5. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, Held PJ, Port FK. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. The New England Journal of Medicine 1999; 341(23):1725–30.
6. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van der Woude FJ. Impact of Renal Cadaveric Transplantation on Survival in End-Stage Renal Failure: Evidence for Reduced Mortality Risk Compared with Hemodialysis during Long-Term Follow-Up. Journal of the American Society of Nephrology 1998; 9(11):2135–41.
7. Surdacki A, Wieczorek-Surdacka E, Sulowicz W, Dubiel JS. Effect of Having a Functioning Cadaveric Renal Transplant on Cardiovascular Mortality Risk in Patients on Renal Replacement Therapy. Nephrology Dialysis Transplantation 1995; 10(7):1218–23.
8. Parfrey PS, Harnett JD, Foley RN, Kent GM. Impact of Renal Transplantation on Uremic Cardiomyopathy. Transplantation 1995; 60(9):908–14.
9. Eurotransplant. Year Statistics 2014; 2014.
10. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High Survival Rates of Kidney Transplants from Spousal and Living Unrelated Donors. The New England Journal of Medicine 1995; 333(6):333–6.

11. Universitätsklinikum Frankfurt – Allgemein- und Viszeralchirurgie. Available from:  
URL: <http://www.kgu.de/fachkliniken/zentrum-der-chirurgie/ach/allgemein-und-viszeralchirurgie.html>.
12. Bach FH, Amos DB. Hu-1: Major Histocompatibility Locus in Man. *Science* 1967; 156(3781):1506–8.
13. Bodmer WF. The HLA System: Structure and Function. *Journal of Clinical Pathology* 1987; 40(9):948–58.
14. Pedro R. Cytotoxic Antibodies - Valuable Prognostic Factor for Long Term Kidney Allograft Survival. *Journal of Medicine and Life* 2010; 3(4):390–5.
15. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal* 2007; 48(1):11–23.
16. Beck S, Trowsdale J. The Human Major Histocompatibility Complex: Lessons from the DNA Sequence. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2000; 1:117–37.
17. Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Risler T, Bohle A, Müller GA. Expression of HLA-DQ, -DR, and -DP Antigens in Normal Kidney and Glomerulonephritis. *Kidney International* 1989; 35(1):116–24.
18. Eberlein-Gonska M, Sill H, Waldherr R. Expression of Class I and Class II Histocompatibility Antigens in Inflammatory Kidney Diseases. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 1989; 73:117–23.
19. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC Class I-Restricted Antigen Processing. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:323–58.
20. Cresswell P. Assembly, Transport, and Function of MHC Class II Molecules. *Annual Review of Immunology* 1994; 12:259–93.
21. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, Function, and Diversity of Class I Major Histocompatibility Complex Molecules. *Annual Review of Biochemistry* 1990; 59:253–88.

22. Trivedi VB, Dave AP, Dave JM, Patel BC. Human Leukocyte Antigen and Its Role in Transplantation Biology. *Transplantation Proceedings* 2007; 39(3):688–93.
23. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC. Three-dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364:33–9.
24. Zeevi A, Girnita A, Duquesnoy R. HLA antibody analysis: Sensitivity, Specificity, and Clinical Significance in Solid Organ Transplantation. *Immunologic Research* 2006; 36(1-3):255–64.
25. HLA Nomenclature; 2014. Available from: URL: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
26. Buckley MD, Rebecca H. 27. Transplantation immunology: Organ and Bone Marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 111(2):S733–S744.
27. Sanfilippo F, Vaughn WK, Bollinger RR, Spees EK. Comparative Effects of Pregnancy, Transfusion, and Prior Graft Rejection on Sensitization and Renal Transplant Results. 1982; 34(6):360–6.
28. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J. “Natural” Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males. *Transplantation* 2008; 86(8):1111–5.
29. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7., völlig neu bearb. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer; 2003.
30. Rassow J. *Biochemie*. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008. (Duale Reihe).
31. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive Value of HLA Antibodies and Serum Creatinine in Chronic Rejection: Results of a 2-year Prospective Trial. *Transplantation* 2005; 80(9):1194–7.
32. Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, Suberbielle-Boissel C. Determinants of Poor Graft Outcome in Patients with Antibody-Mediated Acute Rejection. *American Journal of Transplantation* 2007; (7):832–41.

33. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial. *American Journal of Transplantation* 2004; (4):438–43.
34. Süsal C, Ovens J, Mahmoud K, Döhler B, Scherer S, Ruhenstroth A, Tran TH, Heinold A, Opelz G. No Association of Kidney Graft Loss With Human Leukocyte Antigen Antibodies Detected Exclusively by Sensitive Luminex Single-Antigen Testing: A Collaborative Transplant Study Report. *Transplantation* 2011; 91(8):883–7.
35. Claas FHJ, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis IIN. The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome. *Transplantation Journal* 2004; 78(2):190–3.
36. Sonnenday CJ, Ratner LE, Zachary AA, Montgomery RA. Preemptive Therapie With Plasmapheresis/Intravenous Immunoglobulin Allows Successful Live Donor Renal Transplantation in Patients with a Positive Cross-Match. *Transplantation Proceedings* 2002; 34(5):1614–6.
37. Jordan SC. Evaluation of Intravenous Immunoglobulin as an Agent to Lower Allo-sensitization and Improve Transplantation in Highly Sensitized Adult Patients with End-Stage Renal Disease: Report of the NIH IG02 Trial. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15(12):3256–62.
38. Zhang Q, Reed EF. Non-MHC Antigenic Targets of the Humoral Immune Response in Transplantation. *Current Opinion in Immunology* 2010; 22(5):682–8.
39. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, Reed EF, Bray RA, Campbell P, Chapman JR, Coates PT, Colvin RB, Cozzi E, Doxiadis IIN, Fuggle SV, Gill J, Glotz D, Lachmann N, Mohanakumar T, Suciú-Foca N, Sumitran-Holgersson S, Tanabe K, Taylor CJ, Tyan DB, Webster A, Zeevi A, Opelz G. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation Journal* 2013; 95(1):19–47.
40. Toki D, Ishida H, Setoguchi K, Shimizu T, Omoto K, Shirakawa H, Iida S, Horita S, Furusawa M, Ishizuka T, Yamaguchi Y, Tanabe K. Acute Antibody-Mediated Rejection in



Living ABO-Incompatible Kidney Transplantation: Long-Term Impact and Risk Factors. *Am J Transplant* 2009; 9(3):567–77.

41. Flint SM, Walker RG, Hogan C, Haeusler MN, Robertson A, Francis DMA, Millar R, Finlay M, Landgren A, Cohn SJ. Successful ABO-Incompatible Kidney Transplantation with Antibody Removal and Standard Immunosuppression. *Am J Transplant* 2011; 11(5):1016–24.

42. Amos DB, Bashir H, Boyle W, MacQueen M, Tiilikainen A. A Simple Micro Cytotoxicity Test. *Transplantation* 1969; 7(3):220–3.

43. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, Jose M. Review Article: Luminex Technology for HLA Antibody Detection in Organ Transplantation. *Nephrology* 2009; 14(2):247–54.

44. Wahrmann M, Exner M, Schillinger M, Haidbauer B, Regele H, Kormoczi GF, Horl WH, Bohmig GA. Pivotal Role of Complement-Fixing HLA Alloantibodies in Presensitized Kidney Allograft Recipients. *Am J Transplant* 2006; 6(5p1):1033–41.

45. Zachary AA, Klingman L, Thorne N, Teresi GA. Variations of the Lymphocytotoxicity Test: An Evaluation of Sensitivity and Specificity. *Transplantation* 1995; 60(5):498–503.

46. Gebel HM, Bray RA. Laboratory Assessment of HLA Antibodies circa 2006: Making Sense of Sensitivity. *Transplantation Reviews* 2006; 20(4):189–94.

47. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, Colovai AI, Stokes MB, Markowitz GS, D'Agati VD, Cohen DJ, Ratner LE, Suciu-Foca N. Relevance of Different Antibody Detection Methods for the Prediction of Antibody-Mediated Rejection and Deceased-donor Kidney Allograft Survival. *Human Immunology* 2009; 70(8):589–94.

48. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280(14):735–9.

49. Stastny P, Salvador I, Lavingia B. Evaluation of the Highly Sensitized Transplant Recipient. *Pediatric Nephrology* 2011; (26):1927–35.

50. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and Antibody Detection in Kidney Transplantation. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16(3):373–81.
51. Minucci PB, Grimaldi V, Casamassimi A, Cacciatore F. Methodologies for Anti-HLA Antibody Screening in Patients Awaiting Kidney Transplant: A Comparative Study. *Experimental and Clinical Transplantation* 2011; (6):381–6.
52. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C. Clinical Relevance of Preformed HLA Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplantation. *Contributions to Nephrology* 2009; 162:1–12.
53. Süsal C, Döhler B, Opelz G. Presensitized Kidney Graft Recipients with HLA Class I and II Antibodies Are at Increased Risk for Graft Failure: A Collaborative Transplant Study report. *Human Immunology* 2009; 70(8):569–73.
54. Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, Serafini M, Messa P, Scalamogna M. Luminex Technology for Anti-HLA Antibody Screening: Evaluation of Performance and of Impact on Laboratory Routine. *Cytometry* 2007; 72B(6):465–71.
55. Caro-Oleas JL, Gonzalez-Escribano MF, Gonzalez-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MA, Nunez-Roldan A. Clinical Relevance of HLA Donor-specific Antibodies Detected by Single Antigen Assay in Kidney Transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012; 27(3):1231–8.
56. Cai J, Terasaki PI. Human Leukocyte Antigen Antibodies for Monitoring Transplant Patients. *Surgery today* 2005; 35(8):605–12.
57. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, Kaplan B, Halloran PF. Antibody-mediated Microcirculation Injury is the Major Cause of Late Kidney Transplant Failure. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2009; 9(11):2520–31.

58. Chinen J, Buckley RH. Transplantation Immunology: Solid Organ and Bone Marrow. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125(2):324–35.
59. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2008; 3(1):189–220.
60. Jennette JC, Heptinstall RH. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2007; 1347–490.
61. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB. Acute Humoral Rejection in Kidney Transplantation: II. Morphology, Immunopathology, and Pathologic Classification. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; (13):779–87.
62. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, Kerjaschki D, Bramböck A, Nagy-Bojarszky K, Regele H. The Cellular Lesion of Humoral Rejection: Predominant Recruitment of Monocytes to Peritubular and Glomerular Capillaries. *Am J Transplant* 2007; 7(2):385–93.
63. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN. Beneficial Effect of Plasmapheresis and Intravenous Immunglobulin on Renal Allograft Survival of Patients with Acute Humoral Rejection. *Transplantation* 2003; (73):1490–5.
64. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the Complement Degradation Product C4d in Renal Allografts: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; 13:242–51.
65. Chakravarti DN, Campbell RD, Porter RR. The Chemical Structure of the C4d Fragment of the Human Complement Component C4. *Molecular Immunology* 1987; 24(11):1187–97.
66. Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18(4):1046–56.
67. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2002; 346(8):580–90.

68. Lee P, Terasaki PI, Takemoto SK. All Chronic Rejection Failures of Kidney Transplants Were Preceded by the Development of HLA Antibodies. *Transplantation* 2002; (74):1192–4.
69. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ. Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7(3):518–26.
70. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive Strategies in Transplantation. *The Lancet* 1999; 353(9158):1083–91.
71. Hricik DE. Steroid-free Immunosuppression in Kidney Transplantation: An Editorial Review. *Am J Transplant* 2002; 2(1):19–24.
72. Ratcliffe PJ, Dudley CRK, Higgins RM, Firth JD, Smith B, Morris PJ. Randomised Controlled Trial of Steroid Withdrawal in Renal Transplant Recipients Receiving Triple Immunosuppression. *The Lancet* 1996; 348(9028):643–8.
73. Sievers TM, Pharm PD, Rossi SJ. Mycophenolate Mofetil. *Pharmacotherapy* 1997; 17(6):1178–97.
74. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman BA. Mycophenolat Mofetil Reduces Late Renal Allograft Loss Independent of Acute Rejection. *Transplantation* 2000; 69(11):2405–9.
75. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S. Mycophenolate Mofetil in Renal Allograft Recipients: A Pooled Efficacy Analysis of Three Randomized, Double-Blind, Clinical Studies in Prevention of Rejection 1. *Transplantation* 1997; 63(1):39–47.

76. Webster AC. Tacrolimus Versus Ciclosporin as Primary Immunosuppression for Kidney Transplant Recipients: Meta-analysis and Meta-regression of Randomised Trial Data. *British Medical Journal* 2005; 331(7520):810–20.
77. Hauser I, Seidl C. Spezielle Therapien für HLA-immunisierte Patienten und bei ABO-differenten Transplantationen, Vorlesung Transfusionsmedizin und Immunhämatologie; 2013.
78. Lee PC, Ozawa M, Hung CJ, Lin YJ, Chang SS, Chou TC. Reappraisal of HLA Antibody Analysis and Crossmatching in Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2009; 41(1):95–8.
79. Song EY, Lee Y, Hyun J, Kim YS, Ahn C, Ha J, Kim SJ, Park MH. Clinical Relevance of Pretransplant HLA Class II Donor-specific Antibodies in Renal Transplantation Patients with Negative T-cell Cytotoxicity Crossmatches. *Ann Lab Med* 2012; 32(2):139.
80. Thiyagarajan UM, Bagul A, Frost J, Horsburgh T, Nicholson ML. Role of Human Leukocyte Antigen, Donor-Specific Antibodies, and Their Impact in Renal Transplantation. *Transplantation Proceedings* 2012; 44(5):1231–5.
81. Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G, Pascual M. Low Levels of Human Leukocyte Antigen Donor-specific Antibodies Detected by Solid Phase Assay Before Transplantation Are Frequently Clinically Irrelevant. *Human Immunology* 2009; (70):580–3.
82. van den Berg-Loonen EM, Billen EVA, Voorter CEM, van Heurn LWE, Claas FHJ, van Hooff JP, Christiaans MHL. Clinical Relevance of Pretransplant Donor-Directed Antibodies Detected by Single Antigen Beads in Highly Sensitized Renal Transplant Patients. *Transplantation* 2008; 85(8):1086–90.
83. Zachary AA, Sholander JT, Houp JA, Leffell MS. Using Real Data for a Virtual Crossmatch. *Human Immunology* 2009; 70(8):574–9.
84. Phelan D, Pang S, Phelan C, Grant G, Land G. 23-P: When is Sensitive Is Too Sensitive? *Human Immunology* 2007; 68(1):27.

85. Slavcev A. Prediction of Organ Transplant Rejection by HLA-specific and Non-HLA Antibodies - Brief Literature Review. *Int J Immunogenet* 2013; 40(2):83–7.
86. Terasaki PI, Marchioro TL, Starzl TE. Sero-typing of Human Lymphocyte Antigens: Preliminary Trials on Long-term Kidney Homograft Survivors. *Histocompatibility Testing* 1965:83–96.
87. Saito PK, Yamakawa RH, Pereira LCM, da Silva WV, Borelli SD. Complement-dependent Cytotoxicity (CDC) to Detect Anti-HLA Antibodies: Old but Gold. *Journal of clinical laboratory analysis* 2014; 28(4):275–80.
88. Saidman SL. Histocompatibility Testing for Highly Sensitized Transplant Candidates. *Transplantation Proceedings* 2007; 39(3):673–5.
89. Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, Saji H, Kohara S, Katayama A, Takeda A, Watarai Y, Uchida K. Significant Association between Chronic Antibody-mediated Rejection and Donor-specific Antibodies against HLA-DRB Rather than DQB in Renal Transplantation. *Human Immunology* 2011; 72(1):11–7.
90. Pretl K, Chesterton KA, Sholander JT, Leffell MS. Accurate Rapid Characterization Of HLA-specific Antibody Using Luminex Technology. *Human Immunology* 2003; 64:108.
91. El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA Antibody Identification With Single Antigen Beads Compared To Conventional Methods. *Human Immunology* 2005; 66(9):989–97.
92. Weinstock C, Schnaidt M. The Complement-mediated Prozone Effect in the Luminex Single-antigen Bead Assay and Its Impact on HLA Antibody Determination in Patient Sera. *Int J Immunogenet* 2013; 40(3):171–7.
93. Taylor CJ, Kosmoliaptsis V, Summers DM, Bradley JA. Back to the Future: Application of Contemporary Technology to Long-standing Questions about the Clinical Relevance of Human Leukocyte Antigen-specific Alloantibodies in Renal Transplantation. *Human Immunology* 2009; 70(8):563–8.

94. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA Antibody Specification Using Single-antigen Beads – a Technical Solution for the Prozone Effect. *Transplantation* 2011; 92(5):510–5.
95. Middleton D, Jones J, Lowe D. Nothing's Perfect: the Art of Defining HLA-specific Antibodies. *Transplant Immunology* 2014; 30(4):115–21.
96. Bundesärztekammer. Richtlinie zur medizinischen Beurteilung von Organspendern und zur Konservierung von Spenderorganen gemäß § 16 Abs. 1 S.1 Nr. 4 a) und b) TPG.
97. Gupta A, Iveson V, Varaganam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC. Pretransplant Donor-Specific Antibodies in Cytotoxic Negative Crossmatch Kidney Transplants: Are They Relevant? *Transplantation* 2008; 85(8):1200–4.
98. Fidler SJ, Irish AB, Lim W, Ferrari P, Witt CS, Christiansen FT. Pre-transplant Donor Specific Anti-HLA Antibody is Associated with Antibody-mediated Rejection, Progressive Graft Dysfunction and Patient Death. *Transplant Immunology* 2013; 28(4):148–53.
99. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, Süsal C. Influence of Test Technique on Sensitization Status of Patients on the Kidney Transplant Waiting List. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2013; 13(8):2075–82.
100. David-Neto E, Souza PS, Panajotopoulos N, Rodrigues H, Ventura CG, David DSR, Lemos FBC, Agena F, Nahas WC, Kalil JE, Castro MCR. The Impact of Pretransplant Donor-specific Antibodies on Graft Outcome in Renal Transplantation: A Six-year Follow-up Study. *Clinics* 2012; 67(4):355–61.
101. Poli F, Cardillo M, Scalamogna M. Clinical Relevance of Human Leukocyte Antigen Antibodies in Kidney Transplantation from Deceased Donors: The North Italy Transplant Program Approach. *Human Immunology* 2009; (70):631–5.

102. Riethmüller S, Ferrari-Lacraz S, Müller MK, Raptis DA, Hadaya K, Rüsi B, Laube G, Schneiter G, Fehr T, Villard J. Donor-Specific Antibody Levels and Three Generations of Crossmatches to Predict Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation Journal* 2010; 90(2):160–7.
103. Pollinger HS, Stegall MD, Gloor JM, Moore SB. Kidney Transplantation in Patients with Antibodies against Donor HLA Class II. *American Journal of Transplantation* 2007 2007; (7):857–63.
104. Issa N, Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Dean PG, Moore SB, DeGoey S, Stegall MD. Transplant Glomerulopathy: Risk and Prognosis Related to Anti-human Leukocyte Antigen Class II Antibody Levels. *Transplantation* 2008; 86(5):681–5.
105. Mao Q, Terasaki PI, Cai J, Briley K, Catrou P, Haisch C, Rebellato L. Extremely High Association Between Appearance of HLA Antibodies and Failure of Kidney Grafts in a Five-Year Longitudinal Study. *Am J Transplant* 2007; 7(4):864–71.
106. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, Martinez F, Thervet E, Méjean A, Charron D, Duong van Huyen JP, Bruneval P, Legendre C, Nochy D. Outcome of Subclinical Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies. *Am J Transplant* 2009; 9(11):2561–70.
107. Lefaucheur C, Loupy A, Hill CS, Andrade J. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 21:1398–406.
108. Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, Hené RJ, van Zuilen AD. Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and -II Antibodies Are Associated With an Increased Risk for Kidney Graft Failure. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2012; 12(6):1618–23.
109. Nascimento E, Fabreti de Oliveira RA, Maciel MD, Pereira AB, das Mercêz de Lucas F, Salomão-Filho A, Pereira WA, Moreira JB, Vilaça SS, de Castro Gontijo R, Lasmar MF,



Vianna HR, Magalhães A, Calazans CAC, Simão-Filho C, Vilela B. Kidney Transplantation: Evaluation and Clinical Outcome of 237 Recipients at Low, Medium, High, or Strong Immunological Risk of Rejection. *Transplantation Proceedings* 2014; 46(1):101–7.

110. Amico P, Höner G, Mayr M, Steiger J. Clinical Relevance of Pretransplant Donor-Specific HLA Antibodies Detected by Single-Antigen Flow-Beads. *Transplantation* 2009; 87(11):1681–8.

111. Wahrmann M, Bartel G, Exner M, Regele H, Körmöczi GF, Fischer GF, Böhmig GA. Clinical Relevance of Preformed C4d-fixing and Non-C4d-fixing HLA Single Antigen Reactivity in Renal Allograft Recipients. *Transplant International* 2009; 22(10):982–9.

112. Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, Gentil-Govantes MÁ, Acevedo MJ, González-Roncero FM, Blanco GB, Núñez-Roldán A. Clinical Relevance of Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Detected by Luminex Assay in the Development of Rejection After Renal Transplantation. *Transplantation Journal* 2012; 94(4):338–44.

113. Tsapepas DS, Vasilescu R, Tanriover B, Coppleson Y, Rekhtman Y, Hardy MA, Dube G, Crew RJ, Ratner LE, Cohen DJ, Mohan S. Preformed Donor-specific Antibodies and Risk of Antibody-mediated Rejection in Repeat Renal Transplantation. *Transplantation* 2014; 97(6):642–7.

114. Gibney EM. Detection of Donor-specific Antibodies Using HLA-coated Microspheres: Another Tool for Kidney Transplant Risk Stratification. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; 21(9):2625–9.

115. Qiu J, Cai J, Terasaki PI, El-Awar N, Lee JH. Detection of Antibodies to HLA-DP in Renal Transplant Recipients Using Single Antigen Beads. *Transplantation* 2005; 80(10):1511–3.

116. Nelson KA, Youngs D, Marks WH, Davis CL. Acute Humoral Rejection is Associated with Antibodies to HLA-DP. *Am J Transplant* 2005; 5(Suppl. 11):245.

117. Pei R, Bray R, Lopez-Cepero M, Lee JH. Detection of Antibodies against Beta2-microglobulin Free HLA heavy chains using FlowPRA Beads. Terasaki PI (ed): Visuals of the Clinical Histocompatibility Workshop 2000:9.
118. Pereira S, Perkins S, Lee JH, Shumway W, LeFor W, Lopez-Cepero M, Wong C, Connolly A, Tan JC, Grumet FC. Donor-specific Antibody Against Denatured HLA-A1: Clinically nonsignificant? *Human Immunology* 2011; 72(6):492–8.
119. Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schönemann C. Intact HLA Not  $\beta$ 2m-free Heavy Chain-Specific HLA Class I Antibodies Are Predictive of Graft Failure. *Transplantation* 2009; 88(2):226–30.
120. Ravindranath MH, Taniguchi M, Chen C, Ozawa M, Kaneku H, El-Awar N, Cai J, Terasaki PI. HLA-E Monoclonal Antibodies Recognize Shared Peptide Sequences on Classical HLA Class Ia: Relevance to Human Natural HLA Antibodies. *Molecular Immunology* 2010; 47(5):1121–31.
121. Smith JD, Hamour IM, Banner NR, Rose ML. C4d Fixing, Luminex Binding Antibodies – a New Tool for Prediction of Graft Failure after Heart Transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007; 7(12):2809–15.
122. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, Suberbielle C, Frémeaux-Bacchi V, Méjean A, Desgrandchamps F, Anglicheau D, Nochy D, Charron D, Empana JP, Delahousse M, Legendre C, Glotz D, Hill GS, Zeevi A, Jouven X. Complement-binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-allograft Survival. *The New England Journal of Medicine* 2013; 369(13):1215–26.
123. Lawrence C, Willicombe M, Brookes PA, Santos-Nunez E, Bajaj R, Cook T, Roufosse C, Taube D, Warrens AN. Preformed Complement-Activating Low-Level Donor-Specific Antibody Predicts Early Antibody-Mediated Rejection in Renal Allografts. *Transplantation Journal* 2013; 95(2):341–6.

124. Arnold ML, Dechant M, Doxiadis IIN, Spriewald BM. Prevalence and Specificity of Immunoglobulin G and Immunoglobulin A Non-complement-binding Anti-HLA Alloantibodies in Retransplant Candidates. *Tissue Antigens* 2008; 72(1):60–6.
125. McCalmon RT Jr, Tardif GN, Sheehan MA, Fitting K, Kortz W, Kam I. IgM Antibodies in Renal Transplantation. *Clinical Transplantation* 1997; 11(6):558–64.
126. Kerman RH, Susskind B, Buyse I. Flow Cytometry-detected IgG is Not a Contraindication to Renal Transplantation: IgM May Be Beneficial to Outcome. *Transplantation* 1999; 68(12):1855–8.
127. Stastny P, Ring S, Lu C, Arenas J, Han M, Lavingia B. Role of Immunoglobulin (Ig)-G and IgM Antibodies against Donor Human Leukocyte Antigens in Organ Transplant Recipients. *Human Immunology* 2009; 70(8):600–4.
128. Opelz G. Non-HLA Transplantation Immunity Revealed by Lymphocytotoxic Antibodies. *The Lancet* 2005; 365(9470):1570–6.
129. Michelon T, Sandri C, Osawa M, Terasaki P, Neumann J. 24-P: Pre Transplant Anti MICA Antibodies and Long Term Follow Up in Deceased Donor Kidney Transplants. *Human Immunology* 2007; 68(1):S27.
130. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *The New England Journal of Medicine* 2007; 357(13):1293–300.
131. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year Follow-up of a Prospective Trial of HLA and MICA Antibodies on Kidney Graft Survival. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007; 7(2):408–15.
132. Lemy A, Andrien M, Wissing KM, Ryhahi K, Vandersarren A, Racapé J, Heylen C, Ghisdal L, Broeders E, Vereerstraeten P, Toungouz M, Abramowicz D. Major Histocompatibility Complex Class 1 Chain-Related Antigen A Antibodies: Sensitizing

Events and Impact on Renal Graft Outcomes. *Transplantation Journal* 2010; 90(2):168–74.

133. Duquesnoy RJ. A Structurally Based Approach to Determine HLA Compatibility at the Humoral Immune Level. *Human Immunology* 2006; 67(11):847–62.

134. Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Borrelli L, Monaco PI, Scornajenghi A, Tisone G, Adorno D. Public Epitope Specificity of HLA Class I Antibodies Induced by a Failed Kidney Transplant: Alloantibody Characterization by Flow Cytometric Techniques. *Transplantation* 2006; 81(9):1298–305.

135. Thauinat O, Hanf W, Dubois V, McGregor B, Perrat G, Chauvet C, Touraine JL, Morelon E. Chronic Humoral Rejection Mediated by Anti-HLA-DP Alloantibodies: Insights into the Role of Epitope Sharing in Donor-specific and Non-donor specific Alloantibodies Generation. *Transplant Immunology* 2009; 20(4):209–11.

136. Mongkolsuk T, Ingsathit A, Worawichawong S, Jirasiritham S, Kitpoka P, Thammanichanond D. Shared Molecular Eplet Stimulates Acute Antibody-mediated Rejection in a Kidney Transplant Recipient with Low-level Donor-specific Antibodies: a Case Report. *Transplantation Proceedings* 2014; 46(2):644–7.

137. Bosch A, Llorente S, Diaz JA, Salgado G, López M, Boix F, López-Hernández R, González-Soriano MJ, Campillo JA, Moya-Quiles MR, Perez-Lopez N, Minguela A, Jimeno L, Alvarez-López MR, Muro M. Low Median Fluorescence Intensity Could Be a Nonsafety Concept of Immunologic Risk Evaluation in Patients with Shared Molecular Eplets in Kidney Transplantation. *Human Immunology* 2012; 73(5):522–5.

138. Christiaans MH, Nieman F, van Hooff JP, van den Berg-Loonen EM. Detection of HLA Class I and II Antibodies by ELISA and Complement-dependent Cytotoxicity Before and After Transplantation. *Transplantation* 2000; 69(5):917–27.

139. Cicora F, Mos F, Roberti J. Trasplante Renal en Pacientes con Anticuerpos Dirigidos contra Donante. *Medicina* 2014; 74(5):400–3.

140. Riella LV, Safa K, Yagan J, Lee B, Azzi J, Najafian N, Abdi R, Milford E, Mah H, Gabardi S, Malek S, Tullius SG, Magee Colm, Chandraker A. Long-term Outcomes of Kidney Transplantation across a Positive Complement-dependent Cytotoxicity Crossmatch. *Transplantation* 2014; 97(12):1247–52.
141. Muro M, Llorente S, Marin L. Acute Vascular Rejection Mediated by HLA Antibodies in a Cadaveric Kidney Recipient: Discrepancies between FlowPRA, ELISA and CDC vs Luminex Screening. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2005; (20):223–6.
142. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, DeGoey S, Griffin MD, Larson TS, Cosio FG. Transplant Glomerulopathy: Subclinical Incidence and Association with Alloantibody. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007; 7(9):2124–32.
143. Sis B, Campbell PM, Mueller T, Hunter C, Cockfield SM, Cruz J, Meng C, Wishart D, Solez K, Halloran PF. Transplant Glomerulopathy, Late Antibody-mediated Rejection and the ABCD Tetrad in Kidney Allograft Biopsies for Cause. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007; 7(7):1743–52.
144. Robson A, Jones J, Cullen K, McKenzie D. MFI Values Don't Travel: Results of an Inter-centre Study. *Transplant International* 2011; 24(Supplement 2):357.
145. Mizutani K, Terasaki P, Hamdani E, Esquenazi V. The Importance of Anti-HLA-Specific Antibody Strength in Monitoring Kidney Transplant Patients. *American Journal of Transplantation* 2007; 7:1027–31.

## 8. Eigene Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden veröffentlicht.

### Originalarbeit (Peer Reviewed)

Richter R, Süsal C, Köhler S, Qidan S, Schödel A, Holschuh L, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Herrmann E, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Seidl C, Hauser IA. Pretransplant Human Leukocyte Antigen Antibodies Detected by Single-antigen Bead Assay Are a Risk Factor for Long-term Kidney Graft Loss Even in the Absence of Donor-specific Antibodies. *Transplant International* 2016;29(9):988-98.

### Kurzveröffentlichungen (Abstracts)

Richter R, Schödel A, Holschuh L, Feuchtinger S, Qidan S, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Hauser IA, Seidl C. The Highly Sensitive Single Antigen Bead Luminex Assay Leads to an Increased Number of Immunized and Highly Immunized Patients on the Kidney Waiting List. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik, 5.– 7. September 2013, Heidelberg, *Clinical Laboratory* 2013; 59:66.

Richter R, Schödel A, Holschuh L, Feuchtinger S, Qidan S, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Hauser IA, Seidl C. Comparison of the Single Antigen Bead Luminex Assay and ELISA in Patients on the Kidney Waiting List and with a Kidney Transplantation. 22th Annual Congress of the German Transplantation Society, Frankfurt, Oral presentation. *Transplant International* 2013; 26 (S1):23; V83.

Richter R, Holschuh L, Schödel A, Feuchtinger S, Qidan S, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Hauser I.A., Seidl C. Single Antigen Bead Assay (Luminex) Allows Detection of Immunized Patients with an Increased Risk for Long Term Graft Survival Prior to Transplantation. ZTG-P23, p101, *Transfusion Medicine And Hemotherapy* 2014; 41 (S1):101; ZTG-P23.

Richter R, Holschuh L, Schödel A, Feuchtinger S, Qidan S, Schulz M, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Süsal C, Hauser IA, Seidl C.

Combined Preexisting HLA Class-I and HLA Class-II Antibodies Trigger Functional Deterioration and Graft Loss in Renal Transplantation. 22nd DGI and Loewe Symposium „Cell and Gene Therapy in Transplantation Immunology“, Frankfurt, 25.–27. Sept. 2014, Clinical Laboratory 2014; 60:20; P35.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Anna-Alicia Lydia Niedermayer, geb. Schödel  
Geburtsdaten: 24.11.1988 in Neumarkt i.d.OPf.  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet, keine Kinder  
Wohnort: 95447 Bayreuth

### Ausbildung

06/2008 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7) am Ostendorfer-Gymnasium/Neumarkt i.d.OPf. (neusprachlicher Zweig)  
10/2008 – 11/2014 Hochschulstudium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Seit 02/2012 Dissertation zum Thema „*Bedeutung der Single Antigen Luminex Technologie für den Nachweis HLA-spezifischer Antikörper in der Nierentransplantation*“ bei Prof. Dr. med. Christian Seidl am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Frankfurt am Main  
11/2014 Ablegung der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,16) und Erlangung der Approbation

### Beruflicher Werdegang

Seit 04/2015 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie am Klinikum Bayreuth

Bayreuth, 13.12.2016



## 10. Danksagung

Ich möchte mich hiermit von Herzen bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Seidl bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Anleitung, Betreuung und Unterstützung an seinem Institut durchzuführen.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Dr. med. Rudolf Richter für seine Denkanstöße, geschätzte Kritik und intensive Betreuung.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Lisa Holschuh für die freundschaftliche Zusammenarbeit und dem gesamten Team des HLA-Labors für die Unterstützung und stete Hilfestellung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann und meinen Eltern, die mich während der ganzen Zeit unermüdlich unterstützt, liebevoll aufgebaut und motiviert haben. Ohne sie wäre die Arbeit so nicht möglich gewesen.

## 11. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung der Single Antigen Luminex Technologie für den Nachweis HLA-spezifischer Antikörper in der Nierentransplantation

an dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Christian Seidl mit Unterstützung durch Dr. Rudolf Richter ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Originalarbeit (Peer Reviewed)

Richter R, Süsal C, Köhler S, Qidan S, Schödel A, Holschuh L, Brzoska M, Asbe-Vollkopf A, Büttner S, Betz C, Herrmann E, Gauer S, Seifried E, Geiger H, Seidl C, Hauser IA. Pretransplant Human Leukocyte Antigen Antibodies Detected by Single-antigen Bead Assay Are a Risk Factor for Long-term Kidney Graft Loss Even in the Absence of Donor-specific Antibodies. *Transplant International* 2016;29(9):988-98.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)