

Aus dem Transplantationszentrum München Klinikum Großhadern

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Bruno Meiser

Korrelation des Impfansprechens auf Hepatitis-B- Impfung mit der Entstehung von HLA-Antikörpern nach Nierentransplantation

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maximilian Link

aus

München

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Antje Habicht

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Bogner
PD Dr. med. M. Stangl**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Teresa Kauke**

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2020

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
VORWORT	7
1. EINLEITUNG	8
1.1. NIERENTRANSPLANTATION	8
1.2. HLA-SYSTEM.....	9
1.3. HLA-ANTIKÖRPER.....	11
<i>Präformierte anti-HLA-Antikörper</i>	12
<i>DeNovo donorspezifische Antikörper</i>	12
<i>Diagnostik</i>	15
1.4. TRANSPLANTATABSTOßUNG (REJEKTION).....	17
<i>Diagnostik</i>	18
1.5. HEPATITIS-B-VIRUS(-INFEKTION).....	20
1.6. HEPATITIS-B-IMPfung BEI CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ	21
2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	25
3. METHODIK	26
3.1. PATIENTENKOLLEKTIV	26
3.2. DATENQUELLEN	28
3.3. PARAMETER	29
3.4. BESTIMMUNG ANTI-HBS-TITER	30
3.5. HLA-DIAGNOSTIK.....	31
3.6. ABSTOßUNGSDIAGNOSTIK	32
3.7. STATISTIK	33
4. ERGEBNISSE	34
4.1. DEMOGRAPHIE	34
4.2. EINFLUSSFAKTOREN AUF HBV-IMPFERFOLG	37
4.3. TRANSPLANTATABSTOßUNG	41
4.4. TRANSPLANTATFUNKTION.....	42
4.5. TRANSPLANTATÜBERLEBEN.....	44
4.6. ENTSTEHUNG DENOVO ANTI-HLA-ANTIKÖRPER	44
5. DISKUSSION	47
5.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	47
5.2. LIMITATIONEN DER STUDIE	49

6.	ZUSAMMENFASSUNG	51
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	52
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
9.	TABELLENVERZEICHNIS	58
10.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	59

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMR	antibody-mediated Rejektion
AR	Akute Rejektion
BMI	Body Mass Index
DSA	donor-spezifische HLA-Antikörper
dnDSA	de Novo donor-spezifische HLA-Antikörper
eGFR	errechnete glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESRD	end-stage renal disease (Niereninsuffizienz im Endstadium)
ET	Eurotransplant
IgG	Immunglobulin Typ G
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HBV	Hepatitis B-Virus
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes – Leitlinien
KI	Konfidenz-Intervall
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Mismatch
NAHAS	nicht-akzeptable HLA-Antikörper
nDSA	nicht-donor-spezifische HLA-Antikörper

NTx	Nierentransplantation
NR	(Impf-)Non-Responder
R	(Impf-)Responder
SAB	Single Antigen Bead Assay
STIKO	ständige Impfkommission des Robert-Koch-Instituts

Vorwort

Die Organspendebereitschaft – insbesondere in Deutschland – nimmt seit dem Transplantationsskandal die letzten Jahre kontinuierlich ab. Bei zunehmender Alterung der Bevölkerung steigt zeitgleich jedoch die Nachfrage nach Spenderorganen. Vor diesem Hintergrund ist eines der Zentralthemen der Transplantationsmedizin, eine perfekte Allokation zwischen Spender und Empfänger gewährleisten zu können und im Vorfeld Faktoren identifizieren zu können, die zu einer Transplantatabstoßung führen. Gerade in den letzten Jahren wurde das Aufkommen sog. de-Novo – also nach Transplantation entstehenden – donorspezifischen anti-HLA-Antikörpern mit einem höheren Risiko für ein Transplantatversagen in Verbindung gebracht.

Mit dieser Thematik befasste sich auch die Arbeitsgruppe meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Antje Habicht. Ihr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für die konstruktive Kritik und die umfangreiche Betreuung und Unterstützung in allen Belangen der Arbeit danken. Weiterhin gilt mein Dank Frau PD Dr. Teresa Kauke für die Hilfsbereitschaft bei der Ausarbeitung der Fragestellung und unterschiedlicher immunologischer Gesichtspunkte. Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits in Form eines Papers im Journal *Transplant Immunology* veröffentlicht [1].

1. Einleitung

Bei einem permanenten Funktionsverlust beider Nieren wird ein Nierenersatztherapie lebensnotwendig. Hierbei stehen einerseits die verschiedenen Dialyseverfahren zur Verfügung, andererseits gibt es unter bestimmten Voraussetzungen die Möglichkeit einer Nierentransplantation. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Möglichkeit einer Nierentransplantation stets in Betracht gezogen werden sollte, da die Transplantation in Bezug auf die Lebensqualität und das langfristige Überleben der Patienten den Nierenersatzverfahren überlegen ist [2, 3]. Ursachen für den Funktionsverlust der Nieren und die daraus folgende Notwendigkeit einer Transplantation können angeboren oder erworben sein. An erster Stelle der Grunderkrankungen (nach ICD-10-Diagnosen) bei Neuanmeldungen zur Nierentransplantation im Jahre 2017 steht die zystische Nierenerkrankung, dicht gefolgt von der Diagnose chronische Nierenkrankheit [4]. Weiter ursächlich sind Diabetes mellitus Typ I und II, die hypertensive Nierenerkrankung, das nephrotische Syndrom und viele mehr [4].

1.1. Nierentransplantation

Im Jahr 2017 wurden in Deutschland insgesamt 1921 Nierentransplantationen durchgeführt, davon 557 nach Nierenlebendspenden und 1364 nach post-mortaler Spende [4]. Damit ist die Niere das mit Abstand am häufigsten transplantierte Organ in Deutschland.

Leider warten deutlich mehr potentielle Empfänger auf ein Organ als Spender gemeldet werden. So waren im Jahr 2017 7924 Patienten aktiv für eine Nierentransplantation gelistet [5]. Der Spendermangel wurde verstärkt durch den Transplantationsskandal im Jahre 2010/11, welcher in der deutschen Medienlandschaft stark thematisiert wurde und zu einem Vertrauensverlust sowohl in der Bevölkerung als auch beim medizinischen und pflegerischen Personal in den Spenderkrankenhäusern führte. Dementsprechend ist in den letzten Jahren die Anzahl an gespendeten Organen kontinuierlich gesunken, so konnte 2010 noch ein Höchstwert von 2937 durchgeführten Nierentransplantationen verzeichnet werden, während 2017 die Anzahl nur noch bei 1921 Transplantationen lag (weiterer Rückgang zuletzt von 2016 auf 2017 um über 9%) [4]. Im europäischen Vergleich (Eurotransplant-Länder) lag Deutschland 2017 mit einer Spenderquote von 9,3

Spender pro 1 Million Einwohner auf dem letzten Platz nach den Niederlanden mit 14,3 Organspender pro 1 Million Einwohner [5].

Deutschland beteiligt sich an dem Verbund Eurotransplant (ET), einer gemeinnützigen Organisation, zu dem sich inzwischen 8 Länder (Belgien, Deutschland, Niederlande, Österreich, Luxemburg, Kroatien, Ungarn und Slowenien) zusammengeschlossen haben. Das vorrangige Ziel der Organisation ist die optimale Verteilung der post-mortalen Spenderorgane und -gewebe [5].

Die Zuteilung der post-mortalen Spenderorgane, die sog. Allokation, erfolgt nach medizinischen und ethischen Kriterien. Es fließen die Dauer der Wartezeit (Beginn mit dem ersten Tag der Dialysepflichtigkeit), die örtliche Distanz zwischen Spenderkrankenhaus und dem Transplantationszentrum des Empfängers [6], sowie die genetische Übereinstimmung (HLA-Match) zwischen Spender und Empfänger mit ein.

1.2. HLA-System

Das humane Leukozytenantigen-System (HLA-System) - der Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) beim Menschen - wird von Genen auf dem Chromosom 6 kontrolliert. Es kodiert Oberflächenproteine (HLA-Antigene bzw. MHC-Moleküle), die für die Antigenpräsentation an den T-Zell-Rezeptor verantwortlich sind und somit immunologische Vorgänge regulieren. Das HLA-System ist für das Immunsystem von wesentlicher Bedeutung, um zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen zu entscheiden.

Es können zwei Hauptklassen von MHC Molekülen unterschieden werden. Die MHC-Klasse I-Moleküle werden von den Genen HLA-A, -B und -C kodiert. Sie bestehen aus einer schweren α -Kette mit drei einzelnen Domänen und einem β -2-Mikroglobulin-Molekül, bei dem kein Polymorphismus bekannt ist – d.h. welches bei allen Individuen identisch ist (siehe Abbildung 1). MHC-I-Rezeptoren präsentieren intrazellulär gebildete Proteine (z.B. virale Proteine) vornehmlich an zytotoxische T-Zellen (auch CD8+-T-Zellen genannt), die über Ausschüttung von Perforin und Granzyme B zum Tod der infizierten und/oder fremden Zellen führen. Im Falle einer Transplantation werden die Spender-MHC-I Moleküle als fremd erkannt und führen

zu einer direkten Antigenerkennung. MHC-I-Oberflächenproteine befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten.

Währenddessen verarbeiten MHC-II-Zellen exogene Proteine (z.B. Spender-MHC-Moleküle) und präsentieren diese den T-Helfer-Zellen, den sog. CD4+-T-Zellen, welche daraufhin z.B. B-Zellen zur Differenzierung und Bildung von Antikörpern anregen. Dies wird als indirekte Antigenerkennung bezeichnet. MHC-II-Rezeptoren sind auf professionellen antigen-präsentierenden Zellen vorhanden (dendritische Zellen, Makrophagen etc.). Die MHC-Klasse II Moleküle werden über die Gene HLA-DP, -DQ und -DR kodiert. Sie bestehen aus zwei Ketten – einer schweren α - und einer leichten β -Kette - mit jeweils zwei Domänen (siehe Abbildung 1). Es gibt jedoch auch noch weitere Gewebemerkmale, sog. Non-HLA-Antigene (z.B. Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor oder „MICA“), die allem Anschein nach auch einen immunologischen Einfluss unabhängig von der HLA-Kompatibilität auf den Transplantationserfolg haben [7].

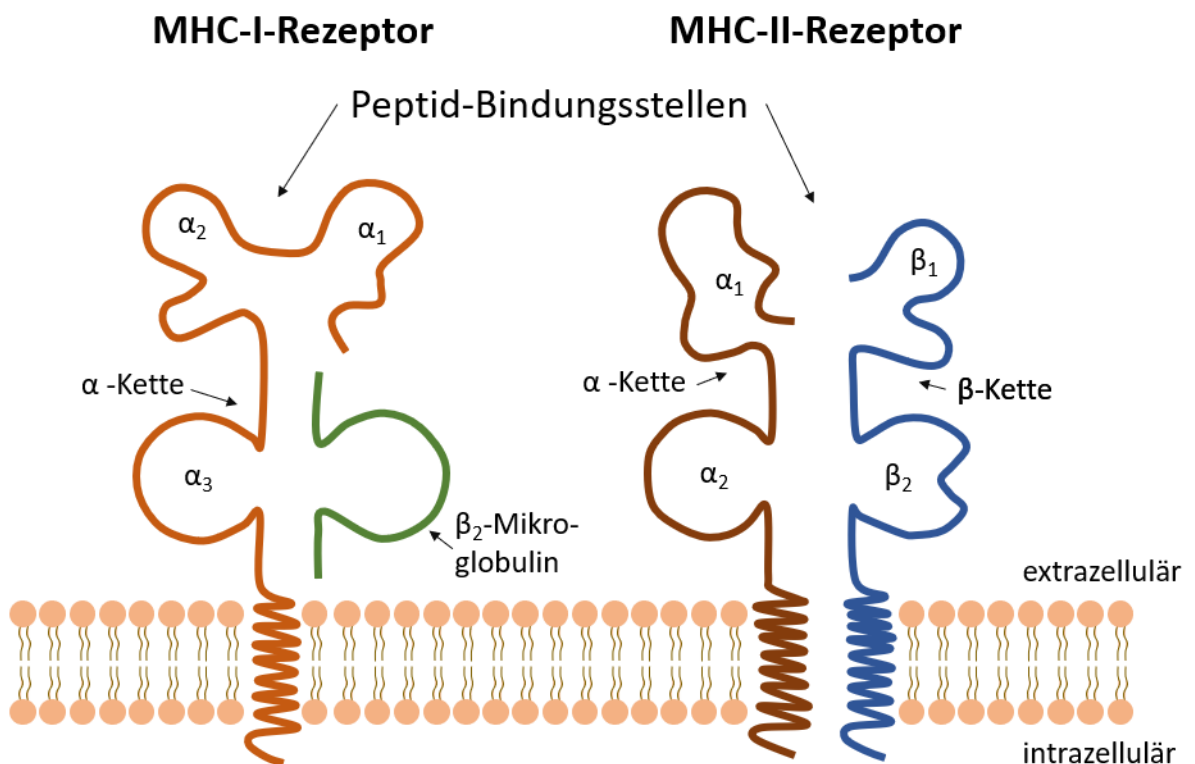


Abbildung 1: Aufbau der MHC-Rezeptoren I und II im Detail

Die Gene für die MHC-Rezeptoren befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und werden kodominant von beiden Elternteilen vererbt. Durch den Polymorphismus der Gene sind so über 10.000 unterschiedliche HLA-Kombinationen möglich. Da also je ein mütterliches als auch ein väterliches Allel der HLA-Merkmale beider Klassen vererbt wird, werden im Organismus 6 unterschiedliche MHC-I-Moleküle und 6 unterschiedliche MHC-II-Moleküle exprimiert. Aufgrund dieses Vererbungsmechanismus verfügen demnach eineiige Zwillinge über identische HLA-Merkmale, während Geschwister eine 25%-Wahrscheinlichkeit aufweisen, in den HLA-Allelen übereinzustimmen.

Umso besser die Übereinstimmung der HLA-Antigene von Spender und Empfänger (Match) ist, umso erfolgreicher ist das langfristige Transplantatüberleben [8, 9]. Ein HLA-Mismatch von 0 (sog. Full-House-Match) bezeichnet hierbei eine Übereinstimmung in allen 3 HLA-Merkmalen, während ein HLA-Mismatch von 6 eine Diskrepanz in allen 3 Merkmalen darstellt. Ein hohes HLA-Mismatch ist ein Risikofaktor insbesondere für die frühe Transplantatabstoßung (OR, 12.27; 95% CI, 2.46–64.19) [10], so reduziert ein HLA-Mismatch von 6 das mittlere Transplantatüberleben um 17% im Vergleich zu einem Full-House-match [8]. Insbesondere scheint die Übereinstimmung der HLA-Klasse -DR entscheidend für ein langfristiges Transplantatüberlebens zu sein [9]. Bei ET werden daher die HLA-Antigene -A, -B und -DR bei der Allokation berücksichtigt. Für die Entstehung von anti-HLA-Antikörpern ist ein HLA-Mismatch ein signifikanter Risikofaktor [11].

1.3. HLA-Antikörper

Anti-HLA-Antikörper entstehen durch sogenannte Immunisierungsereignisse. Hierunter fallen Bluttransfusionen, Transplantationen oder Schwangerschaften. Man unterscheidet zwischen präformierten Antikörpern, also solchen, die bereits vor einer Transplantation bzw. Re-Transplantation vorliegen, und „de Novo“ Antikörpern, die im Rahmen der erfolgten Transplantation gebildet werden. Außerdem wird zwischen Antikörpern, die gegen Spendermerkmale (donor-spezifische Antikörper = DSA) oder nicht gegen Spendermerkmale (non donor-spezifische Antikörper = nDSA) gerichtet sind, unterschieden. Die Einteilung DSA vs. nDSA ist erst durch die Entwicklung der Festphasen-Essays wie der Luminex-Technologie in den letzten Jahren möglich geworden.

Präformierte anti-HLA-Antikörper

Präformierte Antikörper sind ein starker und gut prognostizierbarer Risikofaktor für eine frühe Abstoßungsreaktion [12]. Um dieses Risiko präventiv reduzieren zu können, muss bei der Anmeldung potentieller Transplantatempfänger auf die Warteliste eine Bestimmung der transplantationsrelevanten HLA-Antikörper erfolgen. Erfolgt der Nachweis von vorliegenden anti-HLA-Antikörper, werden die HLA-Antigene, gegen welche die Antikörper gerichtet sind, als sog. nicht-akzeptable HLA-Antigene (NAHA) an Eurotransplant gemeldet. Im Allokationsprozess entfallen dann Organspender mit entsprechenden HLA-Merkmalen aus dem Spenderpool. Um unbekannte Immunisierungsereignisse und die konsekutive HLA-Antikörper-Bildung während der Wartezeit auf ein Organ detektieren zu können, ist eine quartalsweise Bestimmung der HLA-Antikörper und Meldung an Eurotransplant bei allen Empfängern auf der aktiven Warteliste gesetzlich vorgeschrieben [13]. Für HLA-sensibilisierte Empfänger ist das Spenderangebot an immunologisch kompatiblen Transplantaten deutlich eingeschränkt und nimmt mit steigendem Grad der Immunisierung ab, was zu längeren Wartezeiten führt bzw. unter Umständen kann gar kein kompatibles Spenderorgan zugeteilt werden.

DeNovo donorspezifische Antikörper

Ungefähr 7-30 % der Empfänger entwickeln de Novo donor-spezifische HLA-Antikörper (dnDSA) nach einer Nierentransplantation [14-17], vornehmlich gegen Klasse-II-Antigene [16, 18]. dnDSA treten primär im ersten Jahr nach Transplantation auf, können aber auch noch viele Jahre nach Transplantation gebildet werden. In einer Studie war knapp die Hälfte der dnDSA innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation entstanden, nach 5 Jahren waren insgesamt 80% nachweisbar und der Rest entwickelte sich in den übrigen insgesamt 10 Follow-up-Jahren [17]. Wiebe et al. berichteten über eine durchschnittliche Dauer von 4,6 Jahren für die DSA-Entstehung, wobei in ihrer Studie innerhalb des ersten halben Jahres überhaupt keine DSA nachweisbar waren [16].

Die Entwicklung von dnDSA ist mit einer schlechteren Transplantatfunktion, einem reduzierten Transplantatüberleben und einem erhöhten Risiko für eine Antikörpervermittelte Rejektion verbunden. Wiebe et al. konnten im 10-Jahres-Transplantatüberleben eine signifikante Reduktion bei Patienten mit dnDSA im

Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (57% vs. 96%, $p < 0.0001$) [16]. Im 5-Jahres-Transplantatüberleben zeigten sich ähnlich signifikante Unterschiede (65.2% vs. 90.7%, $p < 0.0001$), interessanterweise zeigte die deNovo Synthese von nicht-donorspezifischen Antikörpern keinen derartig großen Unterschied mit 86.7% vs. 90.7%) [14]. Cooper et al. konnte zeigen, dass die schlechteren Transplantatüberlebensraten bei dnDSA primär im Zusammenhang mit antikörpervermittelten Rejektionen standen [19].

In einer Studie mit 611 Nierentransplantierten konnte gezeigt werden, dass das Risiko für eine Antikörper-vermittelte Reaktion bei dnDSA signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war (60% gegenüber 27.4%, $p < 0.0001$) [14]. Auch hier waren nicht-donorspezifische Antikörper kein Risikofaktor (34.1 %) [14]. Ähnliche Zahlen zeigten Huang et al. in einer Studie mit 150 Nierentransplantierten: Bei Patienten ohne DSA zeigte sich eine akute Rejektion in 34% der Fälle, bei Patienten mit präformierten DSA in 48% der Fälle und bei Patienten mit dnDSA in 70% ($p=0.05$) [15]. Ein Maß für die Intensität der dnDSA ist die mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI). Bei dnDSA mit einer MFI von ≥ 3000 betrug die Hazard-Ratio für eine Antikörper-vermittelte Rejektion (AMR) 10.6 (95% KI 2.27-49.5). Da die Inzidenz für eine AMR durch dnDSA in dieser Gruppe bei 30% lag, bei DSA von <3000 MFI hingegen nur bei 4% gehen die Autoren von einem Risiko für eine AMR in Korrelation mit der DSA-Stärke aus [20]. Inzidenzen von präformierten DSA-Antikörper liegen bei 14% [15], diese zeigen eine bessere Überlebensrate nach 8 Jahren im Vergleich zu dnDSA (63% vs. 34% $p < 0.001$) [21].

Gegenstand der Diskussion ist aktuell zudem die Unterscheidung in komplement-aktivierende und nicht-komplement-aktivierende DSA [22]. Das Komplementsystem ist Teil des unspezifischen Immunsystems, das kaskadenartig zu einer direkten Pathogenabwehr oder auch einer Verstärkung der inflammatorischen Reaktion führen kann. Eines der Abspaltprodukte dieser Kaskade ist das sog. C1q, das bei Bindung des Komplements C1 an einen Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Loupy et al. zeigten, dass C1-q-positive – also komplement-aktivierende – DSA eine signifikant niedrigere Transplantatüberlebensrate nach 5 Jahren zeigten (54%) gegenüber DSA, die nicht-komplement-aktivierend waren (93%) ($p < 0.001$), bei einer Kontrollgruppe ohne DSA mit einer Rate von 94% [22]. Komplement-

aktivierende DSA waren demnach ein Risikofaktor für Transplantatversagen (Hazard Ratio 4,78; 95% KI 2.69 – 8.49) und für eine antikörper-vermittelte Rejektion [22], wobei die Autoren nicht zwischen präformierten und dnDSA unterschieden. Kauke et al. konnten in einer Studie mit 611 Nierentransplantierten keinen Unterschied im Transplantatüberleben bei komplement-aktivierenden vs. nicht komplementaktivierenden dnDSA feststellen [14]. Neuere Überlegungen gehen in diesem Kontext von einer komplementabhängigen akuten Antikörper-vermittelten-Rejektion und einem komplement-unabhängigem Mechanismus bei der chronischen Abstoßung in Zusammenhang mit DSA aus [23].

Um das Risiko eines Transplantatversagens durch eine Abstoßungsreaktionen besser vorhersagen zu können und die Immunsuppression gezielter anpassen zu können, wurde und wird derzeit noch intensiv nach Ursachen und begünstigenden Faktoren für die Entstehung von dnDSA gesucht. Eine mögliche Ursache kann im immunsuppressiven Management nach einer Nierentransplantation liegen, da sich ein signifikanter Unterschied bei der Entstehung von dnDSA zwischen der Immunsuppression mit Cyclosporin (25%) und Tacrolimus (5%) zeigte ($p = 0.02$) [15], auch der Tacrolimus-Talspiegel korrelierte signifikant [18]. Noncompliance - hinsichtlich der Medikamenteneinnahme, also einer konsekutiven ineffektiven Immunsuppression – war ein weiterer Vorhersagefaktor für die Bildung von dnDSA (OR 8,75, $p < 0.001$) [16, 24]. Lederer et al. konnte zeigen, dass eine Mycophenolatgabe – insbesondere, wenn sie früh nach Transplantation erfolgte - die Produktion von anti-HLA-Antikörpern reduzieren kann (16.7% gegenüber 30.8% in der Gruppe, die kein Mycophenolat erhielten) [25]. Auch ein reduzierter Mycophenolat-Talspiegel war mit der DSA-Entstehung verbunden [26]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine insuffiziente Immunsuppression ein Risiko für die deNovo-DSA-Entstehung darstellt.

Demzufolge wirkt sich eine Infektion und Entzündung und die konsekutive Reduktion der immunsuppressiven Therapie auf die DSA-Produktion aus. Das BK-Virus ist ein Polyoma-Virus, das in der normalen Bevölkerung keine Relevanz besitzt, bei Nierentransplantierten jedoch zu einer Virusnephropathie mit nachfolgendem Transplantatverlust führen kann. In einer Studie entwickelten 79% der

Nierentransplantierten mit diagnostizierter BK-Virämie innerhalb von 24 Monaten dnDSA [27].

Ein weiterer Faktor, der im Zusammenhang mit der Entstehung von dnDSA steht, ist die Vorimmunisierung der Patienten und der höhere Anteil an präexistenten anti-HLA-Antikörpern. Auch eine vorangegangene Nierentransplantation scheint ein Risikofaktor für die Entwicklung von dnDSA zu sein [24].

Erwartungsgemäß sind HLA-Fehlpaarungen ein Risikofaktor für die Synthese von DSA [28]. Wurde primär eine Relevanz in den Übereinstimmungen der Loci HLA-A, -B und -DR gesehen, scheint insbesondere auch der -DQ-Locus eine größere Bedeutung zu haben, gegen den die häufigsten dnDSA gerichtet sind [24, 29]. Eine besondere Position scheint hierbei die -DQ β -Kette zu haben [30]. Gleichzeitig dürfen die übrigen Loci wie -DR nicht vernachlässigt werden [24]. Wiebe et al. fanden als Prädiktor für die dnDSA-Synthese hingegen mindestens ein HLA-DR β 1-Mismatch (OR: 5.66; $p < 0.006$), hier war zudem eine Abstoßungsreaktion vor Entwicklung der DSA (OR: 1.57; $p = 0.061$) positiv mit der Entstehung von dnDSA verbunden [16].

Auch eine bessere Nierenfunktion scheint mit der Entstehung von DSA-Antikörpern zusammenzuhängen. Bei Filler et al. zeigte sich bei Patienten mit dnDSA post transplantationem eine durchschnittliche eGFR von 70 ml/min/1.73 m² gegenüber den Patienten ohne DSA mit 40 ml/min/1.73 m² ($p = 0.0071$) [26].

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Impfung gegen saisonale Influenza und H1N1 zu einer anti-HLA-Antikörperproduktion in einem signifikanten Anteil der Patienten führte [31]. Die Autoren vermuten hierbei eine Aktivierung von Memory-B-Zellen, die zu einer Produktion von dnDSA führen.

Diagnostik

Der Nachweis HLA-spezifischer-Antikörper basiert im Vergleich zur Typisierung primär auf serologischen Methoden. Hierzu gibt es einerseits indirekte Möglichkeiten zum Nachweis vorhandener HLA-Antikörper z.B. mittels der Durchflusszytometrie oder des lymphozytotoxischen Tests. Letzterer wird auch zur Bestimmung der Panelreaktivität des Empfängerserums oder zur Kreuzprobe zum Verträglichkeitstest zwischen Empfänger und Spender herangezogen. Eine direkte Nachweismöglichkeit spezifischer Antikörper hingegen besteht im ELISA-Test (siehe Kapitel 3.4).

HLA-spezifische Antikörper können in heutiger Zeit mittels der Luminex-Technologie detektiert werden. Diese Methode ist eine sog. xMAP-Technologie («multiplex multi-analyte profiling») und verfügt im Gegensatz zu ELISA über den Nachweis der Antikörperspezifität [32]. Hierbei können gleichzeitig über 100 mögliche Antikörper detektiert werden. Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass auf sog. Polystyrolkugeln verschiedene HLA-Antigene fixiert werden. Diese Polystyrolkugeln können durch unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften computergesteuert voneinander mittels Durchflusszytometrie unterschieden werden [32]. Binden schließlich die patientenspezifischen HLA-Antikörper an die fixierten HLA-Antigene, wird dieser Antigen-Antikörper-Komplex als positive Reaktion mittels eines zusätzlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpers im Luminex-System detektiert.

Bei der Luminex-Technologie gibt es dabei unterschiedlich präzise Assays. Der Luminex-Screening-Test dient lediglich zur Bestätigung von vorhandenen HLA-1 und HLA-2-Antikörpern durch fixierte native HLA-1- und HLA-2-Moleküle. Der Luminex-Identifikationstest beinhaltet spezielle spenderspezifische HLA-Antigene – für jede relevante HLA-Klasse zwei Merkmale - und entspricht damit funktionell einer Spenderzelle. Das zugrunde liegende Wirkungsprinzip ähnelt dem des lymphozytotoxischen Test zur Ermittlung der Panel-Reaktivität. Die höchste Sensibilität zeigt jedoch der Luminex-single-bead/Antigen-Test. Hier verfügt jeder bead über jeweils ein definiertes HLA-Merkmal und kann so gerade bei hochimmunisierten Patienten eine Aussage über die Antikörperspezifität treffen.

1.4. Transplantatabstoßung (Rejektion)

Abstoßungsreaktionen können früh (akut innerhalb des ersten Jahres) oder spät (chronisch nach dem ersten Jahr) auftreten und werden durch eine Nierenbiopsie nachgewiesen. Es wird über Inzidenzen von bis zu 30% der Fälle berichtet [10]. Eine Rejektion beeinflusst das Transplantatüberleben signifikant [10]. Die 5-Jahres-Transplantatüberlebensrate betrug bei Patienten ohne Abstoßungsreaktion 97%, bei Patienten mit früher Rejektion 89%, bei Patienten mit später Rejektion 85% [10].

Ursächlich kann zwischen Antikörper- und T-zellvermittelter Rejektion unterschieden werden, wenngleich beide Mechanismen viele Wechselbeziehungen haben. Eine Antikörper-vermittelte Rejektion kann durch Vorliegen präformierter HLA-AK vor Transplantation oder die Entstehung von dnDSA post transplantationem entstehen. Während präformierte HLA-AK - die durch das serielle HLA-Screening der Empfänger auf der Warteliste, durch die Meldung der NAHAS an ET, sowie durch das Crossmatch vor Transplantation ausgeschlossen werden sollten - zu einer akuten Abstoßung führen, reduziert die Entstehung von deNovo-HLA-Antikörper das Transplantatüberleben signifikant durch chronische Abstoßungen. Durch Bindung der anti-HLA-Antikörper im Transplantat kommt es unter Aktivierung des Komplementsystems, aber auch komplementunabhängig zu einer lokalen Entzündung mit peritubulärer Kapillaritis, Glomerulitis und/oder Arteritis.

Eine zellvermittelte Rejektion findet in der Regel in den ersten Tagen nach Transplantation statt. Hier werden Empfänger-T-Zellen durch die Präsentation der Donorantigene durch Antigen-präsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen) aktiviert, diese infiltrieren dann das Transplantat und führen zu einer T-zell-vermittelten Tubulitis und/oder Arteritis [33].

Durch die Entwicklung potenter immunsuppressiver Strategien konnte in den letzten Dekaden zwar die Rate an akuten Abstoßungsreaktionen beachtlich gesenkt werden, die der chronischen Abstoßungsprozesse blieb allerdings weitgehend gleich. Dadurch hat sich das Langzeittransplantatüberleben zuletzt nicht mehr signifikant verbessert.

Diagnostik

Da eine akute Transplantatabstoßung in der Mehrzahl der Fälle klinisch asymptomatisch bleibt, zeigt sich diese primär laborchemisch in einem Anstieg des Serum-Kreatinin-Werts und/oder einer Proteinurie. Die KDIGO-Leitlinien empfehlen hierbei eine Nierentransplantatbiopsie bei unerklärtem Kreatinin-Anstieg oder fehlendem Absinken auf das Ausgangsniveau sowie bei neu aufgetretener Proteinurie oder einer Proteinurie von $\geq 3 \text{ g} / 24 \text{ h}$ [34].

Die perkutane Nierenbiopsie wird mittels Feinnadelpunktion unter sonographischer Kontrolle und Lokalanästhesie durchgeführt. Anschließend erfolgt die histologische Aufarbeitung, die zwischen T-Zell- und Antikörper-vermittelter Abstoßung unterscheiden kann, aber auch eine Aussage über den Schweregrad und fortgeschrittene chronische Veränderungen machen kann (z.B. tubuläre Atrophie/interstitielle Fibrose). Als international angesehener Standard findet dabei die Einteilung nach der Banff-Klassifikation (siehe Tabelle 1) Gebrauch, diese wird in mehrjährigen Abständen kontinuierlich auf den sog. Banff-Konferenzen aktualisiert und an die neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse angepasst.

Banff-Kategorie	Merkmale
1	Normaler Biopsiefund oder unspezifische Veränderungen
2	Antikörper-vermittelte Reaktion (ABMR) <ul style="list-style-type: none"> a) Aktive ABMR <ul style="list-style-type: none"> 1. Histologische Kriterien eines akuten Gewebes Schadens 2. Antikörper-Interaktion mit dem Gefäßendothel 3. Serologischer Nachweis donor-spezifischer Antikörper b) Chronisch-aktive ABMR <ul style="list-style-type: none"> 1. Histologische Kriterien eines chronischen Gewebes Schadens 2. Siehe a1. 3. Siehe b2. c) Cd4-Färbung ohne Hinweis auf akute Abstoßung Kein Nachweis eines der oben genannten Kriterien
3	Borderline-Veränderungen (suspekt auf akute T-Zell-vermittelte Reaktion) Mischbefunde aus schwacher interstitieller Entzündung oder Tubulitis oder andersherum
4	T-Zell-vermittelte Reaktion (TCMR) <ul style="list-style-type: none"> a) Aktive TCMR Grad IA, IB, IIA, IIB, III -> Je nach Schweregrad der interstitiellen Infiltration, Tubulitis und/oder Intima-Arteritis b) Chronisch-aktive TCMR Grad IA, IB, II -> Je nach Schweregrad der interstitiellen Entzündung des bereits sklerotischen Cortex-Parenchyms Endstadium einer chronischen Allograft-Arteriopathie (Fibrose)

Tabelle 1: Modifizierte Darstellung der Banff-Klassifikation, aktualisiert 2017 nach [33]

1.5. Hepatitis-B-Virus(-Infektion)

Eine Hepatitis-B-Virus-(HBV)-Infektion gehört zu den häufigsten Viruserkrankungen weltweit. Die Infektion verläuft oft asymptomatisch, kann jedoch auch eine akute Hepatitis hervorrufen, die sich in unterschiedlicher Ausprägung manifestiert. In ca. 5% der Fälle bei Erwachsenen chronifiziert die Hepatitis B [35] und kann über eine konsekutive Leberzirrhose langfristig auch zu einem hepatozellulärem Karzinom führen. HBV wird parenteral durch Blut oder Blutprodukte, kontaminierte medizinische Instrumente oder Nadeln, durch sexuelle Kontakte mit infizierten Körperflüssigkeiten oder perinatal übertragen. Weltweit sind etwa 260 Millionen Menschen infiziert [35].

Bei einer akuten oder chronischen Infektion ist serologisch primär das Hbs-Antigen - ein Protein der Virusoberfläche - nachweisbar. Das Hbs-Antigen wird auch als Totimpfstoff zumeist als Kombinationsimpfung z.B. mit Hepatitis-A-Impfstoff verabreicht. Nach ausgestandener Krankheit oder erfolgter Immunisierung lässt sich dann der sogenannte anti-Hbs-Antikörper nachweisen.

In Deutschland empfiehlt die ständige Impfkommission des Robert-Koch-Instituts (STIKO) eine Grundimmunisierung bei allen Säuglingen und Kindern [36]. Eine zusätzliche Indikationsimpfungsempfehlung besteht für Immunsupprimierte, Menschen mit erhöhtem Expositionsrisiko (Drogenabhängige etc.) sowie beruflich Exponierten [36]. Zur Sicherung des Impferfolgs sollte nach etwa 4-8 Wochen serologisch ein anti-Hbs-Titer > 100 mIU/ml nachweisbar sein. Liegt der Titer niedriger (10-99 mIU/ml), spricht man von sog. Low-Respondern. Die STIKO empfiehlt in solchen Fällen erneute Impfstoffdosen zu verabreichen, dennoch wird ab diesen Werten bereits von einer weitestgehenden Immunisierung ausgegangen. Non-Responder weisen im Serum einen Titer von < 10 mIU/ml auf [36].

1.6. Hepatitis-B-Impfung bei chronischer Niereninsuffizienz

Bei Hämodialyse-Patienten zeigt sich eine Prävalenz von Hepatitis-B-Infektionen von bis zu 5% [37]. Dialysepatienten fallen bei der STIKO unter die Gruppe „Personen, bei denen wegen einer vorbestehenden oder zu erwartenden Immundefizienz bzw. -suppression oder wegen einer vorbestehenden Erkrankung ein schwerer Verlauf einer Hepatitis-B-Erkrankung zu erwarten ist“ [36] und sollten demnach eine Indikationsimpfung erhalten. Auch die Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) - Leitlinien zur Betreuung von Nierentransplantatempfängern sprechen die Empfehlung zum einen für eine Impfung gegen HBV vor Transplantation aus, zum anderen für eine jährliche anti-Hbs-Titer-Kontrolle und ggf. Auffrischungsimpfungen (bei anti-Hbs < 10 mIU/ml) [34].

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz – auch Hämodialysepatienten – zeigen jedoch im Vergleich zur Normalbevölkerung eine schlechtere Impferfolgsrate. Nur 50-85% verfügen nach der Impfung über einen anti-Hbs Titer von > 10 mIU/ml [38][39], demgegenüber liegt die Rate in der Normalbevölkerung bei 90-95% [40]. Agarwal et al. zeigten, dass mit steigendem Kreatinin die Serokonversionsrate abnimmt (Rate bei leichter Niereninsuffizienz (Kreatinin 1,5-3 mg/dl), mittlerer (3-6 mg/dl) und schwerer (> 6 mg/dl): jeweils 87.5%, 66.6% und 35.7%) [41].

Als mögliche Ursachen für die eingeschränkte Immunantwort werden unter anderem folgende Faktoren diskutiert:

Unterernährung - gemessen am Body Mass Index (BMI) oder auch am Serum-Albumin – ist als signifikanter Faktor für eine Nichtantwort bekannt [42]. So war in einer Metaanalyse mit 15172 Patienten Unterernährung mit einem erhöhten Risiko für eine schlechtere Impfantwort verbunden (angepasstes RR 1.50, 95% KI 1.02 - 2.21, $p < 0.01$) [43].

Zudem kommt erwartungsgemäß ein höheres Alter und u.a. das damit alternde Immunsystem bei Patienten mit Niereninsuffizienz als Ursache in Frage [42]. Das steigende Alter war in einer Metaanalyse mit einem erhöhten Risiko für eine fehlende Impfantwort auf HBV-Impfung verbunden (overall Risk Ratio: 0.74; 95% KI 0.70-0.79) [44].

Auch eine genetische Prädisposition scheint für eine Immunantwort relevant zu sein. So konnte das männliche Geschlecht als Risikofaktor für ein Non-Responding gefunden werden [45]. In einer Studie mit 107 Probanden zeigte sich unter den Non-Respondern ein männlicher Anteil von 94% gegenüber den Respondern mit 59%, $p < 0.05$ [46]. Auch gewisse HLA-Konstellationen zeigten einen signifikanten Unterschied [40], so war der Haplotyp HLA-A1, -B8, -DR3 häufiger bei Non-Respondern (19%) als bei Respondern (2%), $p < 0.03$ [46].

Dass auch Diabetes mellitus als Systemerkrankung und mitunter häufigste Ursache für eine Nierentransplantation [4] eine Auswirkung auf die Immunantwort haben kann, zeigten Fabrizi et al. In einer Metaanalyse verfügten Patienten unter Hämodialyse bei bestehendem Diabetes mellitus über eine signifikante Abnahme der Serokonversionsrate gegenüber Patienten ohne Diabetes mellitus (gepoolte Odds Ratio: 0,52 (95% CI 0,38-0,71), $p = 0.001$) [47].

Zudem können Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bzw. mit terminalem Nierenversagen harnpflichtige Substanzen (wie z.B. Harnstoff) nicht mehr ausreichend ausscheiden, sodass diese akkumulieren und eine vielfältige toxische Symptomatik hervorrufen. Hierzu gehört unter anderem eine Beeinträchtigung des Immunsystems. Aufgrund dessen ist eine Urämie indirekt mit einem Non-Responding auf die HBV-Impfung verbunden [48].

Neben den recht prägnanten Risikofaktoren Alter, Geschlecht, Unterernährung etc. gibt es demnach also auch diverse spezifische immunologische Veränderungen bei chronisch Niereninsuffizienten/Dialysepatienten, die ursächlich für eine geringere Serokonversionsrate sind. Als Hauptursachen für die beeinträchtigte Immunantwort werden – wie bereits erwähnt – eine Urämie als auch das Hämodialyseverfahren an sich gesehen, die bei den Patienten eine chronische Entzündungsreaktion im Körper hervorruft. Diese beruht primär auf einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems [49], ein Beispiel hierfür ist die Stimulation von Monozyten durch Hämodialyse-Membranen [50].

Für eine ausreichende Immunantwort ist ein funktionierendes Immunsystem mit CD8+- und CD4+- (Helfer)-Zellen notwendig, die das Antigen – in diesem Fall den Totimpfstoff Hbs-Antigen - erkennen und den B-Lymphozyten das Signal zur

Produktion von spezifischen Antikörpern - den anti-HBs-Antikörpern - geben. In mehreren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass chronisch Nierenkranke im Endstadium sowohl eine quantitative Reduktion von T-Zell- [51] als auch von B-Zell-(Sub-)Populationen zeigen [52]. Auch funktionelle Probleme dieser Zellen, z.B. in der Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen, sind bei einer Niereninsuffizienz im Endstadium (ESRD) vorhanden [39]. Litjens et al. zeigten, dass ESRD-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollpopulation nach HBV-Impfung über eine verzögerte Reaktion von Gedächtnis-CD4+-T-Zellen verfügten [53]. Zudem produzierten sie nur 6,3% der HBsAg-spezifischen Effektorspeicher-CD4+-T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0.001$), diese korrelierten mit den anti-HBsAg-IgG-Titern [53].

Auch kommt es zu einer verringerten Aktivierung gewisser Immunzellen, z.B. der T-Helfer-Zellen durch eine geringere Expression eines co-stimulierenden Moleküls (B7-2), das auf die Monozyten wirkt [54]. Antigenpräsentierende Zellen, wie die dendritischen Zellen, zeigten bei Patienten mit ESRD eine verminderte End-Differenzierung und auch die Proliferation von T-Zell-Klonen war hier eingeschränkt [33]. Darüber hinaus gibt es auch Unterschiede in der Produktion von Zytokinen, die Auswirkung auf eine ineffektive Immunreaktion haben können [39]. Durch die bereits angesprochene chronische Entzündungsreaktion kommt es durch inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-12, zu einer vermehrten Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen, die primär für die zelluläre Immunantwort zuständig sind. Dies geht auf Kosten der Th2-Zellen, die wesentlicher Bestandteil der humoralen Antwort sind und mit den B-Zellen interagieren [54].

Daher werden Möglichkeiten zur Verbesserung der Serokonversionsraten nach Hepatitis-B-Impfung gesucht. Getestet wurden beispielsweise unterschiedliche Dosierungen des Impfstoffes oder verschiedene Darreichungsformen (intramuskulär/intradermal) und mögliche Adjuvantien wurden gesucht [55]. Beispielsweise konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass eine intramuskuläre Impfung schlechtere Konversionsraten nach sich zog als eine intradermale Gabe (gepoolte Odds-Ratio 0.454, 95% KI 0.3-0.67, $p = 0.001$) [56]. Hierdurch konnte bereits eine Verbesserung der Impfantworten erzielt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass mit höherer glomerulärer Filtrationsrate die

Serokonversion anstieg [57]. Dementsprechend ist eine möglichst frühe Impfung bei Niereninsuffizienz anzustreben.

Doch nicht nur die Serokonversionsraten sind bei chronisch Niereninsuffizienten reduziert, auch die Langzeitimmunität ist – insbesondere bei Nierentransplantierten durch die zusätzliche medikamentöse Immunsuppression - eingeschränkt. So zeigten bei einem 3-Jahres-Follow-up 41% der Niereninsuffizienten (n = 44) im Serum keinen nachweisbaren anti-HBs-Titer [58]. Aus diesem Grund empfiehlt die KDIGO zur Gewährleistung des Impfschutzes jährliche Kontrollen des anti-Hbs-Titers nach Transplantation [34].

2. Fragestellung der Arbeit

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob das Impfansprechen auf eine HBV-Impfung bei Dialysepatienten

- 1.) mit der Entstehung von deNovo anti-HLA-Antikörpern nach einer Nierentransplantation korreliert und damit
- 2.) möglicherweise als Prognoseparameter für die Entstehung einer Transplantatabstoßungsreaktionen verwendet werden kann?

Diese Hypothese postuliert demnach, dass sich durch unterschiedliche serologische Reaktionen auf eine HBV-Impfung im Sinne der Entstehung von Antikörpern auch die mögliche Entstehung von donorspezifischen Antikörpern nach Nierentransplantation vorhersagen lässt. So kann ggf. ein positives Impfansprechen bei Dialysepatienten - welches wie oben beschrieben unter Dialysetherapie oftmals abgeschwächt ausfällt - für ein weiterhin potentes Immunsystem mit verstärkter Antikörperproduktion sprechen und somit Empfänger mit einem erhöhten Risiko für eine Abstoßungsreaktion identifizieren. Im Gegenzug könnte bei einer ausbleibenden Impfreaktion von einem geringeren Risiko der anti-HLA-Antikörper-Entstehung post transplantationem und somit einer Abstoßungsreaktion ausgegangen werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden für diese Arbeit Daten ausgewertet, welche die Entwicklung donorspezifischer Antikörper nach Nierentransplantation überwachten. Dies ist mithilfe des Luminex-Systems realisiert worden. Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Ansprechen auf eine HBV-Impfung während der Dialysetherapie prä-transplantationem gemessen und anhand der anti-HBs-Antikörper-Titer in Korrelation gesetzt.

3. Methodik

3.1. Patientenkollektiv

Aus 844 Patienten, die in den Jahren 2005 bis einschließlich 2012 am Klinikum der Universität München-Großhadern eine Nierentransplantation erhielten, wurden für diese Studie diejenigen Empfänger selektiert, die zum ersten Mal transplantiert wurden und zum Zeitpunkt der Transplantation nicht immunisiert waren, d.h. über keine präformierten HLA-Antikörper verfügten (n=581). Im nächsten Selektionsschritt wurden die Patienten ausgewählt, bei denen mindestens zwei anti-HLA-Antikörper Bestimmungen nach der Transplantation vorlagen (n=265). Bei 52 Patienten war vor Transplantation keine HBV-Impfung erfolgt, bei weiteren 25 Patienten konnten keine Daten zu einer Hepatitis-B-Impfung gesichert werden bzw. lag keine Bestimmung des anti-HBs-Antikörper-Titers zum Zeitpunkt der Transplantation vor, sodass diese Patienten ausgeschlossen wurden. Schließlich verblieben 188 Patienten im Kollektiv, bei denen der Nachweis über eine erfolgte Hepatitis-B-Impfung an der Dialyse erbracht werden konnte und der Befund des anti-HBs-Antikörper-Titers zum Zeitpunkt der Transplantation vorlag. Das Studienkollektiv wurde daraufhin in zwei Gruppen eingeteilt: 141 Patienten wurden als Impfresponder (R) (anti-HBs Titer zum Zeitpunkt der Transplantation >10 mIU/ml) identifiziert und 47 Patienten als Non-Responder (NR) (anti-HBs Titer zum Zeitpunkt der Transplantation <10 mIU/ml). Von den 188 Patienten waren 162 mit reiner Nierentransplantation, 26 weitere Patienten mit Transplantation mind. eines weiteren Organs, z.B. Pankreas. Der mittlere Follow-up-Beobachtungszeitraum für akute Abstoßungsreaktionen, Transplantatverlust und Nierenfunktionsverschlechterung lag bei 5,5 Jahren.

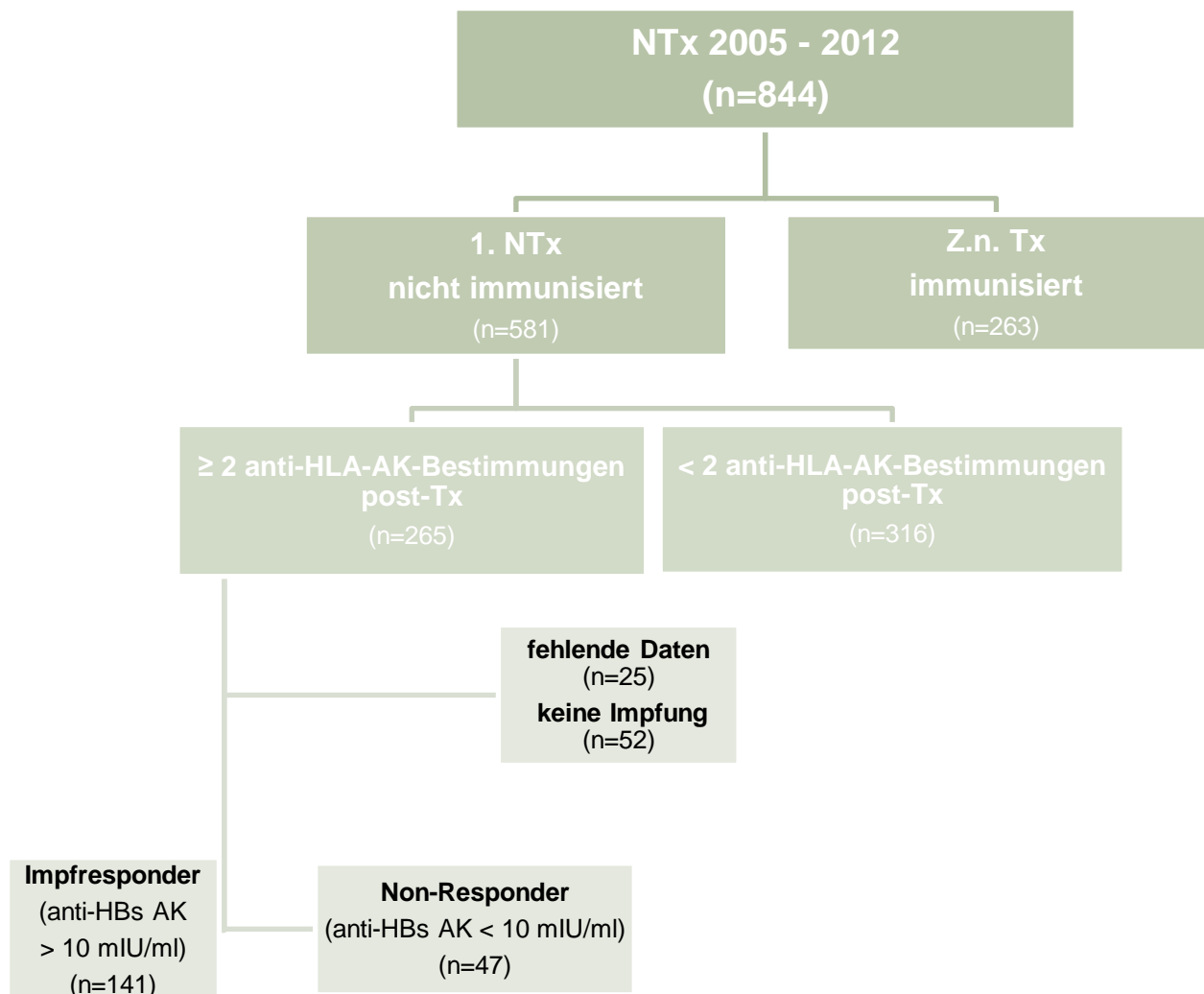


Abbildung 2: Auswahl des Patientenkollektivs

3.2. Datenquellen

Die Datenerhebung wurde im August 2013 begonnen und konnte im Juni 2015 fertiggestellt werden. Dabei wurden prä-, peri- und postoperative Werte der einzelnen Patienten gesammelt. Bezugsquellen hierfür stellten die Patientenakten dar, die einen Anmeldebogen zur Transplantation, Pathologie- und Virologiebefunde, Laborwerte und Entlassungsbriefe der Station bzw. der Ambulanz enthielten. Diese konnten mittels der Softwareprogramme „LAMP“, „PUMA Datenbank“ und „KAS“, retrospektiv eingesehen werden. Die Laborwerte entstammen dem Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Universität München-Großhadern, die Pathologiebefunde dem Institut der Pathologie, die Virologiebefunde dem Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU München. Der Impfstatus vor Transplantation wurde mittels eines standardisierten Fragebogens bei den behandelnden niedergelassenen Nephrologen retrospektiv erfragt. Die postoperativen Daten wurden im Rahmen der regelmäßigen Vorstellungen in der Transplantationsambulanz beziehungsweise bei den behandelnden niedergelassenen Nephrologen erhoben.

3.3. Parameter

Aus oben genannten Datenquellen erfolgte die Akquisition der folgenden Parameter:

Spender:

Alter, Geschlecht, Art des Spenders (Lebendspende vs. postmortale Spende).

Empfänger:

Alter, Geschlecht, Größe (m), Gewicht (kg), Body-Mass-Index (BMI in kg/m^2), Zeit an der Dialyse vor Transplantation (= Datum 1. Dialysetherapie - Datum Tx), Humanes Leukozytenantigen (HLA) - Mismatch, anti-HLA-Antikörper prä-Tx, erfolgte Hepatitis-B-Impfung prä-Tx und anti-Hbs-Titer im Serum in mIU/ml zum Zeitpunkt der Transplantation.

Peri-operativ:

Kalte Ischämiezeit (KIZ), Induktionstherapie, perioperatives immunsuppressives Protokoll.

Post-operativ:

verzögerte Transplantatfunktion (delayed graft function, DGF), die als Fortbestehen der Dialysepflicht innerhalb der ersten postoperativen Woche definiert wurde; Transplantat- und Patientenüberleben, Anzahl der Abstoßungen (gesichert in allen Fällen durch Transplantatbiopsien), Nierenfunktion nach 1, 2 und 3 Jahren gemessen anhand des Serum-Kreatinins (mg/dl) und der Proteinurie in g Eiweiß/g Kreatinin im Spontanurin, Anzahl der Abstoßungsreaktionen (alle per Biopsie diagnostiziert), immunsuppressive Erhaltungstherapie, anti-HLA-Antikörper post-Tx.

3.4. Bestimmung anti-Hbs-Titer

Der anti-HBs-Antikörper-Titer der NTx-Empfänger wurde im Klinikum der Universität München-Großhadern routinemäßig zum Zeitpunkt der Transplantation abgenommen und im Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU München bestimmt. Die quantitative Bestimmung der anti-HBs-Antikörper erfolgte mittels ELISA – hier auf Grundlage des sog. Sandwich-Prinzips - in internationale Milli-Einheiten pro ml (mIU/ml) (enzyme-linked immunosorbent assay). Dazu wird das Patientenserum auf eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit Hbs-Antigen bestückt ist. Daraufhin binden die patienteneigenen anti-Hbs-IgG-Antikörper an das Hbs-Antigen. Im Anschluss wird enzymgekoppeltes (hier mit Peroxidase) Hbs-Antigen dazugegeben, das an die nun vorhandenen Antigen-Antikörper-Komplexe bindet. Ungebundenes Material wird durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Das Enzym bewirkt nach Zugabe von Tetramethylbenzidin eine Färbung, dessen Intensität proportional zur vorhandenen Menge an anti-Hbs photometrisch ausgelesen werden kann [59].

3.5. HLA-Diagnostik

Die Typisierung und bestmögliche Übereinstimmung der HLA-Merkmale bei Empfänger und Spender ist, wie erwähnt, Voraussetzung für eine langfristig erfolgreiche Nierentransplantation. In unserer Studie erfolgte die HLA-Typisierung mittels einer Primeranalytik, dem sog. sequence-specific-priming (PCR-SSP). Hierbei werden spezifische Primerpaare mit der DNA des Patienten amplifiziert und im Anschluss nach Färbung mittels Agarosegelelektrophorese analysiert [60].

Das Screeningverfahren zur Detektion der Entstehung von deNovo anti-HLA-Antikörpern nach Transplantation erfolgte mittels jährlicher Blutentnahmen. Die Diagnostik der HLA-spezifischen Antikörper im Patienten-Serum wurde dann mittels Luminex-Technologie (Lifecodes Life Screen Deluxe, Immucor Inc., Norcross, GA, USA) umgesetzt. Im Falle eines positiven Suchtest-Nachweises wurde anschließend die genaue, donorspezifische Antikörperbestimmung mittels dem Single-Antigen-Bead-Assay (LabScreen, One lambda, Canoga Park, CA, USA) durchgeführt. Diese donorspezifischen Antikörper wurden ab einem MFI-Wert von > 1000 gewertet.

3.6. Abstoßungsdiagnostik

Die Diagnostik zum Nachweis einer Transplantatabstoßung erfolgte in unserer Studie bei einem Anstieg des Serum-Kreatinins bzw. einem Anstieg der Proteinurie mittels Nierenbiopsie. Dies entspricht dem regulären Verfahren gemäß KDIGO-Leitlinien (siehe hierzu Kapitel 1.4).

Jede detektierte Abstoßung wurde unabhängig vom zeitlichen Abstand zur Transplantation gewertet. Falls bei einem Patienten im Verlauf mehrere Abstoßungen auftraten, wurden diese jedoch nicht mehrfach gewertet.

Die Auswertung der jeweiligen Biopsien erfolgte im Anschluss anhand der oben bereits erwähnten Banff-Klassifikation. Diese wird in mehrjährigen Abständen aktualisiert, die Einteilung der Biopsien unserer Studie erfolgte am pathologischen Institut der LMU nach der Banff-Klassifikation aus dem Jahr 2007. Hierbei fanden bei allen Biopsien C4d-Färbungen Berücksichtigung. C4d ist ein Abspaltprodukt im Komplementsystem und spezifisch für donorbezogene anti-körpervermittelte Rejektionen [61].

3.7. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Softwareprogramm GraphPad PRISM (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Um das Studienkollektiv zu beschreiben (Fallzahl, Prozentzahlen der kategorialen Variablen, Mittlere- und Standardabweichung der metrischen Variablen) wurde die deskriptive Statistik angewandt. Die Unterschiede zwischen den zwei Gruppen Respondern und Non-Respondern wurden durch statistische Tests untersucht.

Für die metrischen Variablen wurden die Mittelwerte der zwei unverbundenen Stichproben mit dem T-Test verglichen. Neben den Mittelwerten gingen hier die jeweiligen Standardabweichungen und Stichprobenumfänge in die Rechnung ein, um einen signifikanten Unterschied von einer zufälligen Verteilung differenzieren zu können.

Die binären kategorischen Variablen wurden mit dem Exaktem Fisher-Test verglichen. Wie der Chi²-Test beruht dieser auf dem Vergleich zwischen erwarteten und beobachteten Werten und wird angewendet, wenn die Voraussetzungen für den Chi²-Test nicht gegeben sind (z.B. zu kleine Erwartungswerte). Unterschiede wurden ab einem p-Wert von $p < 0.05$ als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Demographie

Wie oben beschrieben wurden für diese Arbeit 188 nicht-immunisierte Patienten nach der ersten Nierentransplantation untersucht. Die Patienten wurden daraufhin gemäß des Impfansprechens auf die Hepatitis-B-Impfung in zwei Gruppen eingeteilt: 1.) Impfresponder R (141/188, 75%) und 2.) Non-Responder NR (47/188, 25%). Die Gruppenmerkmale zum Zeitpunkt der Transplantation sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt.

Empfängerkriterien			
Charakteristika	Responder	Non-Responder	p-Wert
Anzahl der Empfänger (n)	141	47	
Alter der Empfänger (Jahre)	49.37 ± 13.4	49.98 ± 13.9	0.467 ^b
Geschlecht der Empfänger, weiblicher Anteil	52 (36.9%)	13 (27.7%)	0.291 ^a
BMI der Empfänger (kg/m ²)	25.1 ± 3.9	25.1 ± 4.4	0.764 ^b
Dialysepflichtigkeit vor Ntx	128 (90.8%)	43 (91.5%)	1.0 ^a
Mittlere Dialysezeit (Jahre)	4.6 ± 3.4	3.2 ± 2.6	0.033 ^b
Renale Grunderkrankung			
Diabetes mellitus	20 (14.2%)	13 (27.7%)	0.046 ^a
Vaskuläre Nephropathie	8 (5.7%)	4 (8.5%)	0.498 ^a
Glomerulonephritis	41 (29%)	16 (34%)	0.583 ^a

Polyzystische Nierenerkrankung	22 (15.6%)	1 (2.1%)	0.018 ^a
Andere	50 (35.5%)	13 (27.7%)	

^a Exakter Fisher-Test, ^b T-Test.

Tabelle 2: Empfängerkriterien im Vergleich: Responder vs. Non-Responder

Die beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des durchschnittlichen Empfängeralters, Empfängergeschlechts, Body-Mass-Index der Empfänger und Anzahl der dialysepflichtigen Empfänger. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlich vorangegangenen Dialysezeit beider Gruppen. Diese war bei den Respondern mit 4.6 ± 3.4 Jahren signifikant länger als bei den Non-Respondern mit 3.2 ± 2.6 Jahren. Außerdem gab es in der Gruppe der Non-Responder signifikant mehr Patienten mit den Grunderkrankungen Diabetes mellitus (R = 14.2% vs. NR = 27.7%) sowie polyzystische Nierenerkrankung (R = 15.6% vs. NR = 2.1%).

Spenderkriterien			
Charakteristika	Responder	Non-Responder	p-Wert
Alter der Spender (Jahre)	49.38 ± 13.4	49.98 ± 13.9	0.917 ^b
Geschlecht der Spender, weiblicher Anteil	72 (51.1%)	26 (55.3%)	0.504 ^a
Kalte Ischämiezeit (Stunden)	10 ± 7.3	8.5 ± 6	0.222 ^b

^a Exakter Fisher-Test, ^b T-Test

Tabelle 3: Spenderkriterien im Vergleich: Responder vs. Non-Responder

Die Gruppen unterschieden sich ferner nicht signifikant bezüglich des Spenderalters, des Spendergeschlechts und der kalten Ischämiezeit des Spenderorgans.

Transplantationskriterien			
Charakteristika	Responder	Non-Responder	p-Wert
HLA-Mismatch	3 ± 1.7	3.4 ± 1.6	0.076 ^b
Art der Transplantation			
Nur Niere	126 (89.4%)	36 (76.6%)	0.048 ^a
Niere und weitere Organe	15 (10.6%)	11 (23.4%)	0.048 ^a
Immuntherapie			
Induktionstherapie	109 (77.3%)	30 (63.8%)	0.084 ^a
Erhaltungs-Immunsuppression			
Cyclosporin A/MMF/Steroide	68 (48.2%)	18 (38.3%)	0.310 ^a
Tacrolimus/MMF/Steroide	49 (34.8%)	24 (51.1%)	0.058 ^a
Andere	24 (17%)	5 (10.6%)	0.357 ^a

^a Exakter Fisher-Test, ^b T-Test

Tabelle 4: Transplantationskriterien im Vergleich: Responder vs. Non-Responder

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben sich für das HLA-Mismatch, für die Anzahl der Patienten, welche eine Induktionstherapie erhielten, sowie hinsichtlich der unterschiedlichen Erhaltungstherapien. Die beiden Gruppen unterschieden sich jedoch signifikant in der Art der Transplantation, d.h. in der Gruppe der Non-Responder wurden signifikant häufiger Transplantationen mit mehreren Organen (z.B. Niere und Pankreas) durchgeführt.

4.2. Einflussfaktoren auf HBV-Impferfolg

Das Alter, Geschlecht sowie der BMI der Empfänger, aber auch die Zeit an der Dialyse vor Transplantation wurden als mögliche Einflussfaktoren für das Ansprechen auf die HBV-Impfung untersucht (siehe Kapitel 1.6.) Wie oben gezeigt unterschied sich bei den Empfängern das mittlere Alter der Responder nicht signifikant vom mittleren Alter der Non-Responder.

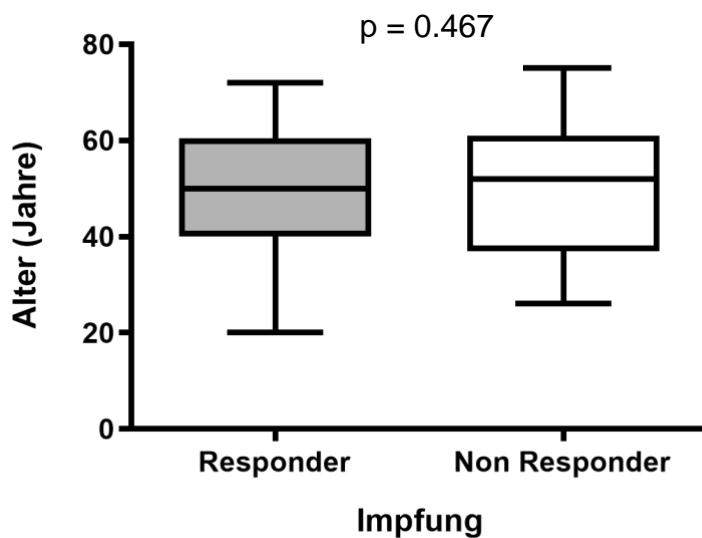


Abbildung 3: Alterszusammensetzung der Empfänger, Responder vs. Non-Responder

In der Gruppe R betrug der Anteil weiblicher Transplantatempfänger 36.9%, bei NR 27.7%. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied.

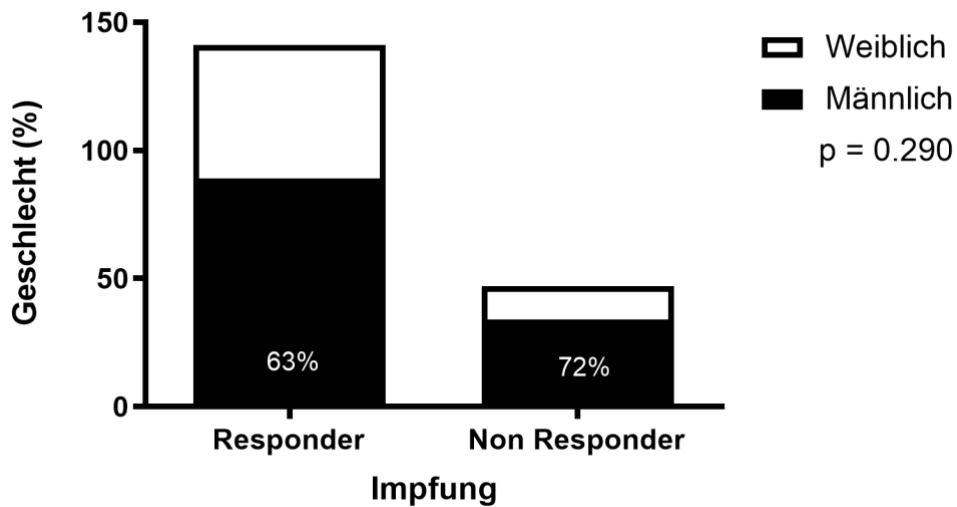


Abbildung 4: Geschlechterzusammensetzung der Empfänger, Responder vs. Non-Responder

Ebenso war der BMI beider Gruppen vergleichbar. Bei R betrug er im Mittel 25 ± 4 (kg/m^2), für NR ergab sich ein Mittel von 25 ± 4.4 (kg/m^2).

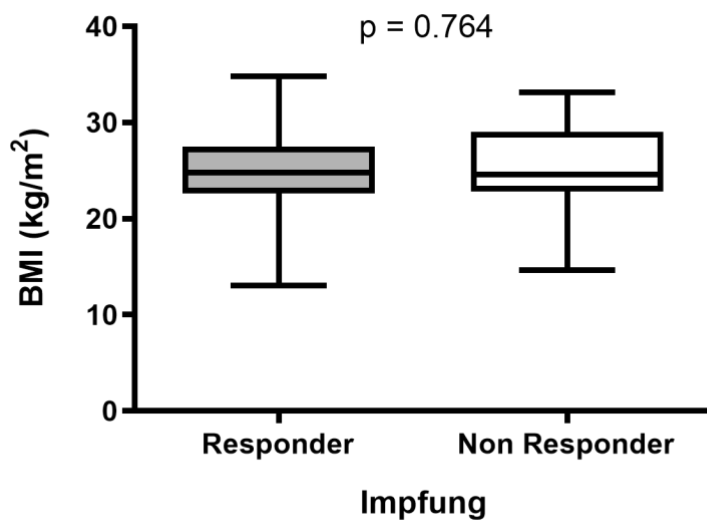


Abbildung 5: Body Mass Index (BMI) der Empfänger, Responder vs. Non-Responder

Die Zeit an der Dialyse vor Transplantation war im Mittel mit 4.58 ± 3.35 Jahren erstaunlicherweise bei den Impfrespondern signifikant länger als bei den Non-Respondern (im Mittel 3.22 ± 2.6 Jahre). In beiden Gruppen wurden einzelne Patienten präemptiv transplantiert (R: 13, NR: 4).

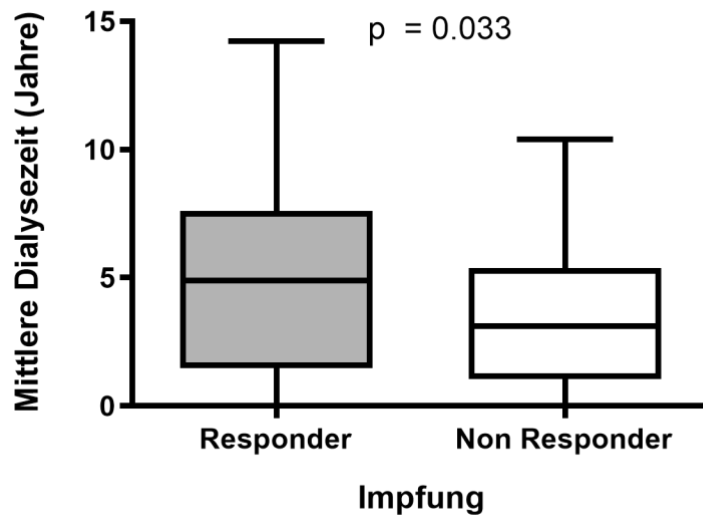


Abbildung 6: Zeit an der Dialyse vor Transplantation der Empfänger, Responder vs. Non-Responder

Weiterhin gab es signifikante Unterschiede in der renalen Grunderkrankung beider Gruppen. So war Diabetes mellitus bei den Respondern nur in 14.2% die Transplantations-ursächliche Krankheit, bei den Non-Respondern lag dieser Anteil nahezu doppelt so hoch bei 27.7%. Dies steht aller Wahrscheinlichkeit nach im Zusammenhang mit dem weiteren signifikanten Unterschied in der Art der Transplantation (z.B. kombinierte Pankreas-/Nierentransplantation) und stimmt überein mit Angaben aus der Literatur, demnach Diabetiker geringere Serokonversionsraten nach HBV-Impfung aufweisen [47].

Des Weiteren wurden angesichts der Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang bestimmter HLA-Allele mit der ausreichenden Impfantwort [46] Unterschiede in den aktuell am häufigsten diskutierten HLA-Allelen verglichen (siehe Tabelle 5).

HLA-Allele	Responder (n = 141)	Non-Responder (n = 47)	p-Wert
DRB1*01	23 (16.3%)	11 (23.4%)	0.271
DRB1*03	30 (21.3%)	12 (25.5%)	0.415
DRB1*04	35 (24.8%)	13 (27.7%)	0.559
DRB1*08	5 (3.5%)	2 (4.3%)	0.677
DRB1*10	3 (2.1%)	2 (4.3%)	0.596
DQB1*05	42 (29.8%)	18 (38.3%)	0.211

Tabelle 5: Ausgewählte HLA-Allele beider Gruppen im Vergleich

In unserer Studie konnte auch hier kein signifikanter Unterschied bei den betreffenden Allelen gefunden werden.

Zusammenfassend ließen sich unter Verwendung eines Cox proportional hazards model mit Bestätigung durch eine multivariate Analyse Alter, Geschlecht, BMI und bestimmte HLA-Allelen der Empfänger in unserer Studie als Einflussfaktoren auf den Erfolg der HBV-Impfung ausschließen.

4.3. Transplantatabstoßung

Insgesamt erhielten 105 (55.85 %) Patienten mindestens eine Biopsie während des untersuchten Zeitraums der Nachsorge, die Einteilung erfolgte nach der Banff-Klassifikation (siehe Tabelle 1). Eine akute Transplantatabstoßung wurde bei 51 Patienten diagnostiziert. Von diesen wiederum hatten 50 Patienten eine T-Zell-medierte Rejektion inklusive der Patienten mit Borderline-Befunden (Banff 3). Eine Antikörper-vermittelte Rejektion wurde nur bei einem einzigen Patienten nachgewiesen. Die Anzahl der Rejektionen war in der NR-Gruppe höher als in der R-Gruppe, der Unterschied war allerdings nicht signifikant.

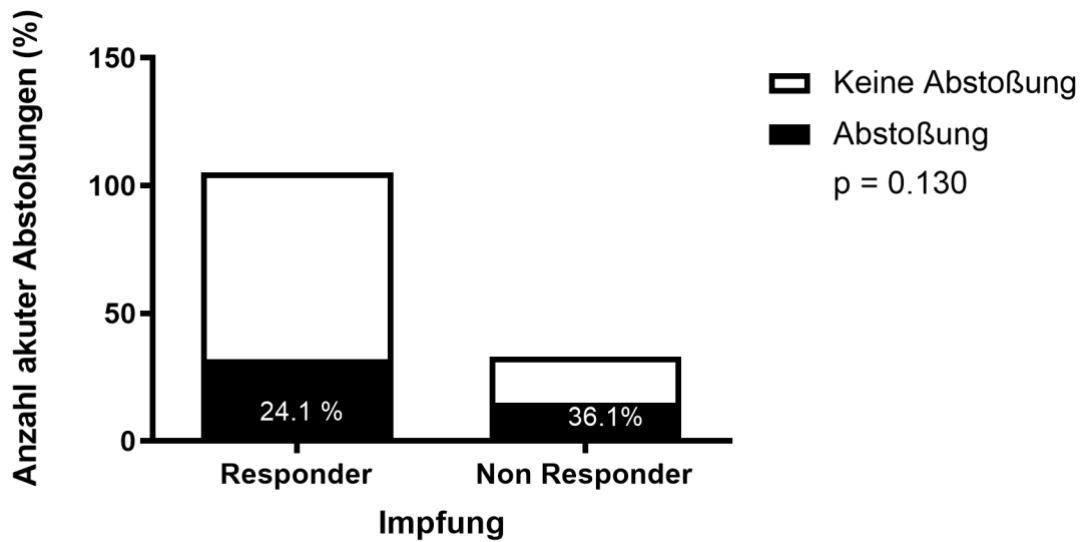


Abbildung 7: Transplantatabstoßung der Empfänger, Responder vs. Non-Responder

4.4. Transplantatfunktion

Als relevanter Funktionsverlust des Transplantats wurde ein jährlicher Anstieg des Serum-Kreatininwertes von über 20% definiert. Dies wurde über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen:

Outcome	Responder	Non-Responder	p-Wert
Transplantatfunktionsverlust (Kreatininanstieg > 20% innerhalb von 12 Monaten)			
1. Jahr	27 (19.1%)	9 (27.7%)	1
2. Jahr	24 (17%)	7 (14.9%)	0.823
3. Jahr	26 (19.2%)	8 (17%)	0.830

Tabelle 6: Transplantatfunktionsverlust im Vergleich, Responder vs. Non-Responder

Im ersten Jahr nach Transplantation zeigten jeweils 19,1% Patienten in Gruppe R und 27,7% in Gruppe NR einen Anstieg des Serum-Kreatinins. Im zweiten Jahr waren es 17% in Gruppe R und 14,9% in Gruppe NR, im dritten Jahr zeigte sich ein relevanter Anstieg des Kreatinins bei 19,2% in R Patienten (26 von 135, bei sechs Patienten waren die Daten unvollständig), gegenüber 17% in Gruppe NR.

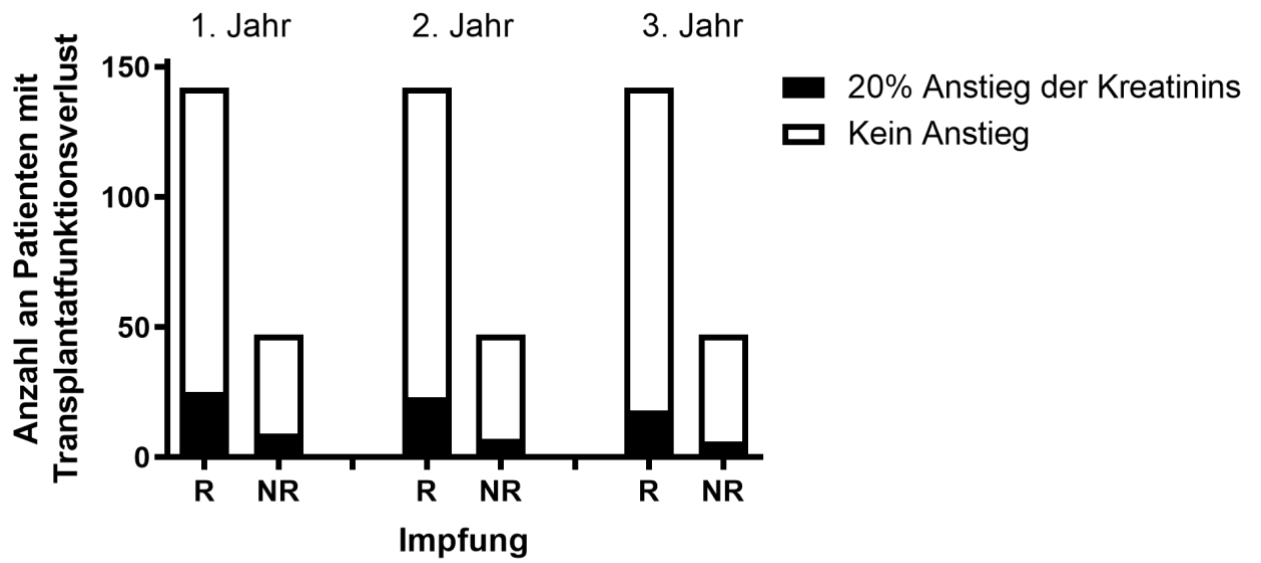


Abbildung 8: Transplantatfunktionsverlust im Vergleich, Responder vs. Non-Responder

4.5. Transplantatüberleben

Nachdem wir den Funktionsverlust der Transplantate untersucht hatten, wollten wir nun das Transplantat-Überleben betrachten. Hierzu definierten wir alle Patienten, die nach erfolgter Transplantation erneut dialysepflichtig wurden, als Transplantatverlust.

Outcome	Responder	Non-Responder	p-Wert
Transplantatüberleben			
5-Jahres-Überleben	132 (93.6%)	44 (93.6%)	1

Tabelle 7: Transplantatüberleben nach 5 Jahren im Vergleich

In Übereinstimmung mit der Transplantatfunktion war das 5-Jahres-Transplantat-Überleben identisch zwischen R und NR (93.6%).

4.6. Entstehung deNovo anti-HLA-Antikörper

Zuletzt untersuchten wir, ob es eine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf eine Hepatitis-B-Impfung und der Entstehung von deNovo anti-HLA-Antikörpern nach Transplantation gibt. Zunächst untersuchten wir hierzu die Entstehung der anti-HLA-Antikörper, zur genaueren Differenzierung schließlich die Entstehung der donor-spezifischen anti-HLA-Antikörper.

Outcome	Responder	Non-Responder	p-Wert
Entwicklung anti-HLA-Antikörper			
deNovo anti-HLA-Antikörper	32 (22.7%)	13 (27.7%)	0.554
deNovo donor-spezifische anti-HLA-AK	20 (14.2%)	11 (23.4%)	0.173

Tabelle 8: Entwicklung anti-HLA-Antikörper im Vergleich, Responder vs. Non-Responder

Bei 45 (23.9%) der insgesamt 188 Patienten konnten deNovo anti-HLA-Antikörper nach Transplantation nachgewiesen werden. Entgegen unserer Hypothese entwickelten jedoch weniger Impfesponder im Vergleich zu Non-Respondern deNovo anti-HLA-Antikörper.

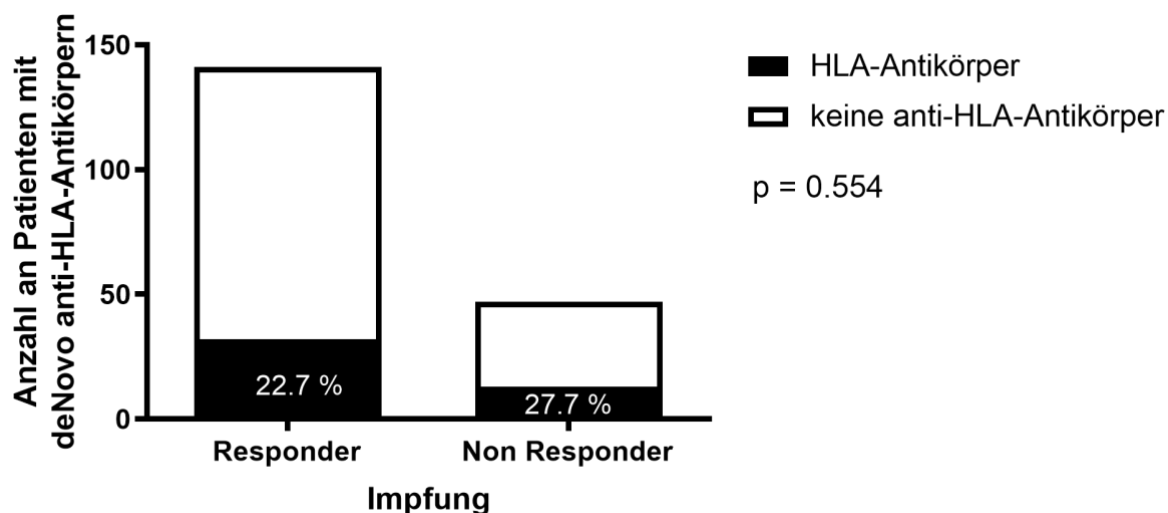


Abbildung 9: Entstehung von deNovo anti-HLA-Antikörpern nach Transplantation im Vergleich

In Bezug auf die Entwicklung von donor-spezifischen anti-HLA-Antikörpern gab es einen Trend bei den Non-Respondern. Dieser Trend zeigte jedoch keine statistische Signifikanz.

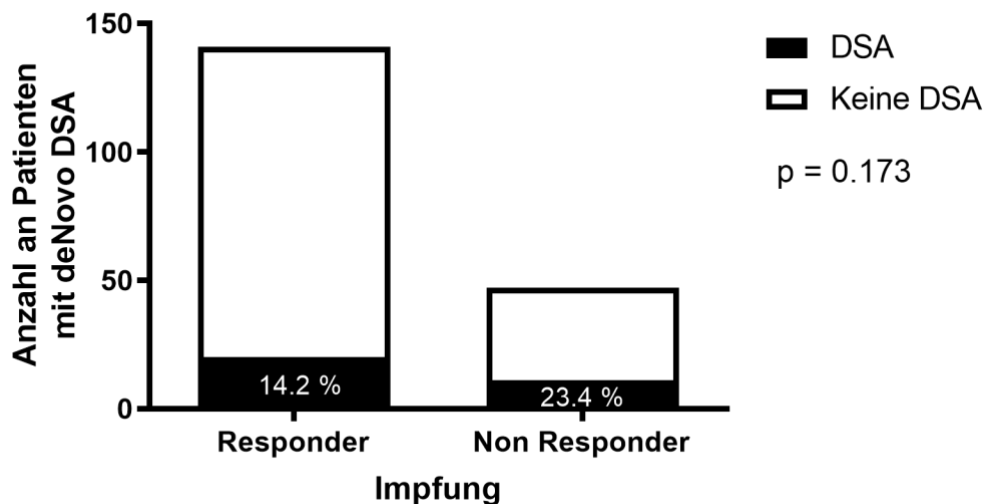


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen der Hepatitis-B-Impfung und der deNovo anti-HLA-A-Entstehung

Um einen Unterschied durch das jeweilige immunsuppressive Regime als Ursache für die Entwicklung von anti-HLA-Antikörpern auszuschließen, wurden Empfänger kombinierter Transplantate von der Analyse ausgeschlossen, d.h. nur Patienten mit einer alleinigen Nierentransplantation berücksichtigt. Die Rate an deNovo anti-HLA-Antikörpern war hier in der Gruppe R 29/126 (23.0%) gegenüber NR 10/36 (27.7%), $p = 0.6593$, und unterschied sich damit nicht signifikant. Ganz im Gegenteil zeigte sich ein Trend für die Entstehung von anti-HLA-Antikörpern bei den Non-Respondern. Ähnlich verhielt es sich bei den donorspezifischen anti-HLA-Antikörpern. Der Trend war hier noch etwas stärker ausgeprägt: in der Gruppe R 18/126 (14.4%) gegenüber NR mit 9/36 (25.0%), $p = 0.1376$. Auch hier war der Unterschied demnach nicht signifikant.

Abschließend lässt sich also sagen, dass die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass das Ansprechen auf eine Hepatitis-B-Impfung nicht mit der Entstehung von deNovo anti-HLA-Antikörpern korreliert.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation untersuchten wir anhand von 188 Patienten, die im Klinikum Großhadern zwischen 2005 – 2012 eine Nierentransplantation erhielten, den Zusammenhang zwischen der serologischen Immunantwort auf eine Impfung gegen Hepatitis B vor Transplantation und der Entstehung von deNovo-anti-HLA-Antikörpern post transplantationem. Entgegen unserer Hypothese konnte die Impfreaktion während des Dialysezeitraums nicht als Vorhersage über die Ausbildung von deNovo-anti-HLA-Antikörpern nach Transplantation herangezogen werden.

Das Auftreten von dnDSA war in unserem Studienkollektiv mit insgesamt 16.5% vergleichbar mit Angaben aus der wissenschaftlichen Literatur [14-17]. Konträr zu unserer Hypothese entwickelten Non-Responder jedoch tendenziell mehr anti-HLA-Antikörper und dnDSA als die Impfresponder. Infolgedessen war auch die Anzahl akuter Rejektionen in dieser Gruppe erhöht, wenngleich nicht signifikant. Die höhere Rejektionsrate spiegelte sich in einem größeren Anteil an Patienten mit einem Verlust der Transplantatfunktion innerhalb des ersten Jahres wider. Dieser Unterschied relativierte sich mit Fortschreiten der Zeit zunehmend, sodass keine signifikante Differenz beider Gruppen bei der 5-Jahres-Transplantatüberlebensrate vorzuweisen war.

Der immunologische Status vor Transplantation konnte in mehreren Studien mit der Entwicklung von dnDSA nach Nierentransplantation in Zusammenhang gebracht werden [24]. Ein Risiko stellt hierfür eine hohe Immunisierung, z.B. durch Transfusion, Schwangerschaft, Re-Transplantation etc. dar. Auch konnte eine direkte Assoziation aktivierter B-Zellen (Bm2) [62] und Memory-B-Zellen [63, 64] mit anti-HLA-Antikörper-Bildung vor und nach der Transplantation nachgewiesen werden. Demzufolge könnte man schlussfolgern, dass Patienten mit einer ausreichenden Impfantwort eine bessere Funktionalität der Antikörper-produzierenden B-Zellen besitzen und diese B-Zell-Aktivität auch zu einer vermehrten DSA-Produktion führen könnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Impfungen mit einer erhöhten anti-HLA-Produktion in Verbindung stehen können, was unter anderem durch eine

Aktivierung von Memory-B-Zellen erklärt werden könnte [65]. In unserer Studie zeigten die Responder jedoch eine verminderte HLA-Produktion nach Transplantation im Vergleich zu den Non-Respondern, was eher auf eine geringere B-Zell-Aktivierung in dieser Gruppe hindeutet. Zu der B-Zellaktivierung unserer Studien-Population nach Transplantation liegen leider keine Daten vor.

Ein fehlendes oder mangelndes Ansprechen auf die HBV-Impfung bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist assoziiert mit einer Lymphozytopenie und einer funktionellen Einschränkung des Immunsystems, z.B. durch Dysfunktionen in der Wechselbeziehung unterschiedlicher Immunzellen bzw. Zytokinen und durch eine verkürzte Lebensdauer der Lymphozyten. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nimmt mit steigendem Kreatinin-Wert - also sinkender Nierenfunktion - die Impferfolgsrate ab. Zudem wurde gezeigt, dass die Länge der Dialyse-Zeit mit einer reduzierten Immunreaktion korreliert [66] bzw. auch eine ineffiziente Dialyse zu einer geringeren Serokonversionsrate führt [67]. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Nierenfunktion und der Immunantwort besteht. Entgegen dieser Annahme war in unserer Studie die mittlere Dialyse-Zeit vor Transplantation bei Non-Respondern signifikant kürzer im Vergleich zu den Respondern. Demnach scheint die Verbesserung der Nierenfunktion nach Transplantation entscheidend zu sein für die Produktion von anti-HLA-Antikörpern und nicht die ausreichende Immunantwort nach HBV-Impfung vor Transplantation.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf eine Immunantwort nach HBV-Impfung hat, ist das Alter. So ist mit zunehmendem Alter das zelluläre und humorale Immunsystem in seiner Funktion durch eine voranschreitende Knochenmarksdepression beeinträchtigt. Man könnte annehmen, dass vor diesem Hintergrund die Produktion von DSA mit einem jüngeren Alter korreliert ist, was einem stabileren und effizienterem Immunsystem geschuldet ist. In unserer Studie korrelierte jedoch das Alter nicht mit einer Immunantwort auf die HBV-Impfung. Ähnlich verhielt es sich mit dem (männlichen) Geschlecht und der Unterernährung, die beide auch als Risikofaktoren für ein Non-Responding bekannt sind. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede in der Impfreaktion. Demgegenüber unterschieden sich beide Gruppen jedoch signifikant im Anteil der ursächlichen Grunderkrankung Diabetes mellitus als auch in der Art der Transplantation als kombinierte Pankreas-

Nierentransplantation, diese waren jeweils bei Non-Respondern signifikant höher. Dies deckt sich mit Angaben der Literatur, in der Diabetiker eine geringere Serokonversionsrate nach Impfung aufweisen, was auf eine Beeinträchtigung des Immunsystems hinweist [47]. Bei einem Confounding unserer Studienergebnisse durch Diabetes mellitus wäre daher eine niedrige dnDSA-Rate zu erwarten. Da die Non-Responder in der Tendenz höhere dnDSA-Werte aufzeigten, ist nicht von einer Verzerrung der Ergebnisse durch diesen Unterschied zwischen beiden Gruppen auszugehen. Es existieren noch nicht genügend Daten über Diabetes mellitus als Risikofaktor für die Entstehung von dnDSA, vereinzelt zeigen Diabetiker jedoch vergleichsweise hohe dnDSA-Werte [68]. Daher sind hier weitere Studien notwendig.

Eine ineffiziente Immunsuppression – z.B. durch Non-Compliance oder aufgrund von Nebenwirkungen reduzierten Immunsuppressions-Protokollen – ist ein Risikofaktor für die Entstehung von anti-HLA-Antikörpern. Ein wirksames Immunsuppressivum ist Mycophenolat, welches die Proliferation von B- und T-Lymphozyten und die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen hemmt. Im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Cyclosporin konnte Mycophenolat die anti-HLA-Produktion nach Transplantation senken [25, 26]. Das immunsuppressive Management unterschied sich in unserer Studie jedoch weder in der Induktions- noch in der Erhaltungstherapie signifikant in den beiden Gruppen.

5.2. Limitationen der Studie

Unsere Studie verfügt über gewisse Einschränkungen. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die geringe Stichprobengröße unserer Studienpopulation mit insgesamt 188 eingeschlossenen Patienten. Auch die verhältnismäßig kurze Nachbeobachtungszeit kann eine spätere DSA-Entwicklung verpasst haben und die Häufigkeiten einer Alloimmunreaktion unterschätzt haben. Gleichzeitig entspricht die in unserer Studie eruierte Inzidenz von DSA im Wesentlichen den Angaben in der wissenschaftlichen Literatur. Aufgrund der Hinweise für Unterschiede der DSA hinsichtlich der Komplementaktivierung für frühe und späte Abstoßungen könnten jedoch gerade späte Abstoßungen in unserer Studie verpasst worden sein. So könnte die bereits beschriebene Aktivierung von Memory-B-Zellen durch die Impfung eine zeitlich verzögerte Reaktion nach sich ziehen.

Eine weitere Einschränkung unserer Studie lag im nicht-standardisierten Impfprotokoll der Patienten. Aufgrund der Tatsache, dass die Transplantatempfänger aus vielen unterschiedlichen Dialyseeinheiten stammen, gab es Unterschiede in der Verabreichung anderer Impfstoffe. Demnach kann keine Beurteilung der Auswirkung der einzelnen Impfstoffe erfolgen. Wie oben gezeigt, existieren bereits viele Adjuvantien, die eine Serokonversion deutlich verbessern und primäre Non-Responder maskieren können. Hierüber liegen uns keine Daten vor.

6. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass eine serologische Immunantwort auf die HBV-Impfung bei Dialyse nicht die Entstehung von deNovo donorspezifischen Antikörpern oder anti-HLA-Antikörpern nach Transplantation vorhersagt. Aufgrund der weitreichenden Auswirkungen von DSA sind weitere wissenschaftliche Studien in einem multizentrischen Ansatz vonnöten, um Risikofaktoren für die Entstehung von DSA identifizieren und so Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen minimieren zu können.

7. Literaturverzeichnis

1. Kauke, T., et al., *Antibody response to HBV vaccination on dialysis does not correlate with the development of deNovo anti-HLA antibodies after renal transplantation*. *Transpl Immunol*, 2017. **42**: p. 5-8.
2. Reimer, J., et al., *[Quality of life in patients before and after kidney transplantation]*. *Psychother Psychosom Med Psychol*, 2002. **52**(1): p. 16-23.
3. Schnuelle, P., et al., *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*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. **9**(11): p. 2135-41.
4. Deutsche Stiftung Organtransplantation, *Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2017*. März 2018: Frankfurt/Main. Available from: https://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2017_web_01.pdf
5. Eurotransplant International Foundation, *Annual Report 2017*. Mai 2018, Leiden, Netherlands. Available from: <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=Annual+Report+2017+HR10.pdf>
6. Eurotransplant International Foundation, *Eurotransplant Manual Chapter 4 ET Kidney Allocation System (ETKAS) and ESP*, Version 7.0, Februar 2018. Eurotransplant Foundation: Netherlands, Leiden. Available from: <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=H4+Kidney+Februar+y+20%2C+20181.pdf>
7. Reindl-Schwaighofer, R., et al., *Contribution of non-HLA incompatibility between donor and recipient to kidney allograft survival: genome-wide analysis in a prospective cohort*. *Lancet*, 2019. **393**(10174): p. 910-917.
8. Opelz, G., et al., *HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study*. *Rev Immunogenet*, 1999. **1**(3): p. 334-42.
9. Shi, X., et al., *What is the impact of human leukocyte antigen mismatching on graft survival and mortality in renal transplantation? A meta-analysis of 23 cohort studies involving 486,608 recipients*. *BMC Nephrol*, 2018. **19**(1): p. 116.
10. Koo, E.H., et al., *The impact of early and late acute rejection on graft survival in renal transplantation*. *Kidney Res Clin Pract*, 2015. **34**(3): p. 160-4.
11. Kishikawa, H., et al., *Class II HLA Eplet Mismatch Is a Risk Factor for De Novo Donor-Specific Antibody Development and Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation Recipients*. *Transplant Proc*, 2018. **50**(8): p. 2388-2391.
12. Vo, A.A., et al., *Factors Predicting Risk for Antibody-mediated Rejection and Graft Loss in Highly Human Leukocyte Antigen Sensitized Patients Transplanted After Desensitization*. *Transplantation*, 2015. **99**(7): p. 1423-30.
13. Deutsche Gesellschaft für Immungenetik, *Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI) zur Festlegung von nicht - akzeptablen HLA-Antigendifferenzen (NAHA) bei Nierentransplantatempfängern*, Dezember 2014. Available from:

https://www.immungenetik.de/index.php/component/docman/?task=doc_download&gid=616&Itemid=

14. Kauke, T., et al., *De novo donor-specific anti-HLA antibodies after kidney transplantation are associated with impaired graft outcome independently of their C1q-binding ability*. *Transpl Int*, 2017. **30**(4): p. 360-370.
15. Huang, Y., et al., *Incidences of preformed and de novo donor-specific HLA antibodies and their clinicohistological correlates in the early course of kidney transplantation*. *Clin Transpl*, 2012: p. 247-56.
16. Wiebe, C., et al., *Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant*. *Am J Transplant*, 2012. **12**(5): p. 1157-67.
17. Everly, M.J., et al., *Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts*. *Transplantation*, 2013. **95**(3): p. 410-7.
18. Jung, H.Y., et al., *Characteristics and Clinical Significance of De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies after Kidney Transplantation*. *J Korean Med Sci*, 2018. **33**(34): p. e217.
19. Cooper, J.E., et al., *Clinical significance of post kidney transplant de novo DSA in otherwise stable grafts*. *Clin Transpl*, 2011: p. 359-64.
20. Heilman, R.L., et al., *De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation*. *Transplantation*, 2014. **98**(12): p. 1310-5.
21. Aubert, O., et al., *Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(6): p. 1912-1923.
22. Loupy, A., et al., *Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(13): p. 1215-26.
23. Zhang, R., *Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018. **13**(1): p. 182-192.
24. Almeshari, K., et al., *Targeted monitoring of donor-specific HLA antibodies following renal transplantation*. *Clin Transpl*, 2011: p. 395-400.
25. Lederer, S.R., et al., *Effects of mycophenolate mofetil on donor-specific antibody formation in renal transplantation*. *Clin Transplant*, 2005. **19**(2): p. 168-74.
26. Filler, G., et al., *Minimum mycophenolic acid levels are associated with donor-specific antibody formation*. *Pediatr Transplant*, 2016. **20**(1): p. 34-8.
27. Dieplinger, G., et al., *Onset and progression of de novo donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies after BK polyomavirus and preemptive immunosuppression reduction*. *Transpl Infect Dis*, 2015. **17**(6): p. 848-58.
28. Kosmoliaptsis, V., et al., *Impact of donor mismatches at individual HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ loci on the development of HLA-specific antibodies in patients listed for repeat renal transplantation*. *Kidney Int*, 2014. **86**(5): p. 1039-48.
29. DeVos, J.M., et al., *Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation*. *Kidney Int*, 2012. **82**(5): p. 598-604.

30. Tagliamacco, A., et al., *DQ molecules are the principal stimulators of de novo donor-specific antibodies in nonsensitized pediatric recipients receiving a first kidney transplant*. *Transpl Int*, 2014. **27**(7): p. 667-73.
31. Katerinis, I., et al., *De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients*. *Am J Transplant*, 2011. **11**(8): p. 1727-33.
32. Kaufmann, S.H.E. and R. Blasczyk, *Antigen-Antikörper-Reaktion: Grundlagen serologischer Methoden*, in *Basiswissen Immunologie*. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 47-57.
33. Haas, M., et al., *The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials*. *Am J Transplant*, 2018. **18**(2): p. 293-307.
34. Türk, T.R., O. Witzke, and M. Zeier, *KDIGO-Leitlinien zur Betreuung von Nierentransplantatempfängern*. *Der Nephrologe*, 2010. **5**(2): p. 94-107.
35. World Health Organization (WHO). *Hepatitis B*. 2018 [cited 29.12.2018]; Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
36. Robert-Koch-Institut, *Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin*, Nr. 34, 2018, Berlin. p. 335 – 382.
37. Burdick, R.A., et al., *Patterns of hepatitis B prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS*. *Kidney Int*, 2003. **63**(6): p. 2222-9.
38. Grzegorzewska, A.E., *Hepatitis B vaccination in chronic kidney disease: review of evidence in non-dialyzed patients*. *Hepat Mon*, 2012. **12**(11): p. e7359.
39. Eleftheriadis, T., et al., *Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients*. *Semin Dial*, 2007. **20**(5): p. 440-51.
40. Hohler, T., et al., *The influence of major histocompatibility complex class II genes and T-cell Vbeta repertoire on response to immunization with HBsAg*. *Hum Immunol*, 1998. **59**(4): p. 212-8.
41. Agarwal, S.K., M. Irshad, and S.C. Dash, *Comparison of two schedules of hepatitis B vaccination in patients with mild, moderate and severe renal failure*. *J Assoc Physicians India*, 1999. **47**(2): p. 183-5.
42. Fernandez, E., et al., *Response to the hepatitis B virus vaccine in haemodialysis patients: influence of malnutrition and its importance as a risk factor for morbidity and mortality*. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. **11**(8): p. 1559-63.
43. Fabrizi, F., et al., *Meta-analysis: the impact of nutritional status on the immune response to hepatitis B virus vaccine in chronic kidney disease*. *Dig Dis Sci*, 2012. **57**(5): p. 1366-72.
44. Fabrizi, F., et al., *Meta-analysis: the effect of age on immunological response to hepatitis B vaccine in end-stage renal disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004. **20**(10): p. 1053-62.

45. Khedmat, H., et al., *Sex bias in response to hepatitis B vaccination in end-stage renal disease patients: Meta-analysis*. World J Nephrol, 2016. **5**(1): p. 115-24.
46. Pol, S., et al., *Genetic basis of nonresponse to hepatitis B vaccine in hemodialyzed patients*. J Hepatol, 1990. **11**(3): p. 385-7.
47. Fabrizi, F., et al., *Meta-analysis: the impact of diabetes mellitus on the immunological response to hepatitis B virus vaccine in dialysis patients*. Aliment Pharmacol Ther, 2011. **33**(7): p. 815-21.
48. Cohen, G. and W.H. Horl, *Immune dysfunction in uremia-an update*. Toxins (Basel), 2012. **4**(11): p. 962-90.
49. Vaziri, N.D., et al., *Effect of uremia on structure and function of immune system*. J Ren Nutr, 2012. **22**(1): p. 149-56.
50. Liakopoulos, V., et al., *Hemodialysis-related changes in phenotypical features of monocytes*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13964.
51. Yoon, J.W., et al., *Naive and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease*. Kidney Int, 2006. **70**(2): p. 371-6.
52. Pahl, M.V., et al., *Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(1): p. 205-12.
53. Litjens, N.H., et al., *Impaired immune responses and antigen-specific memory CD4+ T cells in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(8): p. 1483-90.
54. Girndt, M., et al., *Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia*. Kidney Int Suppl, 2001. **78**: p. S206-11.
55. Somi, M.H. and B. Hajipour, *Improving hepatitis B vaccine efficacy in end-stage renal diseases patients and role of adjuvants*. ISRN Gastroenterol, 2012. **2012**: p. 960413.
56. Fabrizi, F., et al., *Intradermal vs intramuscular vaccine against hepatitis B infection in dialysis patients: a meta-analysis of randomized trials*. J Viral Hepat, 2011. **18**(10): p. 730-7.
57. DaRoza, G., et al., *Stage of chronic kidney disease predicts seroconversion after hepatitis B immunization: earlier is better*. Am J Kidney Dis, 2003. **42**(6): p. 1184-92.
58. Buti, M., et al., *Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in hemodialysis patients*. Am J Nephrol, 1992. **12**(3): p. 144-7.
59. ALPCO Diagnostics, *Anti-HBs ELISA For the qualitative determination of Anti-HBs in human serum or plasma - Antisurase B96, Instruction for use*, 2008. [cited 11.10.2018]. Available from: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjAqMCOxOHkAhWSaVAKHTEsCA4QFjAEegQICBAC&url=https%3A%2F%2Fs3.amazonaws.com%2Falpco-docs%2F68%2F68-4SBE3.pdf&usg=AOvVaw0s6zxDXvBKDgAH3LPI1E7I>
60. Kiefel, V. and C. Mueller-Eckhardt, *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. Vol. 4. 2011, Berlin, Heidelberg: Springer: p. 605-616.

61. Mengel, M., et al., *Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allografts: results from a multicenter trial*. Am J Transplant, 2005. **5**(5): p. 1050-6.
62. Snanoudj, R., et al., *Peripheral B-cell phenotype and BAFF levels are associated with HLA immunization in patients awaiting kidney transplantation*. Transplantation, 2014. **97**(9): p. 917-24.
63. Snanoudj, R., et al., *Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant*. Kidney Int, 2015. **87**(6): p. 1230-40.
64. Han, M., et al., *Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro*. Hum Immunol, 2009. **70**(1): p. 29-34.
65. D'Orsogna, L., et al., *Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms*. Immunogenetics, 2017. **69**(8-9): p. 631-641.
66. Steketee, R.W., M.E. Ziarnik, and J.P. Davis, *Seroresponse to hepatitis B vaccine in patients and staff of renal dialysis centers, Wisconsin*. Am J Epidemiol, 1988. **127**(4): p. 772-82.
67. Kovacic, V., M. Sain, and V. Vukman, *Efficient haemodialysis improves the response to hepatitis B virus vaccination*. Intervirology, 2002. **45**(3): p. 172-6.
68. Mittal, S., et al., *De novo donor-specific HLA antibodies: biomarkers of pancreas transplant failure*. Am J Transplant, 2014. **14**(7): p. 1664-71.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der MHC-Rezeptoren I und II im Detail.....	10
Abbildung 2: Auswahl des Patientenkollektivs.....	27
Abbildung 3: Alterszusammensetzung der Empfänger	37
Abbildung 4: Geschlechterzusammensetzung der Empfänger	38
Abbildung 5: Body Mass Index (BMI) der Empfänger	38
Abbildung 6: Zeit an der Dialyse vor Transplantation der Empfänger	39
Abbildung 7: Transplantatabstoßung der Empfänger.....	41
Abbildung 8: Transplantatfunktionsverlust im Vergleich.....	43
Abbildung 9: Entstehung von deNovo anti-HLA-Antikörpern nach Transplantation im Vergleich	45
Abbildung 10: Zusammenhang zwischen der Hepatitis-B-Impfung und der deNovo anti-HLA-A-Entstehung.....	46

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Modifizierte Darstellung der Banff-Klassifikation, aktualisiert 2017	19
Tabelle 2: Empfängerkriterien im Vergleich: Responder vs. Non-Responder	35
Tabelle 3: Spenderkriterien im Vergleich: Responder vs. Non-Responder	35
Tabelle 4: Transplantationskriterien im Vergleich: Responder vs. Non-Responder...	36
Tabelle 5: Ausgewählte HLA-Allele beider Gruppen im Vergleich	40
Tabelle 6: Transplantatfunktionsverlust im Vergleich	42
Tabelle 7: Transplantatüberleben nach 5 Jahren im Vergleich	44
Tabelle 8: Entwicklung anti-HLA-Antikörper im Vergleich	44

10. Eidesstattliche Versicherung

Link, Maximilian

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Korrelation des Impfansprechens auf Hepatitis-B-Impfung mit der Entstehung von
HLA-Antikörpern nach Nierentransplantation

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

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

München, den 23. Oktober 2020

Maximilian Link

Maximilian Link